

© Е. Л. Бабийчук, М. А. Банникова, В. П. Момот, Н. Н. Череп,  
И. К. Комарницкий, С. Г. Кушнир, Ю. Ю. Глеба, 1990

## ЯДЕРНО-ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ НЕСОВМЕСТИМОСТЬ У ЦИБРИДОВ С ЯДРОМ *ATROPA BELLADONNA* И ПЛАСТИДАМИ *NICOTIANA TABACUM*

Мезофильные протопласты нитратредуктазного мутанта табака, *N. tabacum*, сливали с мезофильными протопластами красавки *A. belladonna*. В ходе селекции на средах, содержащих нитрат в качестве единственного источника азота, был отобран пестролистный побег, морфологически сходный с красавкой. Из этого клона было регенерировано полностью белое растение (Abw). Цитогенетические (количество и размер хромосом) и биохимические (анализы множественных молекулярных форм амилаз, эстераз и рестриктивных фрагментов хлоропластной (хп) ДНК) исследования свидетельствуют о том, что полученное растение является цибридом с пластидами *N. tabacum* и ядром *A. belladonna*. Комплементационные эксперименты, выполненные для выяснения причин хлорофиллдефектности полученного растения, показали, что как ядро, так и пластиды линии Abw генетически нормальны и способны обеспечивать нормальную дифференцировку пластид в хлоропласты в гомологичных комбинациях пластом/геном соответственно. Следовательно, истинной причиной хлорофиллдефектности можно считать полную ядерно-цитоплазматическую несовместимость. В двух дополнительных экспериментах по слиянию протопластов данных видов было отобрано в общем более 40 новых линий хлорофиллдефектных цибридов. Показано, что ядро *A. belladonna* совместимо с пластидами филогенетически более близкого вида *Scopolia carnolica*.

**Введение.** Цитоплазматические геномы влияют практически на все признаки высших растений [1]. Однако у большинства из них генетический анализ цитоплазматических геномов сильно ограничивается однородительским наследованием плазматенов при половых скрещиваниях. Соматическая гибридизация предоставляет возможность объединения в одной клетке цитоплазматических геномов различных видов растений, в том числе и филогенетически отдаленных [2—4], что позволяет исследовать ядерно-цитоплазматические взаимодействия с помощью методов слияния протопластов. Особенно удобными здесь могли бы оказаться цибриды, получаемые между филогенетически удаленными видами растений.

В предыдущей работе мы описали получение функциональных межтрибных цибридов с геномом *N. tabacum* и пластомом *A. belladonna* [5, 6]. Недавно подобные цибриды были описаны для пары видов *N. tabacum*+*Salpiglossis sinuata* [7]. Однако во многих других случаях попытки получения зеленых нормальных отдаленных цибридов были неудачными ([7], Сидоров, Зубко, Банникова, личные сообщения). В качестве наиболее простой причины можно было бы рассматривать ядерно-цитоплазматическую несовместимость в данных видовых комбинациях. Это предположение основывается на давно известном в классической генетике феномене гибридной пестролистности [8, 9]. В этой работе мы описываем и анализируем в деталях цибриды, демонстрирующие полную ядерно-цитоплазматическую несовместимость.

**Материалы и методы.** В работе использовали следующий растительный материал:  
*N. tabacum* Nia30 — нитратредуктазный мутант табака сорта «Гатерслебен 1» [10]. Семена были предоставлены А. Мюллером (ГДР);  
*N. tabacum* SR-1 — пластомный стрептомицинустойчивый мутант [12];  
*N. tabacum* A-15 — стрептомицинустойчивый, хлорофиллдефектный мутант, обе мутации пластомные [13] (линия, производная от мутанта SR-1);  
*N. tabacum* DS1B — цибрид с ядром табака и пластидами красавки [5, 6];  
*N. tabacum* Sco — цибрид, сочетающий ядро табака и пластиды скополии (наши неопубликованные данные);  
*A. belladonna* — растение дикого типа, семена получены в Бот. саду Киев. гос. ун-та;  
*A. belladonna* Aba5 — трансгенное растение красавки, трансформированное бинарным вектором *pGA472* [14] с помощью *Agrobacterium tumefaciens* AL4404 методом листовых дисков;

*S. carniolica* — растение дикого типа, получено из Бот. сада Киев. гос. ун-та.

Табак (*N. tabacum*) принадлежит к трибе *Cestroideae* семейства *Solanaceae*. Красавка (*A. belladonna*) и скополия (*S. carniolica*) относятся к трибе *Solanoideae* того же семейства [11].

Все растения выращивали в асептических условиях на безгормональной среде Мурашиге и Скуга [15]. Нитратредуктазный мутант табака выращивали, как описано [10]. Во всех экспериментах использовали мезофильные протопласты, которые выделяли по ранее разработанной в нашей лаборатории методике [16]. Слияние протопластов индуцировали по методу «полиэтиленгликоль/высокий pH/высокий  $Ca^{++}$ /диметилсульфоксид», как описано в работе Менцеля с соавт. [17]. Протопласты культивировали на среде 8p [18]. После начала делений клетки культивировали по методу Кабоша [19]. Регенерацию побегов индуцировали на среде Мурашиге и Скуга [15] с добавлением 6-бензиладенина (1 мг/л) и 1-нафтилуксусной кислоты (0,1 мг/л). Когда необходимо, добавляли канамицинсульфат и стрептомицинсульфат до конечных концентраций 100 и 500 мг/л соответственно. В экспериментах, где использовали селекцию против клеток мутанта Nia30, в среды не добавляли нитрат аммония.

Анализ хромосом. Стебли красавки помещали на среду Мурашиге и Скуга [15] с добавлением 6-бензиладенина (0,5 мг/л) и через 1—2 недели молодые листочки развивающихся боковых почек фиксировали в фиксаторе Карнуа (спирт/уксусная кислота — 3/1) в течение ночи, после чего окрашивали в 1 %-ном ацетоорсеине. Хромосомы растений с геномом табака исследовали в кончиках корешков.

Выделение и расщепление хлДНК с помощью рестриктаз проводили по ранее отработанным методикам [20]. Электрофоретический анализ множественных молекулярных форм эстераз (субстрат 1-нафтилацетат) и амилаз проводили по протоколам Глебы и сотр. [16].

**Результаты и обсуждение.** Для исследования возможностей генетической комплементации между филогенетически удаленными видами высших растений сливали мезофильные протопласты нитратредуктазного мутанта табака Nia30 с мезофильными протопластами красавки. Протопласты красавки плохо делятся на среде 8p, поэтому мы ожидали, что на средах, содержащих нитрат как единственный источник азота, удастся отобрать рекомбинантные клеточные линии, потомки гетерокариоцитов. В этом эксперименте было отобрано около десятка колоний. Пять линий имели морфологию табака и были определены нами как ревертанты по гену нитратредуктазы и далее не изучались. Две линии регенерировали побеги с морфологией, характерной для соматических гибридов. Анализ хромосом подтвердил это предположение, метафазную пластинку одного из этих гибридов, AS6, содержащую 48 хромосом табака и 21—22 хромосомы красавки, можно видеть на рис. 1, б. Остальные колонии регенерировали побеги с характерной для красавки морфологией. На одном из побегов обнаружен белый сектор. Из этого сектора были регенерированы полностью белые растения, и линия была названа Abw (*Atropa belladonna white*).

Эти растения имели все морфологические черты красавки, как-то: полное отсутствие трихомов, присутствие антоцианов в клетках стебля и листа и т. д. Растения хорошо росли на средах с добавлением цитокининов, однако на безгормональных средах рост был замедленным и стебли плохо укоренялись. Иногда на листьях можно было наблюдать образования зеленых участков тканей (1×1 мм), однако полностью зеленые растения регенерировать из этих участков не удалось, что, по-видимому, указывает на эпигенетическую природу позеленения и не связано с обратными мутациями. Линия Abw получена в 1986 году и с тех пор поддерживается *in vitro* без изменения фенотипа, следовательно, признак хлорофиллдефектности достаточно стабилен. Очень редко на асептически выращиваемых растениях *A. belladonna* Abw мы наблюдали развитие цветочных бутонов, однако они опадали вскоре после появления.

Хромосомы табака ( $2n=48$ ) легко отличить от хромосом красавки по размерам [16]. Анализ показал, что линия Abw имеет 72 маленькие

хромосомы, как по числу, так и по размерам идентичные хромосомам красавки ( $2n=72$ ) (рис. 1, а). Геном белой красавки дополнительно исследовали, проапализировав множественные молекулярные формы эстераз и амилаз (рис. 2, б). Интересующее нас растение имело видоспецифические полосы только от красавки.

хпДНК, выделенная из табака, красавки и линии Abw была расщеплена рестриктазами, и полученные рестриктные фрагменты разделены электрофорезом в 0,8 %-ном агарозном геле. Набор полос свидетельствовал о том, что белые растения содержат чистую хпДНК табака

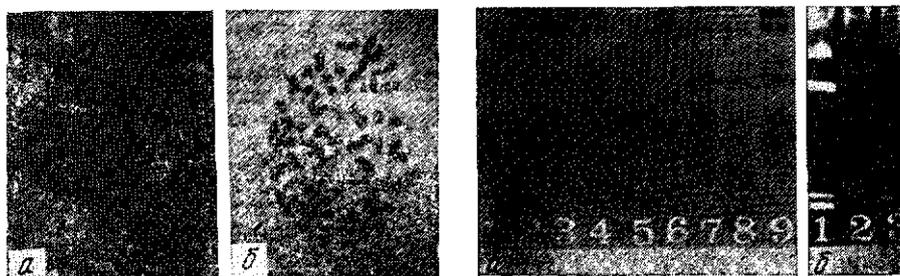


Рис. 1. Метафазные пластинки гибрида Abw ( $2n=72$ ) (а) и ядерного гибрида AS6, имеющего 48 хромосом табака ( $2n=48$ , более крупные хромосомы) и 21 хромосому красавки (б)

Fig. 1. Chromosomal plate of the *A. belladonna* Abw ( $2n=72$ ) (a); nuclear hybrid AS6, possessing 48 tobacco chromosomes ( $2n=48$ , larger ones) and 21 *Atropa belladonna* chromosomes (b)

Рис. 2. Анализ множественных молекулярных форм эстераз и амилаз: а — эстеразы гибрида *A. belladonna* Abw3 (5), *A. belladonna* Ab5 (4), *S. carniolica* (6) и гибридов *Atropa+Scopolia*, линии Sco3 (1); Sco5 (2); Sco6 (3); Sco7 (7); Tob13 (8); Tob25 (9); б — наборы амилаз табака, *N. tabacum* SR-1 (1); *A. belladonna* Ab5 (3) и *A. belladonna* Abw (2). Для описания линий см. текст

Fig. 2. Analysis of the multiple molecular forms of esterase and amylase: a — esterase patterns of *A. belladonna* Abw3 cybrid (5), *Atropa belladonna* Ab5 (4), *Scopolia carniolica* (6), as well as *Atropa+Scopolia* cybrid lines Sco3 (1); Sco5 (2); Sco6 (3); Sco7 (7); Tob13 (8); Tob25 (9); б — amylase patterns of *Nicotiana tabacum* SR-1 (1), *Atropa belladonna* Ab5 (3) and *A. belladonna* Abw cybrid (2). For description of the lines see the text

(рис. 3, а). Таким образом, проведенные анализы указывали на то, что нами получен рекомбинат, являющийся гибридом, сочетающим геном *A. belladonna* и пластом *N. tabacum*. Наиболее интригующим результатом была хлорофиллдефектность данных растений.

Ранее мы показали, что гибриды с ядерным геномом табака и пластом красавки — нормальные, зеленые и фертильные растения [5, 6]. Однако реципрокные им гибриды, как оказалось, нефункциональны.

Возникновение пластомной хлорофиллдефектности у табака описано в экспериментах по слиянию протопластов [21]. Появление мутаций в результате культивирования и манипуляций *in vitro* с растительными клетками также хорошо известно, этот феномен получил название соматональной изменчивости [22]. Поэтому хлорофиллдефектность линии Abw может быть *a priori* вследствие мутации в ядерном или пластидном геноме. С другой стороны, причиной могла быть ядерно-цитоплазматическая несовместимость, что хорошо известно, например, для *Oenothera* и *Pelargonium* [8, 9]. Все эти возможности были проверены в серии анализирующих слияний.

Если пластом белой красавки не несет мутации хлорофиллдефектности, он должен обеспечить нормальную дифференцировку пластид на гомологичном ядерном фоне, что можно легко проверить, объединив пластиды белой красавки и ядро табака. Для этого мы слили протопласты Abw с протопластами *N. tabacum* А-15, оба партнера хлорофиллдефектны. Мутантный пластом линии А-15 исключительно стабиль-

лен, и в контрольных экспериментах [23] среди более чем ста тысяч протоклонов не было обнаружено ни одного события реверсии к дикому типу. Кроме того, ранее показано [5, 6], что в подобных экспериментах происходит эффективный перенос пластид от красавки к табаку. В трех независимых экспериментах мы наблюдали развитие множества зеленых колоний. Из 30 колоний, выбранных случайным образом, были регенерированы зеленые, иногда пестролистные побеги. Растения, развившиеся из побегов, были морфологически идентичными *N. tabacum*

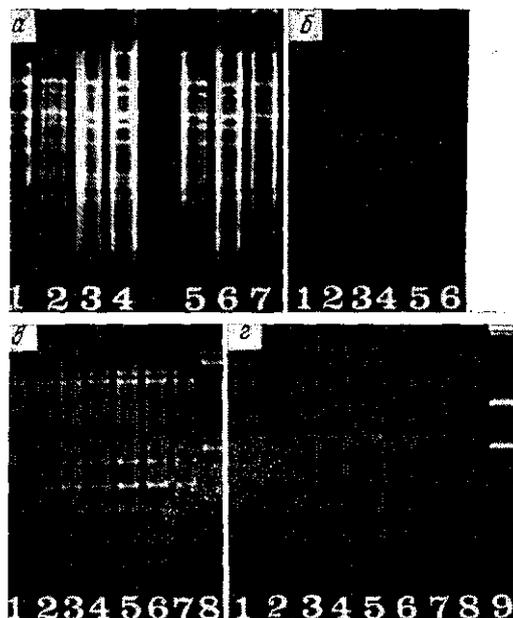


Рис. 3. Анализы хлДНК: а — *A. belladonna* Abw и растений, полученных после переноса пластид линии Abw к пластидному мутанту *N. tabacum* A-15 (*N. tabacum* SR-1 (3), *A. belladonna* (1), гибрид *A. belladonna* Abw (2) и линии гибридов с ядром A-15 и пластидами Abw — W1A (4), W1B (5), W2C (6), W2A (7)); б — растений, полученных после переноса пластид гибрида *N. tabacum* DS1B к гибриду *A. belladonna* Abw (*N. tabacum* SR-1 (1), *A. belladonna* (2), гибриды с геномом *A. belladonna* Abw и пластидом *A. belladonna* — линии RAWB (3); RAWC (4); RAWF (5)); в — различных бесхлорофильных гибридов *Atropa+Nicotiana* (*N. tabacum* SR-1, родительская линия (7); Abw (6); Abw3 (5); Abw4 (4); Abw5 (3); Abw6 (2); Abw28 (1)); на этом геле видны дополнительные полосы, возникшие из-за загрязненности препаратов хлДНК примесями ядерной и митохондриальной ДНК, так как хлДНК выделяли из хлорофиллдефектных тканей; г — анализ растений с геномом *A. belladonna* и пластидом *S. carniolica* (*A. belladonna* Ab5 (1);

8); *S. carniolica* (2, 7); линии гибридов *Atropa+Scopolia*: Sco3 (3); Sco7 (4); Tob13 (5); Tob (6)); хлДНК были гидролизваны с помощью *HindIII* (а) и *PstI* (б — г). На дорожки б (6), 8 (в) и 9 (г) нанесена расщепленная *HindIII* ДНК фага лямбда

Fig. 3. Chloroplast DNA analyses: а — *A. belladonna* Abw and plants obtained after back-transfer of Abw cybrid plastids to *N. tabacum* A-15; *N. tabacum* SR-1 (3), *A. belladonna* (1), cybrid *A. belladonna* Abw (2) and lines of the cybrids combining nucleus of A15 and plastids of Abw — W1A (4), W1B (5), W2C (6), W2A (7); б — analysis of cpDNAs of the plants, obtained after back-transfer to *A. belladonna* Abw cybrid of homologous plastids: *N. tabacum* SR-1 (1), *A. belladonna* (2), cybrids with genome of the *A. belladonna* Abw and plastome of the wild type *A. belladonna*, lines RAWB (3); RAWC (4); RAWF (5); в — analysis of the cpDNAs of the different chlorophyll-less *Atropa+Nicotiana* cybrids: *N. tabacum* SR-1 parental line (7); some extra bands are visible on this gel, their occurrence is due to contamination of the cpDNA samples with nuclear and mitochondrial DNAs, because plastids were purified from white tissues; г — analysis of the plants with genome of the *A. belladonna* and plastome of *S. carniolica*: *A. belladonna* Ab5 (1; 8); *S. carniolica* (2; 7); *Atropa+Scopolia* cybrid lines: Sco3 (3); Sco7 (4); Tob13 (5); Tob (6). For description of the lines, see the text. cpDNAs were digested with *HindIII* in A and with *PstI* in б, в, г. Lanes 6 (б), 8 (в) and 9 (г) are *HindIII* restricted DNA of phage lambda

SR-1 (линия A-15 — производная от линии SR-1), нормально росли в грунте, цвели и дали жизнеспособные семена. Анализ хлДНК показал, что растения имеют хлДНК типа табака (рис. 3, а). Таким образом, пластид линии Abw — генетически нормальный.

Для проверки ядерного генома белой красавки мы провели эксперимент по переносу пластид красавки к линии Abw. В качестве донора пластид использовали гибрид с ядром табака и пластидами красавки, *N. tabacum* DS1B [5, 6] для того, чтобы свести к минимуму возможность комплементации ядерной мутации. В эксперименте сливали мезофильные протопласты белой красавки с инактивированными гамма-облучением (500 Гр) протопластами линии DS1B. Было отобрано 36 зеленых колоний, из шести из них были регенерированы растения, ока-

завшиися морфологически идентичными линии Abw. Растения плохо укоренялись (признак Abw) и после переноса в грунт переживали в теплице до 3 месяцев, но не росли. Мы провели анализ генов альфа- и бета-губулинов у трех линий (RAW C, RAW D, RAW E) методом ДНК-ДНК гибридизации по Саузерну. Оказалось, что эти линии имели видоспецифические полосы только от красавки (данные по геномному блоту будут представлены в другой статье). Анализ хпДНК подтвердил перенос пластид красавки на ядерный фон линии Abw. Эти данные указывают на то, что исследуемая хлорофиллдефектность не является результатом мутации в ядерном геноме и что наиболее вероятной причиной является ядерно-цитоплазматическая несовместимость.

Поскольку все наши выводы основывались на анализах единственной линии Abw, мы провели дополнительные эксперименты по целенаправленному получению хлорофиллдефектных цибридов. В первом эксперименте мезофильные протопласты устойчивой к канамицину линии красавки сливали с протопластами пластомного стрептомицинустойчивого мутанта табака SR-1, оба партнера зеленые. Мы ожидали следующего поведения возможных рекомбинантов и родительских типов клеток на селективных средах, содержащих канамицинсульфат (100 мг/л) и стрептомицинсульфат (500 мг/л). Клетки табака будут убиты канамицином. Стрептомицин должен сильно подавлять рост клеток красавки и обесцвечивать их без летального эффекта. В ходе селекции смогут расти только ядерные гибриды или цибриды с пластидами табака и ядром красавки. Действительно, в эксперименте в ходе селекции в присутствии обоих антибиотиков было отобрано около трех десятков колоний, регенерировавших побеги с морфологией ядерных гибридов (эти линии будут описаны в другой статье). Мы не смогли отобрать, однако, стрептомицинустойчивые растения с морфологией красавки, что, вероятно, отражало неспособность пластид табака к развитию в хлоропласты на ядерном фоне красавки. Когда из сред убрали стрептомицин, сразу начался рост многочисленных колоний, большинство из них регенерировали зеленые, а некоторые — белые, морфологически подобные красавке побеги. Полученные новые клоны названы Abw2, Abw3, Abw4 и т. д. Всего было выделено 28 новых клонов. Все они содержали хпДНК типа табака, что можно видеть, например, из анализа, представленного на рис. 3, в. Полученные линии характеризовались совершенно нормальной морфологией, хорошо укоренялись и росли на безгормональной среде. Этот факт указывает на то, что изменения в развитии корневой системы линии Abw не связаны с чужеродными пластидами. Для всех полученных линий белых красавок проведены анализы множественных молекулярных форм амилаз и эстераз и у всех линий несовместимых цибридов были обнаружены только видоспецифические полосы красавки. Таким образом, независимо отобранные линии хлорофиллдефектных морфологически сходных с красавкой растений являются цибридами с ядром *A. belladonna* и пластидами *N. tabacum*.

Кроме того, мы решили исследовать геном одной из вновь полученных линий цибридов, линии Abw3, а также выяснить вопрос, будет ли ядро красавки совместимо с пластидами филогенетически более близкого вида. Мы выбрали для этого пластиды *S. carniolica*. Было проведено два эксперимента с разными донорами пластид скополлии. В одном мы сливали мезофильные протопласты линии Abw3 с протопластами цибрида, сочетающего пластиды *S. carniolica* и ядро *N. tabacum*. В двух других экспериментах в качестве донора использовали протопласты *S. carniolica*. Схема селекции основывалась на следующих свойствах родительских видов: белая красавка хлорофиллдефектна, но устойчива к канамицину, оба других партнера — дикого типа, т. е. зеленые, но чувствительны к канамицину. Следовательно, зеленые колонии, растущие на средах с канамицином (10 мг/л), должны быть либо ядерными гибридами, либо цибридами. Во всех трех опытах получено много зеленых колоний, те из них, что регенерировали побеги

с морфологией красавки, были проанализированы более детально. Они оказались морфологически нормальными, хорошо укоренялись. Линии были идентичны с красавкой также и по наборам изоферментов (см., например, рис. 2, а). В то же время эти линии имеют хпДНК типа *S. carniolica*. Этот вывод следует из анализа наборов рестриктных фрагментов (см. рис. 3, в). Таким образом, зеленые, морфологически нормальные растения, полученные в данной серии слияний, являются цибридами с ядром красавки и пластидами скополии; из чего следует также, что линия Abw3 имеет нормальное ядро дикого типа.

Итак, на основании проведенных экспериментов можно заключить, что хлорофиллдефектность цибридов, сочетающих ядро *A. belladonna* и пластиды *N. tabacum*, может быть отнесена на счет ядерно-цитоплазматической несовместимости. В то же время ядро *A. belladonna* вполне совместимо с пластидами филогенетически более близкого вида *S. carniolica*.

Из большого количества сообщений (см., например, [7, 9]) можно сделать вывод о том, что чем дальше филогенетически отстоят виды, тем больше вероятность проявления различных типов несовместимости. Это, по-видимому, является следствием дивергенции на уровне последовательностей нуклеотидов. Ядро одного из видов «рассматривает», скажем, пластом другого, просто как мутантный. Неясным остается вопрос, насколько изменения в разных конкретных генах хпДНК важны, чтобы привести к несовместимости. Кроме того, неясно, происходят ли изменения в генах, имеющих разное значение для взаимодействующих ядра и пластид, с разной скоростью. Мы думаем, вполне можно допустить, что взаимодействующие ядерные и пластомные гены имеют специфическую организацию, приводящую к большей скорости их изменчивости, что в итоге закрепляет происходящую дивергенцию видов. И ядерно-цитоплазматические взаимодействия могли бы рассматриваться как еще один, и мы считаем очень важный, компонент видообразования.

Изучение несовместимости ядра и пластид имеет также и чисто утилитарный интерес. Например, в природе были отобраны растения черного паслена, *Solanum nigrum*, устойчивые к атразину, гербициду триазинового ряда. Эта устойчивость наследуется по материнской линии и связана с замсой нескольких нуклеотидов в хлоропластном гене *psbA*. Однако все попытки перенести пластиды *S. nigrum* к картофелю, *S. tuberosum*, были неудачными, по-видимому, вследствие ядерно-цитоплазматической несовместимости в данной гетерологической системе.

Успешное преодоление подобного рода несовместимости, возможность дальнейшего манипулирования с цитоплазматическими геномами, может быть, более полное понимание видообразования зависят от раскрытия ядерно-цитоплазматических взаимодействий на молекулярном уровне. Мы думаем, что полученные нами гибриды и цибриды ([5, 6] и это исследование) могут рассматриваться как интересная модельная система для анализа ядерно-цитоплазматических взаимодействий, и дальнейшие исследования этой модели могут помочь в молекулярном клонировании генов, ответственных за ядерно-цитоплазматические взаимодействия.

Авторы выражают признательность коллегам Л. Р. Шлумукову, В. А. Сидорову и М. А. Зубко за ценные советы и обсуждение работы. Работа частично финансировалась фондом Кербера (Гамбург, ФРГ).

## NUCLEAR-CYTOPLASMIC INCOMPATIBILITY IN CYBRIDS POSSESSING AN *ATROPA BELLADONNA* NUCLEAR GENOME AND A *NICOTIANA TABACUM* PLASTOME

E. L. Babychuk, M. A. Bannikova, V. P. Momot, N. N. Cherep, I. K. Komarnitsky, S. G. Kushnir, Yu. Yu. Gleba

Department of Cell Biology and Engineering, N. G. Kholodny Institute of Botany, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

### S u m m a r y

Mesophyll protoplasts of the nitrate reductase deficient mutant of tobacco, *Nicotiana tabacum* Nia30 were fused with mesophyll protoplasts of wild type *Atropa belladonna*. Selection resulted in regeneration of a variegated shoot with morphology similar to that of *Atropa*. A fully chlorophyll-deficient *Atropa*-like plants were regenerated from an individual leaf sector and called *Atropa belladonna* Abw. Cytogenetic (chromosome number and morphology) and biochemical (analysis of the multiple molecular forms of amylases and esterases, restriction endonuclease analysis of the chloroplast DNA) studies have proved the cybrid nature of these plants; they possess the genome of *Atropa* and the plastome of *Nicotiana*. Genetic complementation experiments were carried out to study the nature of the chlorophyll deficiency of this cybrid. Firstly, mesophyll protoplasts of the plastome chlorophyll-deficient mutant of tobacco A-15 were fused with those of the cybrid under investigation. As a result, green or variegated tobacco plants with chloroplast DNA of *Nicotiana* were regenerated. Secondly, plastids of *Atropa* were transferred to *A. belladonna* Abw by fusion of Abw protoplasts with gamma-irradiated (500 Gy) protoplasts of the cybrid possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome (Kushnir et al., 1987). Fully green plants of *Atropa* with homologous plastids were regenerated. Numerous independent chlorophyll-free cybrids combining an *Atropa* genome and *Nicotiana* were obtained in additional experiment especially developed to select the transfer of tobacco plastids to *A. belladonna* nucleus. In addition it is shown that the same *Atropa* genome is compatible with plastome of phylogenetically closely related species *Scopolia carniolica*. Therefore, it is concluded that plastid DNA of *Nicotiana tabacum* is unable to support normal plastid differentiation into chloroplasts at the nuclear background of *A. belladonna*.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kihara H. Importance of cytoplasm in plant genetics // *Cytologia*.— 1982.— 47, N 5.— P. 435—450.
2. Gleba Y. Y., Meshkiene I. Genetic manipulation and analysis of higher plant plasmagones using cell fusion // *BioEssays*.— 1985.— 1, N 3.— P. 199—202.
3. Kumar A., Cocking E. C. Protoplast fusion: a novel approach to organelle genetics of higher plants // *Amer. J. Botany*.— 1987.— 74, N 10.— P. 1289—1303.
4. Gleba Y., Sytnik K. Protoplast fusion.— Berlin: Springer, 1984.— 203 p.
5. Ключочно-инженерный синтез гибридов, сочетающих ядро *Nicotiana tabacum* и пластиды *Atropa belladonna* / С. Г. Кушнир, Л. Р. Шлумуков, Н. Я. Погребняк, Ю. Ю. Глеба // Докл. АН СССР.— 1986.— 291, № 5.— С. 1238—1240.
6. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome / S. G. Kushnir, L. R. Schlumukov, N. J. Pogrebnyak et al. // *Mol. and Gen. Genet.*— 1987.— 209, N 3.— P. 159—163.
7. Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata* / N. D. Thanh, A. Pay, M. A. Smith et al. // *Ibid.*— 1988.— 213, N 2.— P. 186—190.
8. Stubbe W., Herrmann R. G. Selection and maintenance of plastome mutants and interspecific genome/plastome hybrids from *Oenothera* // *Meth. in chloroplast mol. biol.* / Eds P. Edelman et al.— New York: Elsevier Biomed. press, 1982.— P. 149—165.
9. Kirk J. T. O., Tilney-Bassett R. A. E. The Plastids: the chemistry, structure, growth and inheritance.— New York; Amsterdam: Elsevier North Holland, 1987.— 825 p.
10. Müller A. J. Genetic analysis of nitrate reductase-deficient tobacco plants regenerated from mutant cells. Evidence for duplicate structural genes // *Mol. and Gen. Genet.*— 1985.— 192, N 4.— P. 275—281.
11. D'Arcy W. G. The classification of the *Solanaceae* // *The biology and taxonomy of the Solanaceae* / Eds J. G. Hawkes et al.— London: Acad. press, 1979.— N 7.— P. 3—49.
12. Non-mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria / P. Maliga, A. S. Breznovits, L. Marton, F. Joo // *Nature*.— 1975.— 255.— P. 401—402.

13. Svab Z., Maliga P. *Nicotiana tabacum* mutants with chloroplast encoded streptomycin resistance and pirment deficiency // Theor. and Appl. Genet.—1985.—72, N 5.— P. 637—643.
14. New cloning vehicles for transformation of higher plants / G. An, B. D. Watson, S. Stachel et al. // EMBO J.—1985.—4, N 1.— P. 277—284.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.—1962.—15, N 3.— P. 473—497.
16. *Intertribal* hybrid cell lines of *Atropa belladonna*+*Nicotiana chinensis* obtained by cloning individual protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, V. P. Momot, N. N. Cherrep, M. V. Skarzhynskaya // Theor. and Appl. Genet.—1982.—62, N 1.— P. 75—79.
17. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum*+*Nicotiana knightiana* correlation of resistance to *N. tabacum* plastids / L. Menczel, F. Nagy, Z. R. Kiss, P. Maliga // Ibid.—1981.—59, N 2.— P. 191—195.
18. Kao K. N., Michayluk M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastina* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta.—1975.—126, N 2.— P. 105—110.
19. Caboche M. Nutritional requirements of protoplast-derived haploid tobacco cell grown at low densities in liquid medium // Ibid.—1980.—149, N 1.— P. 7—18.
20. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. II. Plastome heterozygotes / Y. Y. Gleba, I. K. Komarnitsky, N. N. Kolesnik et al. // Mol. and Gen. Genet.—1985.—198, N 4.— P. 476—481.
21. Archer F. K., Bonnett H. T. Characterization of a virescent chloroplast mutant of tobacco // Plant Physiol.—1987.—83, N 3.— P. 920—925.
22. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. and Appl. Genet.—1981.—60, N 2.— P. 197—214.
23. Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 7.— P. 6960—6964.

Отд-ние клеточ. биологии и инженерии  
Ин-та ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, Киев

Получено 21.03.90

УДК 577.152.5

© Л. И. Кононенко, Т. А. Алексеева, Ю. Д. Иващенко,  
А. И. Быкорез, 1990

## ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ И ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС С РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ ПЕЧЕНЬЮ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТОВ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

*Сыворотка крови интактных крыс незначительно модифицирует пролиферативную активность нормальных гепатоцитов в первичной культуре. В то же время сыворотка крови интактных и гепатэктомированных крыс в комплексе с эпидермальным фактором роста (ЭФР) и инсулином способна лишь ингибировать синтез ДНК клеток этой культуры.*

*У культивируемых трансформированных гепатоцитов по сравнению с нормальными уменьшается стимулирующий эффект ЭФР и инсулина. Сыворотка крови интактных крыс и крыс, подвергшихся частичной гепатэктоми, при добавлении в первичную культуру трансформированных гепатоцитов оказывает слабовыраженное действие: в одних — ингибирующее, в других — активирующее. Однако после комбинированного применения с ЭФР и инсулином наблюдается значительное снижение чувствительности к митогенному эффекту.*

*Плазма крови интактных и гепатэктомированных крыс сама по себе и в комбинации с ЭФР и инсулином лишь ингибирует синтез ДНК нормальных и трансформированных гепатоцитов в культуре.*

**Введение.** Установлено, что в регенерации печени принимает участие ряд митогенных полипептидов. К ним относятся эпидермальный фактор роста (ЭФР) и группа гепатотропных веществ, обнаруженных в ткани печени [1] и сыворотке крови [2—4]. Одним из таких веществ является трансформирующий фактор роста типа  $\beta$  (ТФР- $\beta$ ), выделенный из тромбоцитов [5]. Выяснилось, что в системе *in vitro* ТФР- $\beta$  бифункционален, и в зависимости от применяемой модели он может либо активировать, либо ингибировать пролиферацию. В первичной культуре гепа-