

ЭФФЕКТЫ АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ У РЕЦИПРОКНЫХ ЦИБРИДОВ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Я. И. РАТУШНЯК, А. С. КОЧЕВЕНКО

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

E-mail: yakivr@yahoo.com

Получено 07.07.2011

В обзоре рассмотрены методы получения реципрокных цитоплазматических гибридов между отдаленными таксонами цветковых растений и различные эффекты новых ядерно-цитоплазматических взаимодействий. Во всех случаях слияния протопластов использована система селекции цибридов, направленная на перенос хлоропластов донора. С точки зрения возникновения фенотипических и фотосинтетических признаков вследствие нарушений аллоплазматических взаимодействий у прямого и обратного цибридов табака или культурного томата получены существенные реципрокные отличия. Кратко проанализированы основные преимущества и ключевые достижения аллоплазматической и цитоплазматической гибридизации высших растений, рассмотрены роль и значение новых линий и цибридов как уникальных модельных объектов генетических, молекулярно-биологических, физиологических и биотехнологических исследований.

Ключевые слова: *Nicotiana, Atropa, Lycopersicon*, реципрокные цитоплазматические гибриды, фенотипические и фотосинтетические эффекты, ядерно-цитоплазматическая несовместимость.

Индивидуальное развитие растительного организма как целостной и сбалансированной системы, сформированной в процессе эволюции, контролируется ядерным, пластидным и митохондриальным геномами, координированно взаимодействующими между собой. Нарушение этой координации порождает различные аномалии как на уровне соответствующих органелл (нарушения структуры и функции), так и растений в целом (изменения роста, развития и генеративной функции). Развитие подобных признаков приводит к снижению жизнеспособности, а в отдельных случаях — к летальному исходу. Вероятно, именно поэтому большинство покрытосеменных растений имеют надежную систему защиты от таких явлений в виде однородительского (как правило, материнского) наследования плазматенов, которая исключает появление новых аллоплазматических комбинаций в случае спонтанных межвидовых переопылений и способствует межвидовой дивергенции геномов органелл. Тем не менее, 10-летние научные поиски путей преодоления естественной самоизоляции цитоплазматических геномов дважды увенчались успехом. Разра-

ботка и развитие технологий получения аллоплазматических и цитоплазматических гибридов привели к формированию фактически целого направления в цитоплазматической генетике — исследованию ядерно-цитоплазматических взаимодействий. С помощью этих двух технологий, созданных на основе ряда экспериментальных подходов, стало возможным получать аллоплазматические и цибридные растения с новыми комбинациями ядра и органелл не только между филогенетически близкими, но и отдаленными видами. Новые ядерно-цитоплазматические взаимодействия у таких растений оказались мощным генератором генетической изменчивости, что представляло как практический, так и теоретический интерес в самых различных областях знаний, таких как биотехнология, генетика, физиология или молекулярная биология. Аллоплазматические гибриды сельскохозяйственных культур с чужеродными цитоплазмами дикорастущих видов обладают множеством полезных морфологических, функциональных или адаптивных признаков и могут использоваться для селекции новых сортов. Собранные вместе все возможные варианты ядерно-

цитоплазматических гибридов являются своеобразным банком генетически ценных свойств. Поэтому вполне закономерно, что из них созданы генетические коллекции аллоплазматических линий пшениц в Японии [1] и ячменя в Беларуси [2]. Аллоплазматические и цитоплазматические гибриды, особенно между филогенетически отдаленными таксонами, являются модельными объектами для фундаментальных исследований, поскольку ученых всегда интересуют научные факты, дающие ответы на вопросы: за какие фенотипические, физиологические или биохимические признаки ответственен ядерный геном, а за какие — пластом или хондриом? Какие признаки могут появляться вследствие нарушений ядерно-пластидных либо ядерно-митохондриальных взаимодействий, а какие — через пластом-хондриомные несоответствия? Каков молекулярно-генетический механизм возникновения различных аномальных признаков? Особый интерес при этом представляют такие радикальные формы нарушений взаимодействий между тремя генетическими системами, как полная или частичная несовместимость тех или иных геномов. Исходя из двух особенностей реципрокные цитоплазматические гибриды между отдаленными видами растений, в дополнение к аллоплазматическим аналогам, можно отнести к идеальным и универсальным генетическим моделям для исследований всех типов межгеномных взаимодействий. Во-первых, они дают наиболее полную и убедительную картину причин возникновения каких-либо фенотипических и/или физиологических эффектов при всех теоретически возможных вариантах сочетаний трех растительных геномов. Во-вторых, культура *in vitro* как неотъемлемая часть метода соматической гибридизации позволяет сохранять, размножать и изучать *in vivo* гибридные растения даже с летальными признаками, возникающими вследствие ядерно-цитоплазматической несовместимости.

Аллоплазматические линии и гибриды как модели для изучения ядерно-цитоплазматических взаимодействий

Технология замещения ядерного генома, с помощью которой получают аллоплазматические или ядерно-цитоплазматические гибриды, начала применяться исследователями для высших растений еще в 20-е годы прошлого века [3]. Она основана на замене ядерного генома одного вида на другой мето-

дом многократных насыщающих возвратных скрещиваний (не менее 7 кроссов) на фоне неизменного плазмона (пластома и хондриома). Межвидовые ядерно-цитоплазматические гибриды *Oenothera*, впервые полученные Реннер [3, 4], обладали признаками хлорофиллдефектности вследствие геномно-пластомной несовместимости. Начиная с 50-х годов аллоплазматические линии были созданы между многими другими видами растений, в том числе и реципрокные гибриды [5–7]. Изучение таких ядерно-цитоплазматических химер привело к констатации многочисленных фактов влияния геномов органелл на ряд процессов и свойств растений, а именно: 1) экспрессию ядерных генов, контролирующих морфологические и количественные признаки; 2) фертильность; 3) фотосинтетические и респираторные параметры; 4) гаплоидизацию проростков; 5) устойчивость к патогенам и другим стрессовым факторам; 6) морфогенетический потенциал; 7) конъюгацию хромосом, трансмиссию и рекомбинацию отдельных компонентов ядерного генома [6]. Часть агрономически полезных признаков, возникающих в процессе скрещиваний и перемещений ядерных геномов одних хозяйственно важных видов в чужеродные цитоплазмы других родственных дикорастущих видов, впоследствии стали использовать для селекции новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур [8]. Исследования ядерно-цитоплазматических взаимодействий помогли лучше понять роль цитоплазматического генома растений, поскольку на протяжении всей истории развития генетики значение ядерного генома несколько преувеличивали. Это происходило потому, что приверженцы самого факта существования внеядерной наследственности и ее существенной роли в процессе эволюции растений продолжительное время оставались в меньшинстве [9]. После открытия ДНК в пластидах и митохондриях, когда существование цитоплазматической наследственности уже не ставилось под сомнение, такие воззрения продолжали обосновывать в первую очередь, казалось бы, объективными данными о количественном соотношении этих геномов в растительной клетке: в плазмоне было сосредоточено менее 1% генов. Однако, оценивая степень влияния чужеродных цитоплазм на формирование ряда важных количественных признаков у ядерно-цитоплазматических гибридов пшениц и эгилопсов, установили, что около 30% общей генотипической изменчивости у таких растений может быть обусловлено

генами органелл [10]. Именно поэтому цитоплазматическому фактору отводится столь значительная роль в видообразовании растений [11]. Тем не менее, реципрокные аллоплазматические гибриды были получены лишь в нескольких межвидовых комбинациях в пределах родов *Oenothera* и *Epilobium* [5] из-за, как правило, односторонней несовместимости, преодолеть которую с помощью различных технических или технологических приемов удавалось не так часто. В свою очередь, отсутствие межродовых реципрокных аллоплазматических гибридов свидетельствует о существовании непреодолимых двусторонних пре- и постзиготических барьеров. В роде *Lycopersicon* аллоплазматические гибриды с реципрокной плазмонгеномной организацией получены в одной межвидовой комбинации: между культурным томатом и *L. pennellii* [12, 13]. Однако лишь гибридные растения *L. pennellii* (+*L. esculentum*) обладали признаком цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), по-видимому, вследствие ядерно-цитоплазматического несоответствия [12].

Технология замещения геномов органелл, как один из примеров техники соматической гибридизации путем слияния протопластов, получила название цитоплазматической гибридизации (цибридизации). Она стала возможной лишь в 70-е годы прошлого века после разработки и развития двух экспериментальных методов — изолированных протопластов и культуры клеток и тканей растений — и была апробирована вначале на представителях рода *Nicotiana*, а затем и на других видах высших растений [14–16]. Цитоплазматическими гибридами (цибридами) стали называть асимметричные соматические гибриды, которые унаследовали ядерный геном одного из родителей, а плазмон — либо обоих родителей, либо альтернативно одного родителя. Технология цибридизации позволяет решать две фундаментальные задачи. Во-первых, преодолевать барьеры половой несовместимости между филогенетически отдаленными таксонами, а во-вторых, реконструировать цитоплазматические геномы как путем межвидовой перестройки или рекомбинации хлоропластной и митохондриальной ДНК (хл- и мт-ДНК) [15], так и изменения качественного состава самих органелл в цитоплазме с помощью переноса в растительную клетку хлоропластов от одного вида, а митохондрий от другого [17–20]. В результате близкородственные цибриды были получены в родах *Nicotiana*, *Solanum*, *Brassica*, *Daucus* и *Citrus* [15, 16], а также

Lycopersicon [21, 22]. Значительный успех достигнут также в продуцировании филогенетически отдаленных межродовых и межтрибных цибридных растений (табл. 1).

Таблица 1. Межродовая и межтрибная цибридизация высших растений

Геномная организация: ядро(пластиды и/или митохондрии)	Наличие цибридов	Источник литературы
Solanaceae:		
<i>Nicotiana</i> (<i>Petunia</i>)	+	[23]
<i>Nicotiana</i> (<i>Atropa</i>)	+	[24]
<i>Nicotiana</i> (<i>Salpiglossis</i>)	+	[25]
<i>Salpiglossis</i> (<i>Nicotiana</i>)	–	[25]
<i>Nicotiana</i> (<i>Solanum</i>)	–	[25]
<i>Solanum</i> (<i>Nicotiana</i>)	–	[25]
<i>Nicotiana</i> (<i>Solanum</i>)	+	[26]
<i>Solanum</i> (<i>Nicotiana</i>)	–	[27]
<i>Atropa</i> (<i>Nicotiana</i>)	+	[28]
<i>Lycopersicon</i> (<i>Solanum</i>)	–	[29, 30]
<i>Lycopersicon</i> (<i>Solanum</i>)	+	[31]
<i>Lycopersicon</i> (<i>Nicotiana</i>)	–	[31]
<i>Nicotiana</i> (<i>Lycium</i>)	+	[32]
<i>Nicotiana</i> (<i>Physochlaine</i>)	+	[32]
<i>Nicotiana</i> (<i>Nolana</i>)	+	[32]
<i>Nicotiana</i> (<i>Atropa</i>)	+	[32]
<i>Nicotiana</i> (<i>Scopolia</i>)	+	[32, 33]
<i>Nicotiana</i> (<i>Hyoscyamus</i>)	+	[34, 35]
Rutaceae:		
<i>Citrus</i> (Poormanx <i>Poncirus</i>)	+	[36]
<i>Citrus</i> (<i>Microcitrus</i>)	+	[37, 38]
<i>Citrus</i> (<i>Swinglea</i>)	+	[39]
Asteraceae:		
<i>Cichorium</i> (<i>Helianthus</i>)	+	[40, 41]

Примечание: «+» — цибридные растения получены, «–» — не получены.

В большинстве случаев межвидовые, межродовые и межтрибные цибриды были жизнеспособными и фертильными растениями [15, 16] в отличие от собственно ядерных соматических гибридов. Позднее исследователи стали получать цибридные растения с фенотипическими и функциональными нарушениями (ненормальная пигментация листьев, ЦМС, изменения в морфологии цветков, задержка роста и развития), которые проявлялись из-за ядерно-цитоплазматических несоответствий [18, 19, 28, 34, 35, 42]. Для некоторых комбинаций слияния протопластов попытки получения цибридов между филогенетически отдаленными видами были неудачными (табл. 1) [25, 27, 29, 30, 31]. Как правило, авторы сообщений рассматривают ядерно-цитоплазматическую несовместимость как основную причину отсутствия цибридов. Эти предположения основывались на известных в классической генетике феноменах гибридной пестролистности, ЦМС, карликовости и т. д.

[43–46]. Тем не менее, Thanh and Medgyesy [26] сообщили о преодолении геномно-пластомной несовместимости между *Nicotiana tabacum* и *Solanum tuberosum* (виды из различных подсемейств) вследствие рекомбинации хлДНК, получив единственный клон цибрида табака с ограниченным количеством хлоропластных генов картофеля.

Функциональные цибриды культурного томата, полученные с помощью слияния обработанных йодацетамидом протопластов *L. esculentum* (реципиент) и γ -облученных протопластов *L. pennellii* (донор), унаследовали ядро и хлоропласты реципиента, а также гибридные митохондрии [47]. Эти растения формировали фертильную пыльцу и завязывали семена после самоопыления. Возникновение ЦМС у цибридов культурного томата, созданных с помощью такого же донорреципиентного слияния протопластов между филогенетически отдаленными видами *L. esculentum* и картофелем или *S. acaule*, Melchers et al. [31] связывали с рекомбинацией мтДНК. Несмотря на то, что все полученные растения имели морфологию, хромосомные числа культурного томата и гибридный хондриом (происхождение пластома осталось неизвестным), их не сразу стали называть цитоплазматическими гибридами [48]. Derks et al. [30] получили цибриды культурного томата с хлоропластами *L. hirsutum*, в то время как митохондриальный геном не был охарактеризован. Они применяли несколько иную систему селекции цибридов, направленную на перенос хлоропластов донора. В этом случае авторы использовали в качестве реципиента хлоропластов пластомный хлорофиллдефектный мутант *L. esculentum*, тогда как ядерный геном донора *L. hirsutum* также инактивировали γ -облучением. Все цибриды *L. esculentum* (+*L. hirsutum*) были функциональными, формировали фертильную пыльцу и завязывали семена. О каком-либо фенотипическом проявлении аллоплазматической несовместимости у всех полученных цибридов культурного томата с органельными геномами *L. pennellii*, *L. hirsutum*, *S. acaule* или *S. tuberosum* не сообщали.

Цитоплазматическая гибридизация наряду с технологией получения аллоплазматических линий является универсальным и эффективным инструментом познания уникальных проявлений геномно-плазменных взаимодействий, который позволяет значительно расширить диапазон генотипической изменчивости как за счет реконструкции органельных ДНК, так и с помощью моделирования несовместимости между все-

ми тремя генетическими системами растительной клетки. Однако, несмотря на более чем 30-летнюю историю становления и развития технологии цибридизации, реципрокные цибриды остаются очень редким событием и в настоящее время представлены лишь двумя геномно-пластомными комбинациями. Вначале были получены прямые и обратные межтрибные цибриды *N. tabacum* с *Atropa belladonna* [24, 28]. Затем удалось создать реципрокные межвидовые цибриды между *L. esculentum* и *L. peruvianum* var. *dentatum* (виды из разных подродов) [42, 49]. Также следует отметить неудачные попытки Thanh et al. [25] получить реципрокные ядерно-хлоропластные цибриды в двух других комбинациях: между *N. tabacum* и *Salpiglossis sinuata* (виды из разных триб) и между *N. tabacum* и *S. nigrum* (виды из разных подсемейств) (табл. 1). Рекомбинационная консервативность хл-ДНК и лабильность мт-ДНК в экспериментах по слиянию протопластов филогенетически отдаленных видов, когда используется система селекции гибридов, направленная на перенос хлоропластов, как правило, предопределяют получение пластомгеномных цибридов с рекомбинантным хондриомом [25, 33, 35, 36, 42, 49]. Единственным исключением здесь является цибрид *N. tabacum* (+*S. tuberosum*) с гибридными хлоропластами, тогда как генетическая конституция митохондрий остается неизвестной [26]. С другой стороны, целенаправленный перенос митохондрий в экспериментах по слиянию протопластов иногда приводил к получению хондриомгеномных цибридов, когда ядерный и пластидный геномы наследовались от одного вида, а митохондриальный — от другого. У таких цибридов возникали морфологические или функциональные эффекты от присутствия чужеродного хондриома, в частности мужская стерильность (МС) [18, 19], что свидетельствует о хондриомгеномном дисбалансе. К сожалению, реципрокные ядерно-митохондриальные цибриды до сих пор не получены, что делает пока невозможным изучение эффектов, возникающих исключительно за счет взаимодействий хондриомов и ядерных геномов/пластомов отдаленных видов.

Реципрокные цибриды табака и красавки

Функциональные цибриды табака *Nicotiana tabacum*(+*Atropa belladonna*). В двух независимых экспериментах по слиянию мезофильных протопластов пластомного хлорофиллдефектного стрептомицинустой-

чивого мутанта DSR *N. tabacum* ($2n = 48$) и дикого типа *A. belladonna* ($2n = 72$) была отобрана 41 зеленая каллусная линия [24]. Поскольку для культивирования протопластов использовали селективную питательную среду, на которой клетки красавки не были способны к делению, практически все зеленые колонии (за исключением четырех выживших линий *A. belladonna*) оказались гибридными. После анализа генетической конституции ядерного генома (числа и размера хромосом, морфологии и изозимных спектров амилазы, эстеразы и пероксидазы) и пластома (рестрикционных *Vam*III-, *Hind*III- и *Pst*I-спектров хлДНК) регенерантов, полученных из 37 оставшихся клеточных линий, были идентифицированы как ядерные и цитоплазматические гибриды (4 и 33 линии, соответственно). Межтрибные гибриды, унаследовавшие ядро табака и хлоропласты красавки, были зелеными, иногда пестролистными, функциональными растениями, морфологически идентичными *N. tabacum* (табл. 2). Они хорошо росли в почве, цвели и завязывали жизнеспособные семена как после самоопыления, так и при опылении пылью табака. Среди потомства пестролистных гибридов, полученного после самоопыления, некоторые растения также были пестролистными. При электронномикроскопическом анализе тканей, изолированных из пестролистных участков листьев, обнаружено присутствие гетеропластидных клеток, которые содержали как дифференцированные, так и в значительной степени недоразвитые хлоропласты. Дифференцированные пластиды также имели некоторые аномалии: большинство хлоропластов содержали сетчатые участки. К тому же анализ тилакоидных протеинов хлоропластов выявил у всех гибридных линий в значительной степени редуцированное количество полипептида 27kDa, который, судя по молекулярной массе и относительному содержанию, вероятно, соответствовал хлорофилл-*a/b*-связывающему протеину светособирающего комплекса II (ССК II). Кушнир и др. [24] не рассматривали функциональность гибридов *Nicotiana (+Atropa)* как результат ядерно-хлоропластной совместимости. Учитывая проявление пестролистности, аномалии в развитии хлоропластов и низкое содержание одного из мажорных тилакоидных полипептидов, они указывали лишь на отсутствие безупречной кооперации между ядерным геномом табака и пластомом красавки. Связь этих нарушений с пластомгеномной несовместимостью не обсуждали.

Позднее Бабийчук и др. [32] уже специально изучали хлорофилл-*a/b*-связывающие протеины ССК II не только у растений *N. tabacum (+A. belladonna)*, но и у других межтрибных гибридов табака с хлоропластами *Nolana paradoxa*, *Physochlaine officinalis*, *Lycium barbarum* или *Scopolia carniolica*, а также у гибрида *N. plumbaginifolia* с пластомами красавки. У растений всех аллоплазматических комбинаций обнаружили деградацию и/или ненормальный процессинг этих полипептидов по сравнению с родительскими видами как возможный ответ на присутствие чужеродных пластомеров. У гибридов хлорофилл-*a/b*-связывающие протеины становились короче на 11–12 аминокислот, что, по мнению авторов, могло быть связано с несовместимостью генетических компартов.

Известны также два случая, когда пестролистность гибридов связывали с мутациями хондриома, а не пластома. Пестролистность и угнетенный рост наблюдали у восьми линий гибридов культурного томата *L. esculentum (+ L. pennellii)*, содержащих пластиды *L. esculentum* и гибридные митохондрии [50], и у одной линии гибрида табака *N. tabacum (+ Petunia hybrida)*, имеющей пластом *P. hybrida* и рекомбинантный хондриом [51]. В первом случае Vonnema et al. [50], называя гибриды с ненормальным фенотипом мутантами, все же обсуждают возможность появления таких изменений вследствие несовместимости между рекомбинантным хондриомом и ядерным геномом или пластомом культурного томата, очевидно, имея в виду низкую вероятность одновременного возникновения одинаковых мутаций в восьми линиях гибридов. Во втором случае Bonnett et al. [51], учитывая происхождение единственного мутантного гибрида (выщепление из побега с нормальным фенотипом) среди 70 полученных гибридных линий табака с хлоропластами петунии [23], даже не рассматривают феномен ядерно-цитоплазматической несовместимости.

Ядерно-пластидная несовместимость гибридов красавки A. belladonna (+N. tabacum). В двух независимых экспериментах были отобраны 29 линий полностью хлорофиллдефектных гибридов реципрокной пластомгеномной организации (ядро красавки и пластиды табака) [28]. В первом опыте слияния мезофильных протопластов мутанта Nia30 *N. tabacum* ($2n = 48$), дефектного по нитратредуктазе, и дикого типа *A. belladonna* ($2n = 72$) отобрали 12 колоний.

Таблица 2. Общая характеристика *Nicotiana tabacum*, *Atropa belladonna* и цибридов с реципрокной геномно-пластомной организацией и обратно перенесенными хлоропластами

Генотип	Ядерный геном						Пластом			Фенотип
	Морфология	Кариотип	Изозимы			Гены α - и β -тубулинов	BamHI	HindIII	PstI	
			Est	Prx	Aml					
<i>Nicotiana tabacum</i>	N	48	N	N	N	N	N	N	N	н
<i>Atropa belladonna</i>	A	72	A	A	A	A	A	A	A	н
Цибриды <i>Nicotiana</i> (+ <i>Atropa</i>), линии DS	N	48	N	N	N	–	A	A	A	н
Цибриды <i>Atropa</i> (+ <i>Nicotiana</i>), линии Abw	A	72	A	–	A	–	–	N	N	а
Цибриды <i>Nicotiana</i> (+ <i>Atropa</i> (+ <i>Nicotiana</i>)), линии W	N	–	–	–	–	–	–	–	N	н
Цибриды <i>Atropa</i> (+ <i>Nicotiana</i> (+ <i>Atropa</i>)), линии RAW	A	–	–	–	–	A	–	–	A	н
Цибриды <i>Atropa</i> (+ <i>Nicotiana</i> (+ <i>Scopolia</i>)), линии Tob	A	–	–	–	A	–	–	–	S	н
Цибриды <i>Atropa</i> (+ <i>Scopolia</i>), линии Sco	A	–	–	–	A	–	–	–	S	н

Примечание: A — *Atropa belladonna*, N — *Nicotiana tabacum*, S — *Scopolia carniolica*, н — нормальные (функциональные, зеленые) растения, а — аномальные (нефункциональные, хлорофиллдефектные) растения, Est — эстераза, Prx — пероксидаза, Aml — амилаза.

Поскольку для культивирования протопластов использовали селективную питательную среду, содержащую NO_3^- как единственный источник азота, на которой клетки красавки были неспособны к делению, все выжившие колонии могли быть только гибридными. Из 12 полученных колоний был регенерирован один пестролистный побег, сходный по морфологии с *A. belladonna*. Регенерацию растений-альбиносов осуществили из вырезанных белых листовых секторов. В другом эксперименте сливали мезофильные протопласты трансгенной канамицинрезистентной линии Ab5 *A. belladonna* и пластомного стрептомицинустойчивого мутанта SR-1 *N. tabacum*. На среде, содержащей 100 мг/л канамицина и 500 мг/л стрептомицина, отобрали зеленые колонии, из которых затем были регенерированы растения, гибридные по ядру. Однако после пяти пассажей на среде, содержащей оба антибиотика, когда стрептомицин перестали добавлять, начинало расти множество других колоний, из которых удалось регенерировать пестролистные и белые растения. Среди них было изолировано 28 клонов полностью хлорофиллдефектных растений, сходных по фенотипу с *A. belladonna*. Анализы хл-ДНК, числа хромосом ($2n = 72$) и множественных молекулярных форм энзимов (ММФЭ) амилазы и эстеразы показали, что все 29 линий являются цибридами с ядерным геномом красавки и пластомом табака (табл. 2). Чтобы про-

верить возможность появления хлорофиллдефектности вследствие ядерной или пластидной мутаций, Кушнир и др. [28] в дополнительных экспериментах получили новые цибриды, в которых объединили ядерный геном красавки и пластом табака из хлорофиллдефектных цибридов с пластомом *Atropa* или *Scopolia* и ядерным геномом *Nicotiana*, соответственно (табл. 2). Цибриды всех этих контрольных геномно-пластомных комбинаций были нормальными, зелеными растениями (линии W, RAW, Tob и Sco, табл. 2), что позволило сделать вывод о несовместимости ядерного генома *A. belladonna* с пластомом *N. tabacum*. Впоследствии реципрокные цибриды табака и красавки были использованы в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов возникновения ядерно-цитоплазматической несовместимости у цибридов *A. belladonna*(+ *N. tabacum*) [52]. Оказалось, что нарушение синтеза пигментов у цибридов красавки было вызвано неспособностью ядерного генома *A. belladonna* обеспечить редактирование *N. tabacum*-специфичного кодона пластидного гена *atpA* (α -субъединицы АТФ-синтазы) в мРНК. Эти результаты свидетельствуют о важной роли для высших растений органелльного аппарата редактирования РНК в эволюционной взаимной адаптации пластид и ядер. Таким образом, впервые за 80 лет исследований в области ядерно-цитоплазматических

взаимодействий раскрыт молекулярный механизм одного из фенотипических проявлений аллоплазматической несовместимости.

Реципрокные цибриды культурного и перуанского томатов

Цибрид культурного томата *Lycopersicon esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*). Межвидовой цибрид культурного томата (клон 1С) был получен после донор-реципиентного слияния мезофильных протопластов пластовного хлорофиллдефектного мутанта Pl-*alb* 1 *L. esculentum* сорта Fruhe Liebe [53] и γ-облученного дикого типа *L. peruvianum* var. *dentatum* линии 3767 [42, 54, 55]. Вывод о цибридности растений клона 1С был сделан на основе комплексного изучения генетической конституции его ядерного, пластидного и митохондриального геномов. Так, анализ морфологии (рис., В), плоидности хромосом ($2n = 2x = 24$), ММФЭ (эстеразы, пероксидазы, кислой фосфатазы, глутаматоксалоацетат трансминазы и малатдегидрогеназы), блот-гибридизация ядерной ДНК с геном 25S рРНК и амплификация со случайными праймерами ОРА-09 показали, что цибрид 1С содержит

ядерный геном *L. esculentum* (табл. 3). С другой стороны, рестрикционный анализ цитоплазматических ДНК с помощью нескольких эндонуклеаз подтвердил наследование цибридом пластома *L. peruvianum* var. *dentatum* и рекомбинантного хондриома (табл. 3).

Измененный фенотип цибридных растений культурного томата. Побеги цибрида 1С удовлетворительно росли и укоренялись *in vitro* на безгормональной среде МС [56]. В теплице цибрид рос очень плохо (рис., В), несмотря на хорошо развитую корневую систему. Растения 6-месячного возраста достигали высоты 15–20 см. Только на одном кусте развилось соцветие с четырьмя цветками, из которых завязались два очень мелких бессемянных плода красного цвета. В полевых условиях цибридные растения погибали.

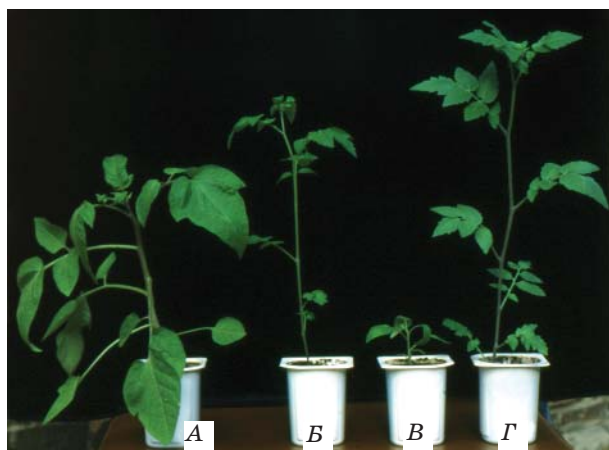
Для преодоления задержки роста и развития единственного цибрида, полученного при комбинации *L. esculentum* + *L. peruvianum* var. *dentatum* [54, 57], была использована техника прививки врасщеп [42]. Привои цибрида оказались способными к полноценной вегетации и к 4-месячному возрасту достигали высоты 160–210 см с обильным урожаем плодов (20–30 на куст), завязавшихся после беккроссов пыльцой

Таблица 3. Общая характеристика *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* var. *dentatum* и цибридов с реципрокной геномно-пластовой организацией и обратно перенесенными хлоропластами

Генотип	Ядерный геном										Цитоплазматический геном						
	Морфология	Каприотип	Изоэнзимы					Ген 25S рРНК		ПСАД	Пластом			Хондриом			
			Est	Prx	Aps	Got	Mdh	EcoRV	DraI		EcoRI	HindIII	HpaII	BamHI	HindIII	SacI	PstI
<i>L. esculentum</i> , сорт Fruhe Liebe	Е	24	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е
<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> , линия 3767	Р	24	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р	Р
Цибрид <i>L. esculentum</i> (+ <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>), клон 1С	Е	24	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Е	Р	Р	–	Е	Р	Р	Р
Цибрид <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (+ <i>L. esculentum</i> + <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>), клон К1А	Р	24	Р	Р	–	–	–	–	–	–	Р	–	–	–	–	–	–
Цибрид <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (+ <i>L. esculentum</i>), субклон В1А ¹	Р	24	Р	Р	–	–	–	–	–	Р	–	Е	Е	Р	Р	–	Р

Примечание: Е — *L. esculentum*, Р — *L. peruvianum* var. *dentatum*, R — рекомбинантный тип, Est — эстераза, Prx — пероксидаза, Aps — кислая фосфатаза, Got — глутаматоксалоацетат трансминаза, Mdh — малатдегидрогеназа; ПСАД — полиморфизм случайно амплифицированной ДНК; рРНК — рибосомная РНК;

¹ все другие субклоны цибрида и их половое поколение F₁ имели идентичную характеристику.



Восстановление нормального роста и развития цитоплазматического гибрида *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum* + *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона К1С, полученного после обратного переноса хлоропластов гибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) на ядерный фон *L. peruvianum* var. *dentatum*:

А — *L. esculentum* сорта Quedlinburger Fruhe Liebe;
 Б — гибрид *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона К1С;
 В — гибрид *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона 1С;
 Г — *L. peruvianum* var. *dentatum* линии 3767.
 Все растения 50-дневного возраста

культурного томата. В целом морфология гибрида и культурного томата сорта Fruhe Liebe не различалась. Однако окраска листьев, в отличие от исходных родительских форм, была светло-зеленой (табл. 4). Часто на листовых пластинках наблюдали мраморность (светло-желтые участки). В основном цветки гибрида не отличались по морфологии от цветков культурного томата, но у менее 10% из них пестик был выше тычиночной колонки. Признак удлинения пестика проявлялся на всех цветках одного соцветия гибрида еще на стадии бутона. После цветения чашелистики иногда приобретали признаки лепестков. Пыльцы у всех привоев формировалось очень мало, и она была стерильной. Лишь три зерна, способных формировать пыльцевую трубку, были обнаружены в примерно 100 независимых посевах пыльцы. После опыления гибрида пыльцой культурного томата около 74% цветков завязывали плоды с жизнеспособными семенами. Без беккроссирования бессемянные плоды завязывались редко, в среднем по 2–4 на куст. В течение двух вегетационных периодов в теплицах Украины (Киев) и Молдовы (Кишинев) с привоев гибрида собрано около 100 таких плодов. И только 5 плодов завязались в Киеве после самоопыления и имели жизнеспособные семена.

Таблица 4. Сравнительная характеристика наличия фенотипических и физиологических нарушений *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* var. *dentatum* и гибридов с реципрокной геномно-пластомной организацией и обратно перенесенными хлоропластами

Генотип	Аномалии фотосинтетического аппарата				Аномальные фенотипические признаки								
	Содержание хлорофиллов (a+b)	Параметры индукционных кривых флуоресценции хлорофилла	Интенсивность фотосинтеза	Содержание пигментпротениновых комплексов	Пигментация листа		Рост и развитие куста			Развитие цветка		Засыхание побегов	
					Мраморность	Светло-зеленая окраска	Карликовость	Нарушение вегетации	Неспособность расти в поле	Гетеростилия	Мужская стерильность		
<i>L. esculentum</i> , сорт QFL	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> , линия 3767	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Гибрид <i>L. esculentum</i> (+ <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>), клон 1С	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
Гибрид <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (+ <i>L. esculentum</i> + <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i>), клон К1А	н.о.	–	н.о.	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Гибрид <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (+ <i>L. esculentum</i>), субклон В1А ¹	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» или «–» — присутствие или отсутствие данного признака либо указанного нарушения; ¹все другие субклоны гибрида и их полового поколения F1 имели аналогичную характеристику; н.о. — не определяли; QFL — Quedlinburger Fruhe Liebe.

Структурно-функциональные нарушения фотосинтетического аппарата цибрида 1С. Общее содержание хлорофиллов *a* и *b* у цибрида культурного томата было ниже, чем у родительских форм. Низкие значения соотношения хлорофиллов *a/b*, а также соотношения суммы хлорофиллов и суммы каротиноидов $(a+b)/(x+c)$, свойственные клонолу 1С, указывали на различие организации пигментного аппарата цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) и родительских видов [58]. У растений цибрида наблюдали снижение содержания пигмент-протеиновых комплексов ФС I (комплекс реакционных центров CP1 и CP1a) и редукцию полосы LHCP1, которая является одной из молекулярных форм ССК II. Цибридные растения и родительские виды отличались по форме и параметрам индукционных кривых флуоресценции листьев. Спектры флуоресценции хлоропластов *L. esculentum* и *L. peruvianum* var. *dentatum*, также как и индукционные кривые, имели незначительные отличия, в то время как у цибрида обнаружены изменения как в коротко-, так и длинноволновой областях [58]. Исследуемые генотипы существенно варьировали между собой по интенсивности фотосинтеза.

Цибрид перуанского томата L. peruvianum var. *dentatum*(+ *L. esculentum*). Цибрид перуанского томата с реципрокной пластом-геномной организацией *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*) был получен после донорреципиентного слияния мезофильных протопластов пластомного хлорофиллдефектного мутанта Lp3-*alb* *L. peruvianum* var. *dentatum* линии 3767 [59, 60] и γ -облученного дикого типа *L. esculentum* сорта Quedlinburger Fruhe Liebe [49]. Первичный скрининг цибридов среди отобран-ных зеленых регенерантов проводили путем поиска диплоидных генотипов $2n = 2x = 24$. Три субклона В1А, В3А и В4А (регенерированы из одной колонии) содержали 24 хромосомы и *L. peruvianum* var. *dentatum*-специфические полосы эстеразы и пероксидазы (табл. 3). Они также имели сходные с диким видом морфологию и фрагменты ядерной ДНК после амплификации со случайными праймерами ОРА-09, тогда как *Hpa*II- и *Hind*III-спектры рестрикции хлДНК у них были идентичными *L. esculentum*, а рестрикционные *Eco*RV-, *Hind*III- и *Vam*NI-полосы мтДНК указывали на рекомбинацию митохондриального генома (табл. 3). Эти анализы подтвердили цибридное происхождение субклонов, унаследовавших ядро *L. peruvianum* var. *dentatum*, хлоропласты куль-

турного вида и гибридные митохондрии. Цибридные растения перуанского томата характеризовались самонесовместимостью и высокой жизнеспособностью. Они формировали полностью развитые цветки и завязывали плоды с жизнеспособными семенами после опыления пыльцой дикого вида.

Совместимость пластома L. esculentum с ядерным геномом L. peruvianum var. *dentatum* и рекомбинантным хондриомом. У всех субклонов цибрида перуанского томата отсутствовали какие-либо морфологические или функциональные признаки, несвойственные родительским видам, которые могли бы свидетельствовать о несовместимости ядерного генома *L. peruvianum* var. *dentatum* и пластома *L. esculentum*. Возможность проявления каких-либо аномалий на физиологическом уровне у цибрида *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*) анализировали, оценивая состояние его фотосинтетического аппарата. Тем не менее, анализы содержания пигмент-протеиновых комплексов и хлорофиллов *a* и *b*, параметров флуоресцентной индукции и CO_2 -ассимиляции подтвердили высокую фотосинтетическую активность у всех субклонов цибрида перуанского томата [49]. Следовательно, отсутствие каких-либо фенотипических или фотосинтетических нарушений у цибридных растений перуанского томата говорит об эффективном взаимодействии пластома *L. esculentum* с ядерным геномом *L. peruvianum* var. *dentatum*, т. е. об их совместимости, по крайней мере в присутствии рекомбинантного хондриома.

Несовместимость пластома L. peruvianum var. *dentatum* с ядерным геномом *L. esculentum* и реконструированным хондриомом. Способность к полноценной вегетации привитых цибридных растений культурного томата позволила всесторонне изучить их морфологические, функциональные и физиологические особенности. В дополнение к уже найденным ранее признакам ингибирования роста и развития (рис., В), которые приводили к проявлению карликовости и удлинению вегетационного периода при выращивании в теплице либо к летальному исходу — в открытом грунте, было обнаружено, что привои цибрида обладают и другими важными признаками. В частности, мужская стерильность (МС), гетеростилия и частичная хлорофиллдефектность были определены по коэффициенту прорастания пыльцы, положению пестика выше или ниже тычиночной колонки, а также мраморности и светло-зеленой окраске листьев, соответственно (табл. 4). Все новые

фенотипические признаки, несвойственные родительским видам, могли проявиться вследствие спонтанных ядерных или цитоплазматических мутаций, вызванных манипуляциями *in vitro* с растительными клетками (сомаклональной изменчивости) [61], или же они возникли в результате несовместимости ядра *L. esculentum* и хлоропластов/митохондрий *L. peruvianum* var. *dentatum*. Последнее предположение оказалось верным. Во-первых, все аномальные признаки цибрида наследовались без расщепления в поколении F_1 , полученном как после самоопыления (из 5 плодов, содержавших семена), так и после возвратных скрещиваний с культурным томатом, что говорит о менделевском наследовании и невозможности их возникновения вследствие ядерных мутаций. Во-вторых, вероятность проявления фенотипических нарушений за счет цитоплазматической изменчивости была исключена после обратного переноса хлоропластов цибрида 1С на совместимый ядерный фон перуанского томата констатацией их полного восстановления у вновь полученных растений.

Обратный перенос хлоропластов как доказательство аллоплазматической несовместимости. Обратный перенос хлоропластов выполняли по стандартной методике донорреципиентного слияния протопластов [49, 54]. В данном случае гибридизировали мезофильные протопласты пластомного хлорофиллдефектного мутанта-реципиента *Lp3-alb L. peruvianum* var. *dentatum* линии 3767 [59, 60] и γ -облученного цибрида-донора *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона 1С [62]. Более 20 клонов с диплоидным кариотипом $2n=2x=24$ были найдены среди зеленых растений-регенерантов, полученных в трех независимых экспериментах. Анализ морфологии и ММФЭ эстеразы и пероксидазы показал, что все диплоидные регенеранты обладают ядром *L. peruvianum* var. *dentatum* и полностью функциональны (рис., Б; табл. 3, 4). В свою очередь, электрофорез рестрикционных фрагментов хл-ДНК выявил, что все клоны унаследовали пластом *L. peruvianum* var. *dentatum*, и, таким образом, подтвердил обратный перенос хлоропластов цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) на исходный ядерный фон перуанского томата (табл. 3). Полученные цибридные растения *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) полностью восстанавливали темно-зеленую окраску листьев, полноценное развитие, мужскую фертильность, самонесовмести-

мость и способность расти в открытом грунте. К тому же у них отсутствовал признак карликовости, но отмечалось незначительное отставание в росте (рис., Б) и крайне редкое засыхание отдельных побегов (табл. 4).

Все клоны цибридных растений перуанского томата с обратно перенесенными хлоропластами также полностью восстанавливали фотосинтетическую активность. В частности, у них не было обнаружено снижения фотохимической активности ФС II, существенных изменений активности фотосинтетического аппарата или уменьшения содержания пигментпротеиновых комплексов ФС I (табл. 4). Наряду с восстановлением нормального фенотипа эти данные также подтверждали способность пластид *L. peruvianum* var. *dentatum* и их генетического аппарата нормально развиваться и функционировать, если путем соответствующего слияния протопластов им обеспечивали совместимый ядерный фон.

Некоторые признаки пластомхондриомного несоответствия. Нарушение пластидно-митохондриальных коммуникаций вследствие перестройки межорганельных биохимических и молекулярных взаимодействий [63], как и способность межорганельного влияния пластид на генетический аппарат митохондрий [64], на фенотипическом уровне могут приводить к возникновению карликовости, ветвлению стебля, вытягиванию и скручиванию листа [34]. Исходя из этих рассуждений можно предположить, что признаки незначительного отставания в росте и крайне редкого засыхания отдельных побегов, найденные у цибридных клонов *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)), как и карликовость цибрида культурного томата, могли быть связаны с рекомбинацией мт-ДНК и/или пластомхондриомной несовместимостью. С другой стороны, несмотря на восстановление мужской фертильности и отсутствие каких-либо изменений в морфологии цветка у всех полученных клонов цибрида перуанского томата с обратно перенесенными хлоропластами, нельзя исключать возможность остаточного эффекта ядерно-митохондриального несоответствия вследствие как первичной, так и, возможно, вторичной рекомбинации митохондриального генома после двух циклов слияния протопластов.

Эффекты ядерно-митохондриальных взаимодействий у прямого и обратного цибридов культурного томата. Феномен ядерно-митохондриальной несовместимости, как одной из форм проявления аллоплазма-

тических взаимодействий, в исследованиях по соматической цибридизации упоминается не так часто, как пластомгеномное несоответствие. Возможно, это связано с лабильностью мт-ДНК, перестройки и рекомбинации которой не являются такой редкостью, как для хл-ДНК. Поэтому вполне вероятно, что у многих цибридов между филогенетически отдаленными видами ограниченная ядерно-митохондриальная несовместимость преодолевалась рекомбинацией хондриомов и, как результат, у них отсутствовали какие-либо морфологические или функциональные аномалии. С другой стороны, появление ЦМС и/или изменений морфологии цветка у цибридов связывали с рекомбинацией мт-ДНК [31] или хондриомгеномной несовместимостью [65], вызванной перестройками мт-ДНК [34]. МС цибридов картофеля с хондриомом одного из шести видов *Solanum* коррелировала с переносом митохондрий [18, 19]. Поэтому изменения морфологии цветка (увеличение длины пестика и превращение чашелистиков в лепестки) и МС, которые наблюдали у привитых растений цибрида культурного томата, могли быть связаны как с перестройками мт-ДНК, так и с хондриомгеномной несовместимостью.

Объяснить, почему реципрокные цибриды культурного и перуанского томатов унаследовали реконструированный митохондриальный геном, а не хондриом одного или смесь хондриомов обоих родителей, довольно сложно. Присутствие мт-ДНК лишь одного родителя может быть результатом случайной сегрегации митохондрий в продуктах слияния протопластов. В то же время рекомбинация мт-ДНК происходит не случайно, а является, вероятно, жизненно необходимым условием для выживания цибридной клетки, как одного из возможных средств для сбалансированного и эффективного функционирования трех ее генетических систем в новой пластомгеномной комбинации (ядро перуанского, а пластиды культурного томата или наоборот). Поскольку материнское наследование плазмагенов при половой гибридизации свойственно большинству видов высших растений, для нормального функционирования хлоропластов, по-видимому, крайне необходимо присутствие конкретного типа хондриома, который определен одновременной эволюцией всех генетических компартментов клетки. Вот почему неселективный перенос митохондрий донорного вида вместе с селективным переносом хлоропластов или частичный перенос митохондрий донора с помощью рекомбинации мт-ДНК,

как и в нашем случае, часто имели место в экспериментах по соматической цибридизации [15, 16].

Филогенетический аспект исследований аллоплазматических взаимодействий

Ядерно-цитоплазматические взаимодействия могут рассматриваться как еще один способ изучения степени родства тех или иных видов. Иными словами, чем больше таксономическая отдаленность видов, тем выше вероятность проявления различных типов несовместимости при цибридизации. Так, Perl et al. [18], изучая совместимость ядра *S. tuberosum* с пластомом *S. chacoense* и *S. etuberosum*, показали, что картофель филогенетически более близок к первому виду, нежели ко второму. Эти результаты полностью согласовывались с данными рестрикционного анализа хл-ДНК указанных видов. Позже, используя аналогичные методы, они изучили филогению пластов картофеля и 12 других видов *Solanum* [19]. Очевидно, несовместимость пластома и хондриома *L. peruvianum* var. *dentatum* с ядерным геномом *L. esculentum* также может свидетельствовать о существенной филогенетической дистанции между видами, принадлежащими к двум под родам *Eriopersicon* и *Eulycopersicon*, соответственно. Более того, этот вывод полностью согласуется с разделением рода *Lycopersicon* на два биосистематических комплекса видов, осуществленным на основе гибридизационного теста: «peruvianum комплекс», состоящий из *L. peruvianum* и *L. chilense*, и «esculentum комплекс», включающий все оставшиеся семь видов рода, в том числе и *L. esculentum* [66]. С другой стороны, можно утверждать, что пластом *L. esculentum* эволюционно более близок к ядерному геному *L. peruvianum* var. *dentatum*, нежели пластом дикого вида к ядерному геному культурного томата. Следовательно, между пластомами обоих видов, несмотря на консерватизм пластидной ДНК, имеются определенные структурные отличия, которые возникли в результате дивергентного эволюционного развития. Естественно, отличия между пластомами табака и красавки оказались более существенными, поскольку эти виды принадлежат к более отдаленным таксонам — трибам. Поэтому частичная или полная пластомгеномная несовместимость проявлялась у цибридных растений между *N. tabacum* и *A. belladonna* как при прямой, так и при обратной аллоплазматической организации, соответственно.

К настоящему времени известны только два случая создания реципрокных пластом-геномных цибридов в межвидовой и меж-трибной комбинациях, а реципрокные ядерно-митохондриальные цибриды вообще отсутствуют. В первом случае генетическая несовместимость проявлялась только между ядерным геномом *L. esculentum* и пластомом *L. peruvianum* var. *dentatum*, тогда как во втором между *N. tabacum* и *A. belladonna* (виды из разных триб) — при любой ядерно-хлоропластной организации. Цибриды табака с хлоропластами красавки были полностью функциональными растениями на фенотипическом уровне (зелеными и фертильными). Частичная несовместимость у них проявлялась только на субклеточном и молекулярном уровнях: аномалии развития пластид и ингибирование синтеза одного из хлорофилл *a/b*-связывающих протеинов. И наоборот, цибриды красавки с пластидами табака были полностью нефункциональными, хлорофиллдефектными растениями из-за полного пластомгеномного диспаритета. Установлено, что нарушение синтеза пигментов у них вызвано неспособностью ядерного генома *A. belladonna* обеспечить редактирование *N. tabacum*-специфичного кодона пластидного гена *atpA* в мРНК. Что касается другой реципрокной межвидовой комбинации, то все новые, неменделевски наследуемые морфологические и функциональные признаки у привитых и непривитых цибридных растений, сочетающих ядро *L. esculentum*, пластиды *L. peruvianum* var. *dentatum* и гибридные митохондрии, также возникли из-за ядерно-цитоплазматической несовместимости. И если частичная хлорофиллдефектность и ингибирование развития могли быть вызваны пластомгеномной несовмести-

мостью, то изменения морфологии цветка и МС возникли, вероятно, вследствие ядерно-митохондриального дисбаланса. С другой стороны, возникновение одновременно семи признаков аномального фенотипа, а также множественных структурно-функциональных нарушений фотосинтетического аппарата у цибрида культурного томата вследствие аллоплазматической несовместимости подтверждает наибольшую филогенетическую отдаленность между *L. esculentum* Mill. и *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. в пределах рода *Lycopersicon*. В то же время отсутствие каких-либо аллоплазматических эффектов на фенотипическом или фотосинтетическом уровне у альтернативного цибрида перуанского томата свидетельствует о генетической совместимости и эффективном взаимодействии пластомы *L. esculentum* с ядерным геномом *L. peruvianum* var. *dentatum* в присутствии рекомбинантного хондриома. Таким образом, реципрокные пластомгеномные цибриды культурного и перуанского томатов, табака и красавки следует рассматривать как ценные и уникальные модельные системы для исследований различных эффектов аллоплазматических взаимодействий.

Создание и изучение таких моделей позволит лучше понять роль ядерных, хлоропластных и митохондриальных геномов во многих фундаментальных процессах растительной клетки и растительного организма в целом, в том числе и в таких, как фотосинтез и микроспорогенез.

Несомненно, реципрокные цибриды высших растений будут представлять интерес для исследователей (биотехнологов, физиологов, генетиков, молекулярных биологов), что подтверждает 100-летняя история развития цитоплазматической генетики.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsunewaki K., Wang G. S., Matsuoka Y. Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*. I. Production of alloplasmic common wheats and their fertility // *Genes Genet. Syst.* — 1996. — V. 71, N 5. — P. 293–311.
2. Sychjova I. M., Triboush S. O., Danilenko N. G., Davydenko O. G. The collection of allo- and isoplasmic barley lines with PDRF-studied mitochondrial DNA // *Barley Genet. Newslet.* — 1998. — V. 28. — P. 9–11.
3. Renner O. Artbastarde bei Pflanzen. (Handbuch der Vererbungswissenschaft, Bd. IIA). — Berlin: Gebruder Borntraeger, 1929.
4. Renner O. Zur Kenntnis der nichtmendelnden Buntheit der Laubblätter // *Flora.* — 1936. — B. 30. — S. 218–290.
5. Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. — М.: Мир, 1975. — 423 с.
6. Даниленко Н. Г., Давыденко О. Г. Миры геномов органелл. — Минск: Тэхналогія, 2003. — 494 с.
7. Levin D. A. Nucleocytoplasmic incompatibility fosters speciation // *Plant Adaptation: Molecular Genetics and Ecology.* — Ottawa: NRC Research Press, 2004. — P. 30–37.
8. Палилова А. Н., Орлов П. А., Волуевич Е. А. Фундаментальные и прикладные проблемы взаимодействия ядерной и цитоплазматических генетических систем у растений // *Вестн. ВОГиС.* — 2005. — Т. 9, № 4. — С. 499–504.
9. Sapp J. Cytoplasmic inheritance and the struggle for authority in genetics. — N.Y.: University Press, 1987. — 282 p.

10. *Tsunewaki K.* Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops*. — Tokyo: Japan Soc. Prom. Sci., 1980. — 290 p.
11. *Levin D. A.* The cytoplasmic factor in plant speciation // *Syst. Bot.* — 2003. — V. 28, N 1. P. 5–11.
12. *Anderson W. R.* Evidence of plasmon differentiation in *Lycopersicon* // *Tomato Genet. Coop. Rep.* — 1964. — V. 14. — P. 4–6.
13. *Mutschler M. A.* Transfer of *Lycopersicon pennellii* cytoplasm into tomato (*L. esculentum*) does not create cytoplasmic male sterility // *Ibid.* — 1990. — V. 40. — P. 25–26.
14. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.* Клеточная инженерия растений. — К.: Наук. думка, 1984. — 159 с.
15. *Medgyesy P.* Selection and analysis of cytoplasmic hybrids // *Plant Cell Line Selection.* — Weinheim: VCH Publishers, 1990. — P. 287–316.
16. *Guo W. W., Cai X. D., Grosser J. W.* Somatic cell cybrids and hybrids in plant improvement / *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles.* — Berlin: Springer, 2004. — P. 635–659.
17. *Bonnett H. T., Glimelius K.* Cybrids of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* have an intergeneric mixture of chloroplasts from *P. hybrida* and mitochondria identical or similar to *N. tabacum* // *Theor. Appl. Genet.* — 1990. — V. 79, N 4. — P. 550–555.
18. *Perl A., Aviv D., Galun E.* Protoplast-fusion-derived *Solanum* cybrids: application and phylogenetic limitations // *Ibid.* — 1990. — V. 79, N 5. — P. 632–640.
19. *Perl A., Aviv D., Galun E.* Nuclear-organelle interaction in *Solanum*: Interspecific cybridizations and their correlation with a plastome dendrogram // *Mol. Gen. Genet.* — 1991. — V. 228, N 1–2. — P. 193–200.
20. *Sidorov V. A., Yevtushenko D. P., Shakhovskiy A. M., Gleba Yu. Yu.* Cybrid production based on mutagenic inactivation of protoplasts and rescuing of mutant plastids in fusion products: potato with a plastome from *S. bulbocastanum* and *S. pinnatisectum* // *Theor. Appl. Genet.* — 1994. — V. 88, N 5. — P. 525–529.
21. *Lefrancois C., Chupeau Y., Bourgin J. P.* Sexual and somatic hybridization in the genus *Lycopersicon* // *Ibid.* — 1993. — V. 86, N 5. — P. 533–546.
22. *Wolters A. M., Jacobsen E., O'Connell M. et al.* Somatic hybridization as a tool for tomato breeding // *Euphytica.* — 1994. — V. 79, N 3. — P. 265–277.
23. *Glimelius K., Bonnett H. T.* *Nicotiana* cybrids with *Petunia* chloroplasts // *Theor. Appl. Genet.* — 1986. — V. 72, N 6. — P. 794–798.
24. *Kushnir S. G., Shlumukov L. R., Pogrebnyak N. J. et al.* Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome // *Mol. Gen. Genet.* — 1987. — V. 209, N 1. — P. 159–163.
25. *Thanh N. D., Pay A., Smith M. A. et al.* Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata* // *Ibid.* — 1988. — V. 213, N 2. — P. 186–190.
26. *Thanh N. D., Medgyesy P.* Limited chloroplast gene transfer via recombination overcomes plastome-genome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum* // *Plant Mol. Biol.* — 1989. — V. 12, N 1. — P. 87–97.
27. *Сидоров В. А., Самойлов В. М., Самойлов А. М. и др.* Цибриды картофеля с цитоплазмой различных видов пасленовых // *Докл. АН СССР.* — 1989. — Т. 308, № 3. — С. 741–743.
28. *Kushnir S. G., Babiychuk E., Bannikova M. et al.* Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome // *Mol. Gen. Genet.* — 1991. — V. 225, N 2. — P. 225–230.
29. *Wolters A. M. A., Schoenmakers H. C. H., van der Meulen-Muisers J. J. M. et al.* Limited DNA elimination from the irradiated potato parent in fusion products of albino *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — V. 83, N 2. — P. 225–232.
30. *Derks F. H. M., Hakkert J. C., Verbeek W. H. J., Colijn-Hooymans C. M.* Genome composition of asymmetric hybrids in relation to the distance between the parents. Nucleus-chloroplast interaction // *Ibid.* — 1992. — V. 84, N 7–8. — P. 930–940.
31. *Melchers G., Mohri Y., Watanabe K. et al.* One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear-inactivated *Solanum* protoplasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — V. 89, N 15. — P. 6832–6836.
32. *Babiychuk E., Schantz R., Cherep N. et al.* Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in Solanaceae cybrids // *Mol. Gen. Genet.* — 1995. — V. 249, N 6. — P. 648–654.
33. *Zubko M. K., Zubko E. I., Patskovskiy Y. V. et al.* Novel 'homeotic' CMS patterns generated in *Nicotiana* via cybridization with *Hyoscyamus* and *Scopolia* // *J. Exp. Bot.* — 1996. — V. 47, N 8. — P. 1101–1110.
34. *Zubko M. K., Zubko E. I., Ruban A. V. et al.* Extensive developmental and metabolic alterations in cybrids *Nicotiana tabacum*(+*Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility // *Plant J.* — 2001. — V. 25, N 6. — P. 627–639.
35. *Zubko M. K., Zubko E. I., Gleba Y. Y.* Self-fertile cybrids *Nicotiana tabacum*(+ *Hyoscyamus aureus*) with a nucleo-plastome incompatibility // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — V. 105, N 6–7. — P. 822–828.

36. Vardi A., Bremen A., Galun E. Citrus cybrids: production by donor-recipient protoplast fusion and verification by mitochondrial DNA restriction profiles // *Ibid.* — 1987. — V. 75, N 1. — P. 51–58.
37. Vardi A., Arzee-Gonen P., Frydman-Shani A. et al. Protoplast fusion-mediated transfer of organelles from *Microcitrus* into *Citrus* and regeneration of novel alloplasmic trees // *Ibid.* — 1989. — V. 78, N 5. — P. 741–747.
38. Xu X. Y., Liu J. H., Deng X. X. Production and characterization of intergeneric diploid cybrids derived from symmetric fusion between *Microcitrus papuana* Swingle and sour orange (*Citrus aurantium*) // *Euphytica*. — 2004. — V. 136, N 2. — P. 115–123.
39. Moreira C. D., Chase C. D., Gmitter Jr. F. G., Grosser J. W. Inheritance of organelle genomes in citrus somatic cybrids // *Mol. Breed.* — 2000. — V. 6, N 4. — P. 401–405.
40. Rambaud C., Dubois J., Vasseur J. Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion // *Theor. Appl. Genet.* — 1993. — V. 87, N 3. — P. 347–352.
41. Varotto S., Nenz E., Lucchin M., Parrini P. Production of asymmetric somatic hybrid plants between *Cichorium intybus* L. and *Helianthus annuus* L. // *Ibid.* — 2001. — V. 102, N 6–7. — P. 950–956.
42. Ратушняк Я. И., Кочевенко А. С., Череп Н. Н. и др. Аллоплазматическая несовместимость у цибридных растений, обладающих геномом *Lycopersicon esculentum* Mill. и плазмагенами *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // *Генетика*. — 1995. — Т. 31, № 5. — С. 660–667.
43. Michaelis P. Cytoplasmic inheritance in *Epilobium* and its theoretical significance // *Adv. Genet.* — 1954. — V. 6. — P. 287–401.
44. Kirk J. T. O., Tilney-Bassett R. A. E. The plastids: their chemistry, structure, growth and inheritance. — Amsterdam: Elsevier, 1978. — 960 p.
45. Pearson O. H. Nature and mechanism of cytoplasmic male sterility in plants: a review // *Hort. Sci.* — 1981. — V. 16. — P. 482–487.
46. Stubbe W., Herrmann R. G. Selection and maintenance of plastome mutants and interspecific genome/plastome hybrids from *Oenothera* // *Methods in Chloroplast Molecular Biology*. — Amsterdam: Elsevier, 1982. — P. 149–165.
47. Bonnema A. B., Melzer J. M., O'Connell M. A. Tomato cybrids with mitochondrial DNA from *Lycopersicon pennellii* // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — V. 81, N 3. — P. 339–348.
48. Shikanai T., Kaneko H., Nakata S. et al. Mitochondrial genome structure of a cytoplasmic hybrid between tomato and wild potato // *Plant Cell Rep.* — 1998. — V. 17, N 11. — P. 832–836.
49. Kochevenko A., Ratushnyak Y., Kornyejev D. et al. Functional cybrid plants of *Lycopersicon peruvianum* var. 'dentatum' with chloroplasts of *Lycopersicon esculentum* // *Ibid.* — 2000. — V. 19, N 6. — P. 588–597.
50. Bonnema A. B., Castillo C., Reiter N. et al. Molecular and ultrastructural analysis of nonchromosomal variegated mutant // *Plant Physiol.* — 1995. — V. 109, N 2. — P. 385–392.
51. Bonnett H. T., Djurberg I., Fajardo M., Glimelius K. A mutation causing variegation and abnormal development in tobacco is associated with an altered mitochondrial DNA // *Plant J.* — 1993. — V. 3, N 4. — P. 519–525.
52. Schmitz-Linneweber C., Kushnir S. G., Babiychuk E. et al. Pigment deficiency in nightshade/tobacco cybrids is caused by the failure to edit the plastid ATPase α -subunit mRNA // *Plant Cell.* — 2005. — V. 17, N 6. — P. 1815–1828.
53. Самсонова И. А. Исследование мутабельности пластома. I. Характеристика пластомного мутанта томата // *Генетика*. — 1970. — Т. 6, №6. — С. 36–41.
54. Ratushnyak Y. I., Latypov S. A., Samoylov A. M. et al. Introgressive hybridization of tomatoes by 'gamma-fusion' of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. protoplasts // *Plant Sci.* — 1991. — V. 73, N 1. — P. 65–78.
55. Ratushnyak Y. I., Cherep N. N., Latypov S. A. Somatic hybridization of *Lycopersicon esculentum* Mill. + *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // YPS Bajaj (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Hybridization in Crop Improvement*, New York: Springer. — 1994. — V. 27. — P. 224–243.
56. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — V. 15, N 3. — P. 473–497.
57. Ratushnyak Y. I., Cherep N. N., Zavgorodnyaya A. V. et al. Fertile asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // *Mol. Gen. Genet.* — 1993. — V. 236, N 2–3. — P. 427–432.
58. Кочевенко А. С., Ратушняк Я. И., Корнев Д. Ю. и др. Состояние фотосинтетического аппарата у цитоплазматического гибрида культурного томата, обладающего признаками ядерно-цитоплазматической несовместимости // *Физиол. раст.* — 1999. — Т. 46, № 4. — С. 550–558.
59. Рудас В. А. Получение пластомных хлорофиллдефектных мутантов у видов семейства пасленовых // *Цитология и генетика*. — 1994. — Т. 28, № 2. — С. 42–48.
60. Кочевенко А. С., Рудас В. А., Ратушняк Я. И. Анализ природы мутации хлорофиллдефектности у *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* путем получения цитоплазматического гибрида

- чеських гібридів // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 1. — С. 62–67.
61. *Larkin P. J., Scowcroft W. R.* Somaclonal variation — a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — V. 60, N 4. — P. 197–214.
62. *Кочевенко А. С., Кучук Н. В., Ратушняк Я. И.* Обратный перенос хлоропластов как доказательство пластом-геномной несовместимости цибридных растений томата *Lycopersicon esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*). // *Вест. УОГиС.* — 2009. — Т. 7, № 1. — С. 46–57.
63. *Mackenzie S., McIntosh L.* Higher plant mitochondria // *Plant Cell.* — 1999. — V. 11, N 4. — P. 571–585.
64. *Hedtke B., Wagner I., Bornery T., Hess W. R.* Inter-organellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels // *Plant J.* — 1999. — V. 19, N 6. — P. 635–643.
65. *Bonnett H. T., Kofer W., Hekansson G., Glimelius K.* Mitochondrial involvement in petal and stamen development studied by sexual and somatic hybridization of *Nicotiana* species // *Plant Sci.* — 1991. — V. 80, N 1–2. — P. 119–130.
66. *Rick C. M.* Biosystematic studies in *Lycopersicon* and closely related species of *Solanum* / J.G. Hawkes, R.N. Lester and A.D. Skelding (eds.). *The Biology and Taxonomy of the Solanaceae.* Linnean Soc. Symposium Series №7. London: Academic Press, 1979. — P. 667–678.

ЕФЕКТИ АЛОПЛАЗМАТИЧНИХ ВЗАЄМОДІЙ У РЕЦИПРОКНИХ ЦИБРИДІВ ВИЩИХ РОСЛИН

Я. І. Ратушняк
А. С. Кочевенко

Інститут клітинної біології
і генетичної інженерії НАН України, Київ

E-mail: yakivr@yahoo.com

В огляді розглянуто методи отримання реципрокних цитоплазматичних гібридів між віддаленими таксонами квіткових рослин та різні ефекти нових ядерно-цитоплазматичних взаємодій. В усіх випадках злиття протопластів використано систему селекції цибридів, спрямовану на перенесення хлоропластів донора. З точки зору виникнення фенотипових і фотосинтетичних ознак унаслідок порушень алоплазматичних взаємодій у прямого та зворотного цибридів тютюну або культурного томата виявлено значні реципрокні відмінності. Коротко проаналізовано основні переваги та ключові досягнення алоплазматичних ліній і цитоплазматичної гібридизації вищих рослин, розглянуто роль та значення нових ліній та цибридів як унікальних модельних об'єктів генетичних, молекулярно-біологічних, фізіологічних та біотехнологічних досліджень.

Ключові слова: *Nicotiana, Atropa, Lycopersicon*, реципрокні цитоплазматичні гібриди, фенотипові й фотосинтетичні ефекти, ядерно-цитоплазматична несумісність.

EFFECTS OF ALLOPLASMIC INTERACTIONS IN THE HIGHER PLANT RECIPROCAL CYBRIDS

Y. I. Ratushnyak
A. S. Kochevenko

Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of the National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: yakivr@yahoo.com

Methods of reciprocal cytoplasmic hybrids obtaining between phylogenetically remote taxa of flowering plants and different effects of the novel nucleo-cytoplasmic interactions are discussed in the review. Cybrid selection system aimed towards chloroplasts transfer from donor was applied in all cases of protoplast fusion. In terms of phenotypic and photosynthetic characters due to disturbances of alloplasmic interactions in the direct and reverse cybrids of tobacco or cultivated tomato, essential reciprocal differences have been registered. Principal advantages and key achievements of alloplasmic lines and cytoplasmic hybrids of the higher plants which are suggested as model objects in molecular biological, genetic, physiological and biotechnological studies are also discussed in the review.

Key words: *Nicotiana, Atropa, Lycopersicon*, reciprocal cytoplasmic hybrids, phenotypic and photosynthetic effects, nucleo-cytoplasmic incompatibility.