



УДК 575.1

## **ГИБРИДИЗАЦИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК И ВОЗМОЖНОСТИ АНАЛИЗА И МАНИПУЛЯЦИЙ ГЕНАМИ ЦИТОПЛАЗМЫ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ**

**Ю. Ю. Глеба, И. В. Мянкене**

Большинство высших растений (включая практически все сельскохозяйственные растения) обнаруживают однородительское материнское наследование плазматенов в процессе обычного полового скрещивания. Таким образом, с помощью половой гибридизации получить гетерозиготы по этим генам невозможно. Многочисленные эксперименты последних лет показывают, что гибридные растения, полученные после слияния соматических клеток, содержат цитоплазматические гены обоих родителей.

Цитоплазматические (внеядерные, внехромосомные) генетические детерминанты (плазматены) высших растений были обнаружены более 70 лет назад, однако генетика цитоплазмона высших растений и на сегодняшний день остается слабо изученной. На протяжении длительного времени основным препятствием для исследования организации цитоплазмона средствами формальной генетики было однородительское материнское наследование генов цитоплазмы в половом процессе. Поэтому не удивительно, что с появлением техники соматической гибридизации особый интерес исследователей вызвала трансмиссия плазматенов в этом новом процессе гибридизации. Многочисленные эксперименты, проведенные за последнее десятилетие, однозначно доказали двуродительский способ наследования плазматенов после слияния соматических клеток. Использование метода соматической гибридизации для получения цитоплазматических гетерозигот открывает возможности формального генетического анализа цитоплазматических генов, а также позволяет вести эффективную реконструкцию генных наборов цитоплазмы в клетке высших растений [1]. Цель данного миниобзора — обсуждение имеющихся результатов в решении следующих вопросов трансмиссионной генетики процесса соматической гибридизации: а) наличие цитоплазматических гетерозигот среди парасексуального потомства; б) наличие (отсутствие) селективного давления в процессе митотической сегрегации плазматенов; в) косегрегация плазматенов; г) генетическая рекомбинация плазматенов; д) генетическое разнообразие цитоплазм, возникающих при соматической гибридизации; е) практические возможности в связи с генетической реконструкцией цитоплазмы.

Изучение судьбы цитоплазматических генов в гибридах соматических клеток в значительной степени усложняется тем, что цитоплазмон парасексуального потомства анализируется, как правило, после многократных делений продуктов слияния соматических клеток; при этом теоретически возможно разнообразие генетических событий. Построить изящную схему эксперимента по трансмиссионной генетике в системе, где одновременно происходят такие независимые события, как селективная элиминация генофоров, митотическая сегрегация и косе-

грегация, генетическая рекомбинация, мутационные процессы и др., довольно сложно. Как оказалось, большинство из вышеупомянутых процессов действительно имеют место [2]. Для выявления цитоплазматических гетерозигот, возникающих в результате слияния соматических клеток, было поставлено достаточно много экспериментов. Были подобраны признаки — подходящие маркеры для исследования генетической конституции цитоплазмы высших растений. Из них, как оказалось, пластомная хлорофиллдефектность является наиболее чувствительным маркером для селекции цитоплазматических гетерозигот. В 1975 году Глеба с сотр. впервые сообщили о наличии «смешанных» цитоплазм в растениях, полученных после слияния двух линий *Nicotiana tabacum* с пластомной хлорофиллдефектностью и ядерной мутацией типа aurea [3]. Обнаруженная в этих опытах цитоплазматическая гетерозиготность (пестролистность), в отличие от химерности, передавалась половому потомству. В последующих экспериментах сливали протопласты пластомного мутанта табака либо с цмс-аналогом, содержащим наряду с ядром (геномом) *N. tabacum* цитоплазму *N. debneyi*, либо с протопластами *N. debneyi* [4]. В потомстве, полученном в обоих видах опытов по слиянию, были обнаружены пестролистные растения. Анализ рибулезодифосфаткарбоксилазы-оксигеназы (большая субъединица которой кодируется хлоропластной ДНК) и гибридологические скрещивания подтвердили цитоплазматическую гетерозиготность как результат гибридизации, а не химерности и/или мутационных изменений, так как большая субъединица содержала полипептиды и табака, и дикого вида, а пестролистность передавалась части полового потомства. Пестрые растения содержали в тканях листа так называемые «смешанные» клетки, т. е. клетки со смесью нормальных и дефектных пластид. Гетерозиготность по генам пластомной хлорофиллдефектности, когда в качестве одной из родительских форм был пластомный мутант, наблюдали у гибридов после соматического слияния во всех исследованиях [5—7]. В последних, наиболее обширных и убедительных экспериментах [8, 9], изучали регенеранты из клонированных гетероплазматических продуктов слияния *Nicotiana*, где в качестве одного из родителей был использован пластомный хлорофиллдефектный мутант, а другими служили четыре формы аналогов с цитоплазматической мужской стерильностью аллоплазматической природы и два диких вида *Nicotiana*. Во всех видовых комбинациях цитоплазм, хотя и не во всех клонах, среди регенерантов были обнаружены пестрые растения. Пестролистность была связана с наличием хлоропластных ДНК обоих родительских видов и гетерозиготностью полипептидного состава большой субъединицы РДФК/О, с присутствием гетеропластидных клеток в мезофильных тканях пестрых растений, а также с материнским наследованием пестроты частью полового потомства. Из экспериментов следует, что, во-первых, в процессе слияния соматических клеток внеядерные генные детерминанты наследуются двуродительски — это относится ко всем признакам, кодируемым плазмагенами во всех изученных видовых комбинациях; во-вторых, состояние гетерозиготности, возникающее вследствие слияния протопластов, является относительно длительным, и цитоплазматические гетерозиготы могут быть обнаружены после многократных клеточных делений, происходящих вслед за слиянием. Эти выводы следуют из опытов с межвидовыми комбинациями цитоплазм *Nicotiana*, но, по всей видимости, они справедливы для всех экспериментальных систем, в которых не применяли селективное давление в пользу генов какой-либо из цитоплазм при селекции гибридов. Следует отметить, что большинство выводов о наследовании цитоплазматических генов при соматической гибридизации высших растений основано не на прямой демонстрации существования среди потомков цитоплазматических гетерозигот, а лишь на данных изучения спектров сегрегантов по плазмагенам [10—17].

## Сегрегация и рекомбинация плазмагенов

Основная особенность поведения плазмагенов — это их сегрегация в процессе митотических делений клеток с цитоплазматической гетерозиготностью. Это ведет к митотической рассортировке генов цитоплазмы и, следовательно, к выщеплению генетически новых гомозиготных по этим генам форм. Такое расщепление может происходить с разной скоростью для разных генов и сама возможность обнаружения гетерозигот по плазмагенам зависит от скорости сегрегационного процесса. Поэтому не удивительно, что при анализе парасексуальных гибридов исследователи чаще всего обнаруживали цитоплазматические гомозиготы-сегреганты. Ценную информацию об организации цитоплазмона представило бы изучение всего спектра цитоплазматических сегрегантов. Это позволило бы определить генетическое разнообразие полученных с помощью соматической гибридизации цитоплазм. В настоящее время уже очевидно, что процесс сегрегации не является случайным. Полный анализ этого процесса должен помочь выяснению возможного влияния следующих факторов: а) селективного давления в пользу тех или иных генофоров цитоплазмы; б) сцепленной сегрегации или косегрегации плазмагенов; в) возникновения новых признаков за счет генетической рекомбинации.

Селективное давление, направленное против специфических генофоров, может проявляться как выщепление только одного класса сегрегантов, несущих пластиды (митохондрии) одного из родительских видов. Во всех работах, где исследовали достаточное количество гибридных растений, возникших из независимых продуктов слияния протопластов, наблюдали чаще всего не один, а оба типа родительских пластид и митохондрий [5—7, 9, 10, 12]. Таким образом, можно сделать вывод, что сегрегация органелл происходит случайным образом, и пока что нет неоспоримых доказательств того, что на уровне цитоплазматических гетерозигот, полученных в результате слияния соматических клеток, имеет место выраженное селективное давление. Можно с уверенностью утверждать, что наблюдаемые в случае с генами пластид результаты являются результатами сегрегации, а не какого-либо другого генетического процесса, скажем рекомбинации, так как пластомные сегреганты во всех случаях полностью идентичны родительским формам. Что касается генов митохондрий, то здесь положение более сложное и на сегодняшний день нельзя дать однозначного ответа (см. ниже).

Из экспериментальных данных следует, что в процессе митотической сегрегации плазмагены выщепляются определенными группами, группами косегрегации [18], что свидетельствует о существовании в цитоплазме групп сцепления генов. Этот путь выявления групп сцепления внеядерных генов называют косегрегационным анализом [19]. Такие исследования представляют особую ценность в опытах с высшими растениями, цитоплазма клеток которых содержит как минимум два генофора (хлоропласты и митохондрии). Исследования, проведенные во многих лабораториях мира, показали, что такие признаки, как устойчивость к тентоксину, стрептомицину, атразину, пластомная хлорофиллдефектность, полипептидный состав большой субъединицы РДФК/О, косегрегируют с соответствующим типом хлоропластной ДНК, т. е. они кодируются пластомом [6—9, 20]. Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными результатами генетических и биохимических анализов. Так, ранее было установлено, что мутация пластомной хлорофиллдефектности связана с физическими изменениями хлоропластной ДНК; уже проведено картирование гена большой субъединицы РДФК/О на хлоропластной ДНК; также показано, что резистентность к тентоксину и атразину связана соответственно с изменениями одного из полипептидов сопрягающего фактора и белка из фотосистемы II с молекулярной массой 32 000, которые локализованы в

хлоропластах и кодируются хлоропластной ДНК. Однако только соматическая гибридизация клеток позволила подтвердить эти выводы с помощью строгого формального генетического анализа. Два признака: цитоплазматическая мужская стерильность и связанные с ней морфологические изменения цветка сегрегируют независимо от хлоропластной ДНК и в то же время косегрегируют с соответствующим типом митохондриальной ДНК [4, 7, 8, 12, 13, 21—23]. Данные косегрегации митохондриальной ДНК и генов цмс следует в настоящее время рассматривать осторожно, так как митохондриальная ДНК в процессе гибридизации клеток подвергается значительным перестройкам. Тем не менее в большинстве работ наблюдается корреляция между количественным преобладанием видоспецифических фрагментов того или иного родителя и экспрессией признаков цмс(мф), фенотипически маркирующих тот же вид цитоплазмы.

Следующий логический шаг в исследованиях групп сцепления плазматических генов состоит в пропуске через «множественные гетерозиготы» всех известных внеядерных генов, что позволит установить связь плазматических генов с теми или иными группами сцепления. В настоящее время уже подтверждено существование двух групп сцепления плазматических генов высших растений. Следует подчеркнуть, что у других типов эукариот генетическими методами не обнаружено более одной группы сцепления плазматических генов.

До настоящего времени почти все исследователи, изучая хлоропластную ДНК соматических гибридов, находили только чисто родительские формы ДНК. В связи с этим возможность рекомбинации хлоропластной ДНК в процессе гибридизации соматических клеток казалась сомнительной. Однако недавно проведенные исследования, в которых применяли селекцию в пользу рекомбинантных форм пластома, оказались успешными и уже можно сделать вывод, что рекомбинация хлоропластной ДНК, хотя и с весьма низкой частотой, все же происходит и может быть обнаружена имеющимися методами генетики [24].

В противоположность хлоропластной митохондриальная ДНК подвергается частым и крупным перестройкам в процессе гибридизации клеток [13, 22, 23, 25]. Анализ большинства соматических гибридов обнаружил уникальные типы митохондриальной ДНК у каждого из них. Наборы фрагментов, полученных при гидролизе специфическими рестриктазами, у разных гибридов варьируют и для большинства растений помимо специфических фрагментов, характерных родительским видам, было выявлено от одного до нескольких новых фрагментов. Такие изменения могут быть следствием: а) взаимодействия родительских молекул, которое приводит к возникновению рекомбинантных форм молекул митохондриальной ДНК, содержащих нуклеотидные последовательности обоих родительских видов; б) рекомбинации между молекулами одного вида; в) внутримолекулярных перестроек; г) селективного размножения и доминирования таких молекулярных форм в гибридной цитоплазме, которые составляли минорную часть гетерогенной популяции митохондриальной ДНК в родительских клетках и поэтому не обнаруживались там. Хотя еще рано говорить о рекомбинации митохондриальной ДНК на данном этапе исследований, все же ясно, что гибридизация соматических клеток в противоположность половому скрещиванию приводит к значительным изменениям в геноме митохондрий. Следовательно, гибридизация соматических клеток открывает заманчивые возможности для генетического анализа и реконструкции хондриома высших растений [26].

### **Практические возможности в связи с реконструкцией цитоплазмы**

Гибридизация соматических клеток и возможности получения цитоплазматических гетерозигот могут заинтересовать селекционера в двух отношениях. Во-первых, слияние соматических клеток позволяет в один

цикл гибридизации синтезировать формы, несущие ядро одного родителя наряду с цитоплазмой другого. Такого рода «пересадку» цитоплазмы в ряде случаев осуществляют и с помощью обычного скрещивания, однако традиционные методы связаны с длительной (многократной) рекуррентной гибридизацией и поэтому малоэффективны; кроме того, не во всех случаях родительские виды можно скрестить. В настоящее время задачи пересадки генов цитоплазмы, в частности генов, контролируемых цмс и устойчивость к гербицидам, практически решаются с помощью слияния соматических клеток для таких видов, как табак, капуста, рапс, турнепс, петунья и др. Конкретным примером технического решения вопроса, т. е. путем замещения цитоплазмы, являются работы по переносу генов устойчивости к атразину — гербициду триазинового типа. Этот признак кодируется геном пластома. У ряда культурных растений устойчивость может быть получена путем пересадки хлоропластов диких сородичей, выработавших такую устойчивость. С помощью соматической гибридизации подобный перенос осуществлен от сурепицы к рапсу и турнепсу [26]. Делаются попытки (с той же целью) пересадить пластиды от черного паслена картофелю [20]. Во-вторых, слияние клеток позволяет, как видно из вышеизложенного, довольно радикально реконструировать генные наборы цитоплазмы и путем совмещения пластома одного вида с хондрионом другого в одной клетке, и с помощью рекомбинации органелльных ДНК. Поскольку влияние генов цитоплазмы на практически важные показатели культурных растений изучено слабо, конкретные направления исследований можно лишь предполагать, однако примеры удачных решений уже имеются. Так, цмс-аналоги рапса, получаемые на основе цитоплазмы редиса, не находили практического применения из-за чувствительности их к низким температурам. Недавние исследования показали, что полученным слиянием протопластов рекомбинантные цмс-формы рапса, несущие пластиды от рапса, а митохондрии от редиса, этого недостатка не имеют.

## Выводы

Гибридизация соматических клеток позволяет создавать новые комбинации родительских плазмагенов у высших растений, в частности, этим путем можно получить: а) гетерозиготные по внеядерным генам растения; б) растения с ядром одного, а цитоплазмой другого вида; в) растения, несущие стабильный набор некоторых внеядерных генов одного родителя плюс набор иных внеядерных генов другого. Получить такие комбинации с помощью обычного полового скрещивания очень трудно или вообще невозможно. Возможности манипуляции плазмагенами растительных клеток при помощи парасексуальной гибридизации представляют теоретический и прикладной интерес. Теоретически получение гетерозигот по цитоплазмону с помощью слияния протопластов означает возможность использования тонкой техники для проведения формального генетического анализа плазмагенов клеток высших растений. Наиболее многообещающей перспективой на данном этапе является изучение групп сцепления плазмагенов и возможность выявления и применения генетической рекомбинации цитоплазматических генов. Перенос цитоплазмы, в частности перенос плазмагенов, ответственных за цмс, резистентность к гербицидам, патогенам, устойчивость к низким температурам и др., от одного вида к другому является реальным применением метода соматической гибридизации на сегодняшний день. Генетическое разнообразие внеядерных генов в растительных сортах может быть увеличено не только путем замены цитоплазмона, но и перестройки родительских цитоплазмон, что стало бы еще одним практическим результатом использования метода соматической гибридизации. Хлоропласты и митохондрии отвечают за снабжение энергией растительных клеток, поэтому генетическая реконструкция этих органелл является

существенной частью любой действительно всеохватывающей программы селекции сельскохозяйственных растений. С помощью метода гибридизации соматических клеток мы вступаем сейчас в эру селекции цитоплазмы.

#### HYBRIDIZATION OF SOMATIC CELLS AND POSSIBILITIES FOR ANALYSIS AND MANIPULATIONS OF CYTOPLASMIC GENES OF HIGHER PLANTS

*Yu. Yu. Gleba, I. V. Myashkene*

N. G. Kholodny Institute of Botany, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev  
Institute of Botany, Academy of Sciences of the Lithuanian SSR, Vilnius

#### Summary

The paper deals with the available results concerning the following problems of transmission genetics of the somatic hybridization process in higher plants: the presence of cytoplasmic heterozygotes among parasexual progeny; the occurrence of selective pressure in the process of mitotic segregation of plasmagenes; the cosegregation of plasmagenes; genetic recombination of plasmagenes; the genetic diversity of cytoplasms generating via somatic cell fusion; the practical possibilities opened by genetic reconstruction of cytoplasm.

1. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.— Киев: Наук. думка, 1984.—160 с.
2. Gleba Yu., Evans D. A. Hybridization of somatic plant cells and genetic analysis // Advances in gene technology: Molecular genetics of plants and animals / Eds. K. Downey et al.— New York: Acad. press, 1983.— P. 131—145.
3. Глеба Ю. Ю., Бутенко Р. Г., Сытник К. М. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация у *Nicotiana tabacum* L. // Докл. АН СССР.—1975.—221, № 5.— С. 1196—1198.
4. Парасексуальные цитоплазматические гибриды (цибриды) *N. tabacum* + *N. debneyi*, полученные слиянием протопластов / Ю. Ю. Глеба, Н. М. Пивень, И. К. Комарницкий, К. М. Сытник // Там же.—1978.—240, № 5.— С. 1223—1226.
5. Glimelius K., Bonnett H. T. Somatic hybridization in *Nicotiana*: Restoration of photoautotrophy to an albino mutant with defective plastids // Planta.—1981.—153, N 6.— P. 497—503.
6. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts / V. A. Sidorov, L. Menczel, F. Nagy, P. Maliga // Planta.—1981.—152, N 3.— P. 341—345.
7. Generation of heteroplastidic *Nicotiana* cybrids by protoplast fusion / R. Fluhr, D. Avid, E. Galun, M. Edelman // Theor. Appl. Genet.—1984.—67, N 6.— P. 491—498.
8. Transmission genetics of somatic hybridization process in *Nicotiana*. I. Hybrids and cybrids among the regenerates from cloned protoplast fusion products / Yu. Gleba, I. Meshkiene, N. N. Kolesnik et al. // Ibid.—1984.—69, N 2.— P. 121—128.
9. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. II. Plastome heterozygotes / Yu. Gleba, I. K. Komarnitsky, N. N. Kolesnik et al. // Mol. and Gen. Genet.—1985.—198, N 5.— P. 476—481.
10. Chen K., Wildmann S. G., Smith H. H. Chloroplast DNA distribution in parasexual hybrids as shown by polypeptide composition of Fraction I protein // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1977.—74, N 16.— P. 5109—5112.
11. Belliard G., Pelletier G., Ferault M. Fusion de protoplastes de *Nicotiana tabacum* a cytoplasmes differents: etude des hybrides cytoplasmiques neoformes // CR Acad. Sci. D.—1977.—284.— P. 749—752.
12. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum* / G. Belliard, G. Pelletier, F. Vedel, F. Quetier // Mol. and Gen. Genet.—1978.—165, N 3.— P. 231—238.
13. Belliard G., Vedel F., Pelletier G. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion // Nature.—1979.—281, N 5730.— P. 401—402.
14. Scowcroft W. R., Larkin P. J. Chloroplast DNA assorts randomly in intraspecific somatic hybrids of *N. debneyi* // Theor. Appl. Genet.—1981.—60, N 2.— P. 179—184.
15. Melchers G., Sacristan M. D., Holder A. A. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts // Carlsberg Res. Comm.—1978.—43.— P. 203—218.
16. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *N. tabacum* + *N. knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids / L. Menczel, F. Nagy, Z. Kiss, P. Maliga // Theor. Appl. Genet.—1981.—59, N 2.— P. 191—198.

17. Schiller B., Herrmann R. G., Melchers G. Restriction endonuclease analysis of plastid DNA from tomato, potato and some of their somatic hybrids // Mol. and Gen. Genet.—1982.—186, N 4.— P. 453—459.
18. Gleba Yu., Evans D. A. Hybridization of somatic plant cells: genetic analysis // Genetic Engineering / Eds. J. K. Setlow, A. Hollander.— New York: Plenum press, 1984.— P. 175—209.
19. Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы.— М.: Мир, 1975.—423 с.
20. Gressel J., Cohen N., Binding H. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of *Solanum nigrum* with *Solanum tuberosum* // Theor. Appl. Genet.—1984.—67, N 2/3.— P. 131—134.
21. Zelcer A., Avid D., Galun E. Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and X/ray irradiated protoplasts of male-sterile *N. tabacum* // Z. Pflanzenphysiol.— 1978.—90, N 4.— P. 397—407.
22. Nagy F., Torok I., Maliga P. Extensive rearrangements in the mitochondrial DNA in somatic hybrids of *N. tabacum* + *N. knightiana* // Mol. and Gen. Genet.—1981.—183, N 3.— P. 437—439.
23. A heteroplasmic state induced by protoplast fusion is a necessary condition for detecting rearrangements in *Nicotiana mitochondrial DNA* / F. Nagy, G. Lazar, L. Menczel, P. Maliga // Theor. and Appl. Genet.—1983.—66, N 3/4.— P. 203—209.
24. Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 12.— P. 4062—4079.
25. Cytoplasmic hybridization in *Nicotiana* / E. Galun, P. Arzee-Gonen, R. Fluhr et al. // Mol. and Gen. Genet.—1982.—186, N 1.— P. 50—56.
26. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion / G. Pelletier, C. Primard, F. Vedel et al. // Ibid.— 1983.—191, N 2.— P. 244—250.

Ин-т ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев  
 Иц-т ботаники АН ЛитССР, Вильнюс

Получено  
 10.07.85