

Ю. Ю. ГЛЕБА, член-корреспондент АН СССР Р. Г. БУТЕНКО,
академик АН УССР К. М. СЫТНИК

СЛИЯНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ И ПАРАСЕКСУАЛЬНАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ У *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii*

В литературе имеется сообщение по неполовой гибридизации у высших растений⁽¹⁾. Система отбора гибридов, примененная в работе Брукхэвельской группы, специфична (генетически детерминированная кинетин- и ауксиннезависимость в комбинации *Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii*) и не может быть реализована для отбора комбинаций других видов. Мы попытались использовать различные дефектные по фотосинтезу мутанты табака в качестве маркеров и для отбора гибридных продуктов.

В качестве материала использовались изолированные протопласты мезофилла пластомного пестролистного мутанта, сорт Самсун⁽²⁾, и протопласты, выделенные из тканей проростков геномного мутанта *aurea* (семидоминантная мутация), гомозиготных по гену *Su*, сорт Широколистный Джона Вильямса⁽³⁾. Выделение и культивирование протопластов и регенерацию растений из протопластов проводили по ранее разработанным методикам^(4, 5). Слияние протопластов индуцировали полиэтиленгликолем⁽⁶⁾. В различных опытах (всего четыре) смешивали $1-3 \cdot 10^6$ протопластов пластомного мутанта и $2-5 \cdot 10^5$ протопластов геномного мутанта, индуцировали слияние, затем протопласты культивировали и регенерировали растения. Смешанную популяцию, необработанную полиэтиленгликолем, культивировали аналогично и использовали в качестве контрольной. Отсутствие немутантных клеток и пластид в исходном материале проверяли в люминесцентном микроскопе. Поскольку часть материала инфицировалась при пересадках, в результатах учитывались регенеранты из равных количеств колб в опыте и в контроле.

Логика экспериментов состояла в следующем. Поскольку мутации принадлежат различным генетическим системам идиотипа, по обе проявляются как утрата способности к фотосинтезу, в гибридных клетках, образуемых при слиянии протопластов, должна иметь место генетическая комплементация, и растения, полученные после регенерации гибридных протопластов, должны фотосинтезировать. Далее, использование мутанта по ядерному семидоминантному гену, с одной стороны, и пластомного мутанта, с другой, в качестве партнеров при слиянии позволяет идентифицировать по крайней мере два класса событий, ведущих к возникновению парасексуальных гибридов. 1. Если слияние двух (и более) протопластов различных мутантов сопровождается также слиянием их ядер, после регенерации должны обнаруживаться желто-зеленые, вероятно пестролистные, растения, содержащие полные комплекты идиотипов обоих партнеров. Ген *Su* в данном случае маркирует присутствие дефектного генома, а пестролистность — присутствие дефектного пластома. 2. В случае, когда по тем или иным причинам слияние ядер в гибридной клетке не происходит и позже они сегрегируют в различные клетки, но обмен цитоплазмой и органеллами произошел, а также в случае слияния протопласта с безъядерным цитопластом, полученные регенеранты будут зелеными (отсутствие гена *Su*), вероятно пестролистными, и этот класс гибридов следует рассматривать как гибриды со смешанной цитоплазмой и органеллами. Отклонения от схемы вследствие анеуплоидии не рассматриваются, как маловероятные.

Очень интересно, что после слияния протопластов прямая (физиологическая?) комплементация и образование хлорофилла в гибридных клетках не наблюдались. Аналогичную картину наблюдал и Джайлс (⁷), сливая протопласты геномного и индуцируемого геномом пластомного мутантов кукурузы. Это явление нуждается в более детальном изучении. Во всех четырех опытах в вариантах, обработанных полиэтиленгликолем, среди регенерантов обнаруживались фотосинтезирующие растения. Были найдены желто-зеленые (Su/su), а также зеленые (su/su) растения, причем часть из них оказалась пестролистными. Результаты приведены ниже:

№ опыта	1	2	3
Число желто-зеленых регенерантов (из них пестролистных)	11 (2)	4 (1)	5 (4)
Число зеленых регенерантов (из них пестролистных)	3	—	7 (6)

Поскольку: а) в контрольном варианте немутантные растения отсутствуют; б) среди фотосинтезирующих растений были и желто-зеленые пестролистные (т. е. несущие разные аллели двух генов, находившиеся у разных родителей), а одновременные обратные мутации сразу в двух локусах маловероятны; в) в исходном материале не могло быть гетеропластидных клеток, — мы заключаем с полной уверенностью, что полученные фотосинтезирующие растения являются парасексуальными гибридами, образовавшимися в результате слияния протопластов.

У желто-зеленых пестролистных растений участки с дефектным пластомом на рассеянном свете были желто-зелеными, поэтому химерность исключалась.

Приведенные данные о частоте появления гибридных растений варьируют от опыта к опыту, что, по-видимому, отображает различную частоту слияния при обработке полиэтиленгликолем. Большая часть получаемых фотосинтезирующих растений характеризовалась аномалиями морфогенеза, типичными для высокоплоидных форм (⁸); большинство из таких растений нам не удавалось укоренить, и они выпадали из дальнейшего анализа.

Цитологический анализ показал, что все желто-зеленые растения полиплоидны, причем были обнаружены и растения с околотетраплоидным набором хромосом, а также полиплоиды с числом хромосом $6n$ и выше. Из зеленых растений большая часть оказались диплоидными, но были обнаружены и полиплоиды. Эти результаты находятся в полном соответствии с вышеприведенной схемой.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что при слиянии протопластов и последующем их развитии происходят процессы, приводящие к образованию различных гибридных форм. Видимо, это следствие «беспорядка», вызываемого в системе при слиянии.

Из результатов опытов также следует, что парасексуальные гибриды отличаются от гибридов, получаемых половым путем. Во-первых, при слиянии протопластов гибридная клетка может получить полные комплекты идиомов родителей, в то время как в половом процессе у *Nicotiana* цитоплазм и пластом наследуются только по материнской линии. У полученных нами пестролистных растений дефектный пластом происходит от одного родителя, а пластом дикого типа — от другого. Во-вторых, путем использования специальных мутаций можно обнаружить класс гибридов, геном которых происходит от одного родителя, и только цитоплазма имеет гибридную природу. Гибриды такого типа также получены в наших опытах: у зеленых пестролистных регенерантов нормальный пластом получен от геномного мутанта, однако маркерный ген ядра отсутствует. В-третьих, естественно предположить, хотя это и не показано строго в данных опытах, что при парасексуальной гибридизации число одновременных родителей может быть больше чем 2. Об этом свидетельствует наличие среди гибридных растений различных полиплоидов (особенно гексаплоидов).

Таким образом, слияние соматических клеток позволяет получать гибриды, не существующие в природе.

Предложенная в опытах система отбора удобна, поскольку основана на применении хорошо изученных и доступных мутантов высших растений. Использование фотосинтетических мутаций в качестве фенотипических маркеров и для отбора гибридов не накладывает ограничения на выбор комбинаций видов при гибридизации. При этом отбор гибридной формы отодвигается до стадии регенерантов (поэтому получение гибридных клеток таким путем пока невозможно, хотя не исключена возможность обнаружения прямой комбинентации в комбинациях других мутантов). В данной работе показана внутривидовая гибридизация, однако мы надеемся получить таким же путем и межвидовые гибриды. Важным следствием результатов является то, что путем слияния любую летальную мутацию, полученную, например, экспериментальным мутагенезом, можно перевести в гетерозиготное состояние и таким образом сохранить для дальнейшего анализа.

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР
Москва

Поступило
10 I 1975

Институт ботаники
Академии наук УССР
Киев

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. S. Carlson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., v. 69, 2292 (1972). ² D. von Wettstein, G. Eriksson, In: Genetics today. Proc. XI Intern. Congr. Genet., The Hague, 1963, v. 3, Oxford, 1964, p. 591. ³ L. G. Burk, H. A. Menser, Tobacco Sci., v. 8, 101 (1964). ⁴ Ю. Ю. Глеба и др., Физиол. раст., т. 21, 598 (1974). ⁵ L. G. Shridkaya, Y. Y. Gleba, Abstr. III Intern. Congr. Plant. Tissue Cell Cult., Leicester, 1974, p. 195, ⁶ K. N. Kao, M. R. Michayluk, Planta, v. 115, 355 (1974). ⁷ K. L. Giles, Coll. Intern. C. N. R. S., № 212, 485 (1973). ⁸ N. A. Zagorska et al., Biol. Plant., v. 16, 262 (1974).