

УДК 575.127

## **ОБРАТНЫЙ ПЕРЕНОС ХЛОРОПЛАСТОВ КАК ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ПЛАСТОМ-ГЕНОМНОЙ НЕСОВМЕСТИМОСТИ ЦИБРИДНЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА *LYCOPERSICON ESCULENTUM* (+ *L. PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM*)**

А.С. КОЧЕВЕНКО, Н.В. КУЧУК, Я.И. РАТУШНЯК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
Украина, 03680, г. Киев ДСП-22, ул. Заболотного, 148  
e-mail: yakivr@yahoo.com

*Цибрид томата *Lycopersicon esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*), сочетающий ядерный геном *L. esculentum* Mill., пластом *L. peruvianum* var. *dentatum* Dup. и гибридный хондриом, обладал несвойственным исходным родительским видам фенотипом. В частности, среди новых признаков были мраморность и светло-зеленая окраска листьев (частичная хлорофиллдефектность), а также увеличение длины вегетационного периода (угнетение развития), которые могли возникнуть вследствие ядерно-хлоропластной несовместимости. Чтобы исключить возможность появления этих признаков аномального фенотипа за счет хромосомных или пластомных мутаций, мы осуществили обратный перенос хлоропластов цибрида томата на исходный ядерный фон пластомного хлорофиллдефектного мутанта *L. peruvianum* var. *dentatum* с помощью донор-реципиентного слияния протопластов. Среди полученных зеленых регенерантов были обнаружены около двадцати клонов с ядерным геномом и пластомом *L. peruvianum* var. *dentatum*. Все полученные цибриды дикого томата *L. peruvianum* var. *dentatum* (+ *L. esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) были полностью функциональными и фертильными растениями, которые характеризовались полноценным развитием и темно-зеленой окраской листьев. Они были способны к нормальной вегетации в полевых условиях и обильно завязывали плоды с жизнеспособными семенами. Таким образом, восстановление *de novo* исходных фенотипических и функциональных признаков у цибридных растений перуанского томата с обратно перенесенными хлоропластами является прямым доказательством несовместимости ядерного генома *L. esculentum* и пластома *L. peruvianum* var. *dentatum*.*

*Ключевые слова: *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* var. *dentatum*, цибрид томата, слияние протопластов, обратный перенос хлоропластов, восстановленный фенотип, пластом-геномная несовместимость.*

**В**ведение. Индивидуальное развитие растительного организма как целостной и сбалансированной системы, сформированной в процессе эволюции, контролируется ядерным, хлоропластным и митохондриальным геномами, которые координированно взаимодействуют между собой. Нарушение этой координации вызывает разного рода аномалии как на уровне соответствующих органелл (нарушение струк-

© А.С. КОЧЕВЕНКО, Н.В. КУЧУК, Я.И. РАТУШНЯК, 2009

туры и функции), так и целых растений (изменения роста, развития и генеративной функции). Развитие сходных признаков приводит к пониженной жизнеспособности, а в отдельных случаях к летальному исходу. Вероятно, именно поэтому большинство покрытосеменных растений имеют надежную систему защиты от подобных явлений в виде однородительского (материнского) наследования плазматомов, что исключает в случае спонтанных межвидовых переопылений появление новых аллоплазматических комбинаций. Тем не менее, десятилетние усилия многих ученых в этой области исследований увенчались успехом. Благодаря разработке и развитию двух технологий по созданию новых, несочетаемых в природе комбинаций ядра и органелл, было сформировано фактически целое направление в цитоплазматической генетике — исследование ядерно-цитоплазматических взаимодействий.

Первая технология замещения ядерного генома получила название аллоплазматической или ядерно-цитоплазматической гибридизации и стала использоваться исследователями еще в 30-ые годы прошлого столетия. Она основана на замене ядерного генома одного вида на другой методом многократных насыщающих скрещиваний (не менее 7 кроссов) на фоне неизменного цитоплазмона (пластома и хондриома). Межвидовые ядерно-цитоплазматические гибриды *Oenothera*, впервые полученные Renner [1], обладали признаками хлорофиллдефектности вследствие пластом-геномной несовместимости. Начиная с 50-х годов, самые разные аллоплазматические линии были созданы между многими другими видами растений, что имело не только научный, но и

практический интерес. Так, в процессе скрещиваний и перемещений геномов одних хозяйственно важных видов в чужеродные цитоплазмы других родственных дикорастущих видов было обнаружено множество новых морфологических и адаптивных признаков, которые позже стали использовать для селекции новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур [2]. В роде *Lycopersicon* аллоплазматические гибриды с реципрокной плазмогеномной организацией получены в одной межвидовой комбинации: между томатом и *L. pennellii* [3, 4]. Однако лишь гибридные растения *L. pennellii* (x *L. esculentum*) обладали признаком цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС), по-видимому, вследствие ядерно-цитоплазматического несоответствия [3].

Вторая 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-ые годы прошлого века после разработки и развития двух экспериментальных методов — изолированных протопластов и культуры клеток и тканей растений — и была апробирована вначале на *Nicotiana* [5–7], а затем на других видах высших растений [8–10]. Цитоплазматическими гибридами (цибридами) стали называть соматические гибриды, которые унаследовали ядерный геном одного из родителей, а цитоплазмону либо обоих родителей, либо альтернативно одного родителя. Технология цибридизации позволяет решать две фундаментальные задачи. Во-первых, преодолевать барьеры половой несовместимости между филогенетически отдаленными таксонами. Во-вторых, реконст-

руировать как цитоплазматические геномы путем межвидовой перестройки или рекомбинации хлоропластной и митохондриальной ДНК [11], так и качественный состав самих органелл в цитоплазме путем переноса в растительную клетку хлоропластов от одного вида, а митохондрий от другого [12–15]. В большинстве случаев межвидовые, межродовые и межтрибные цибриды были жизнеспособными и фертильными растениями [11, 16]. В противоположность цибридам собственно ядерные соматические гибриды, особенно в первых публикациях, характеризовались если не морфологической ненормальностью, то уж точно неспособностью завязывать жизнеспособные семена. Позднее исследователи стали получать и цибридные растения с новыми фенотипическими и функциональными признаками (ненормальная пигментация листьев, ЦМС, изменения в морфологии цветков, задержка роста и развития), которые проявлялись из-за нарушений ядерно-цитоплазматических взаимодействий [13, 14, 17–20]. В других публикациях попытки получения цибридов между филогенетически отдаленными видами были неудачными из-за барьера аллоплазматической несовместимости [21–23]. Тем не менее, Thanh and Medgyesy [24] сообщили о преодолении пластом-геномной несовместимости через рекомбинацию хлоропластной ДНК, получив единственное цибридное растение *Nicotiana tabacum*(+ *Solanum tuberosum*). Но особый интерес здесь представляют отдаленные цитоплазматические гибриды с реципрокной пластом-геномной организацией, в частности межтрибные цибриды между *N. tabacum* и *Atropa belladonna*. Если цибридные растения с ядром табака и хлоропластами красавки

были функциональными (зелеными и фертильными) [25], то цибриды с обратной аллоплазматической организацией *A. belladonna*(+ *N. tabacum*) оказались полностью хлорофиллдефектными вследствие ядерно-хлоропластной несовместимости [17]. Сходные результаты были получены нами при создании реципрокных цибридов в роде *Lycopersicon*. Так, цитоплазматические гибриды перуанского томата *L. peruvianum* var. *dentatum* (+ *L. esculentum*) с хлоропластами томата и гибридными митохондриями были полностью функциональными и фертильными [26]. Напротив, цибридные растения томата с пластомом дикого вида и рекомбинантным хондриомом обладали аномальными морфологическими и функциональными признаками, которые могли быть вызваны как ядерно-хлоропластной несовместимостью (частичная хлорофиллдефектность, ингибирование развития), так и нарушениями ядерно-митохондриальных взаимодействий (мужская стерильность и гетеростильность пестика) [18].

В настоящей работе мы осуществили обратный перенос хлоропластов *L. peruvianum* var. *dentatum* из цибрида томата *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) на исходное совместимое ядро дикого вида, используя технику донор-реципиентного слияния протопластов. Целью обратного переноса было исследование причины возникновения аномальных признаков у цибрида томата: частичной хлорофиллдефектности и ингибирования развития. Полученные цибридные растения дикого томата *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) с пластидами донорного вида восстанавливали темно-зеленую окраску листьев и пол-

ноценное развитие, что служит прямым доказательством несовместимости ядерного генома томата и пластома дикого вида.

### Материалы и методы

**Растительный материал.** 1. Дикий тип перуанского томата *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. линии 3767 ( $2n=2x=24$ ). Имеет индетерминантный тип роста, рассеченные листовые доли и зеленые, очень мелкие плоды. Семена любезно предоставлены А.Жученко и Н.Бочарниковой (Ин-т генетики, Кишинев, Молдова). 2. Пластомный хлорофиллдефектный мутант *albina* Lp3–*alb* дикого томата *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. линии 3767 ( $2n=2x=24$ , реципиент хлоропластов) [27, 28]. 3. Дикий тип томата *L. esculentum* Mill. ( $2n=2x=24$ ) сорта Quedlinburger Fruhe Liebe. Имеет картофельную форму листа (мутация *s*, 6-я хромосома), индетерминантный тип роста и красные мелкие плоды. Семена получены от Х.Леманна (Ин-т генетики растений, Гатерслебен, Германия). 4. Пластомный хлорофиллдефектный мутант *Pl-alb* 1 томата *L. esculentum* Mill. сорта Fruhe Liebe ( $2n=2x=24$ ) [29]. Имеет те же основные морфологические характеристики, что и сорт Quedlinburger Fruhe Liebe. Семена любезно предоставлены Т.Гавриленко (ВНИИ растениеводства им. Н.Вавилова, Санкт-Петербург, Россия). 5. Цитоплазматический гибрид томата *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона 1С, обладающий ядром *L. esculentum* Mill. сорта Fruhe Liebe, пластидами *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. линии 3767 и гибридными митохондриями ( $2n=2x=24$ , донор хлоропластов) [18, 30]. Имеет морфологию томата, а также ряд аномальных фенотипических признаков: частичную хлоро-

филлдефектность (мраморность и светло-зеленая окраска листьев), ингибирование роста и развития (карликовость и увеличение длины вегетационного периода), мужскую стерильность и гетеростильность пестика.

**Слияние и культивирование протопластов.** Стерилизацию семян, выращивание и размножение асептических растений, выделение и слияние протопластов, селекцию гибридных каллусов и регенерацию растений осуществляли, как описано Ratushnyak et al. [30]. Культивирование протопластов проводили согласно Кочевенко и др. [26]. Протопласты цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) перед слиянием инактивировали  $\gamma$ -облучением в дозе 1000 Гр ( $^{60}\text{Co}$ , 100 Гр/мин).

**Морфология, фертильность и количество хромосом.** Морфологическую оценку куста, листьев, соцветий, цветков и плодов цибридов *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)), томата сорта Quedlinburger Fruhe Liebe и перуанского томата линии 3767 проводили в условиях открытого и закрытого грунта, а привоев цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) — в условиях теплицы. Фертильность цибридов определяли по двум критериям: (1) мужская фертильность основывалась на способности к окрашиванию и прорастанию пыльцы как описано Ратушняк и др. [18]; женская фертильность основывалась на способности к возвратным скрещиваниям цибридов с *L. peruvianum* var. *dentatum* (линии 3667) как опылителем и завязыванию плодов с жизнеспособными семенами. Подсчет митотических хромосом проводили согласно Ратушняк и др. [30].

**Изоферменты.** Белки экстрагировали из листьев асептических расте-

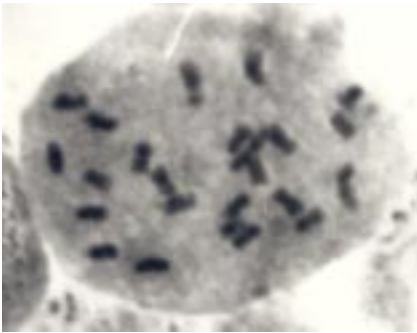
ний в буферном растворе, содержащем 0,05М трис, 0.01М β-меркаптоэтанол и 12% глицерина (рН=7,5). Электрофоретическое фракционирование белков проводили в 10% полиакриламидном геле, используя в качестве электродного вероналовый буфер. Множественные молекулярные формы ферментов (ММФФ) эстеразы и пероксидазы выявляли согласно Бровер [31].

*Хлоропластная ДНК.* Хлоропластную ДНК (хлДНК) выделяли из листьев асептических растений согласно Букжанс и др. [32] и обрабатывали рестриктазой *EcoRI*. Полученные рестриктивные фрагменты ДНК разделяли в 1% агарозном геле.

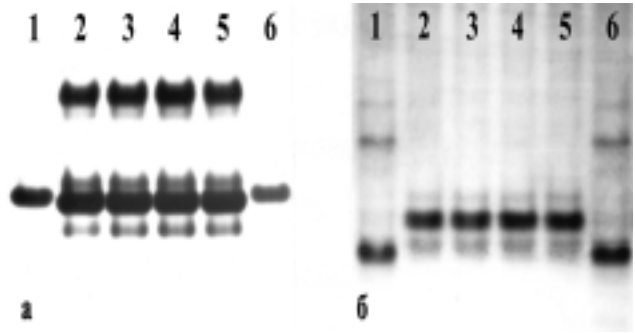
### Результаты и обсуждение

В предыдущих публикациях мы сообщали вначале о получении [30], а затем и об ядерно-цитоплазматической несовместимости [18] первого цитоплазматического гибрида томата в роде *Lycopersicon*. Единственное цибридное растение *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона 1С, обладающее ядром *L. esculentum*, хлоропластами *L. peruvianum* var. *dentatum* и гибридными митохондриями, было обнаружено среди 73 ядерных соматических гибридов, полученных в 17 экспериментах по слиянию протопластов между наиболее отдаленными представителями *Lycopersicon* [30, 33]. При комплексном изучении морфологии и фертильности у растений клона 1С было обнаружено семь аномальных признаков, несвойственных исходным родительским видам: (1) мраморность и (2) светло-зеленая окраска листьев (определены нами как частичная хлорофиллдефектность), (3) увеличение длины вегетационного периода и (4) карликовость (определены нами как

ингибирование развития и роста, соответственно, и только с помощью прививки в теплице мы получали растения, способные к полноценной вегетации), (5) неспособность произрастать в открытом грунте (100% летальность), (6) мужская стерильность (из 100 плодов, полученных после самоопыления, только 5 имели жизнеспособные семена) и (7) гетеростильность пестика (у 10% соцветий пестик был выше тычиночной колонки у всех цветков даже на стадии бутона) [18]. Если первые три признака можно было отнести на счет ядерно-хлоропластной несовместимости, то два последних могли возникнуть из-за нарушений ядерно-митохондриальных взаимодействий. В пользу таких утверждений нами ранее были приведены четыре довода, исходя из анализа результатов, как наших собственных исследований, так и сообщений других ученых [18]. Тем не менее, все эти доводы являлись лишь косвенным доказательством пластом-геномной несовместимости цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*). Прямым доказательством несовместимости мог бы стать обратный перенос хлоропластов перуанского томата из цибрида на совместимый родительский ядерный геном и как результат полное восстановление функциональности и нормальной морфологии цибридных растений *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)). Необходимо отметить, что среди всех работ, в которых авторы сообщали о получении цибридов с ядерно-цитоплазматической несовместимостью [17–20], только в одной был проведен обратный перенос хлоропластов как неоспоримое доказательство пластом-геномной несовместимости [17].



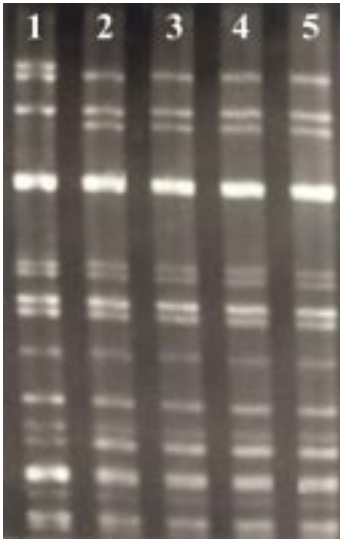
**Рис. 1.** Метафазная пластинка цитоплазматического гибрида *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) клона К1С ( $2n=2x=24$ ), полученного после обратного переноса хлоропластов цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) на ядерный фон *L. peruvianum* var. *dentatum*



**Рис. 2.** Спектры множественных молекулярных форм пероксидазы (а) и эстеразы (б) цитоплазматического гибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона 1С (1), цибридов *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) клонов К1С, К1К и Л1А (2, 3 и 4, соответственно), пластомного хлорофиллдефектного мутанта *Lp3-alb L. peruvianum* var. *dentatum* линии 3767 (5) и пластомного хлорофиллдефектного мутанта *Pl-alb 1 L. esculentum* сорта Фрöhe Liebe (6)

**Таблица.** Некоторые морфологические признаки *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* var. *dentatum* и цитоплазматических гибридов *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) и *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*))

Генотип	Стебель		Лист		Цветок		Плод	
	высота (см)	опушенность	тип поверхности	окраска	опушенность чашелистиков	положение пестика	масса (г)	окраска
<i>L. esculentum</i> , сорт Quedlinburger Frühe Liebe	очень высокий (160)	густо опушенный	сильно гофрированный	темно-зеленый	густо опушенные	короче тычинок	мелкий (30)	красный
<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> , линия 3767	очень высокий (180)	не опушенный	гладкий	темно-зеленый	не опушенные	выше тычинок	очень мелкий (2-4)	светло-зеленый
Цибрид <i>L. esculentum</i> (+ <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> ), клон 1С	очень высокий (160)	густо опушенный	сильно гофрированный	светло-зеленый	густо опушенные	короче или выше тычинок	мелкий (22)	красный
Цибрид <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> (+ <i>L. esculentum</i> (+ <i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> )), клон К1С	очень высокий (160)	не опушенный	гладкий	темно-зеленый	не опушенные	выше тычинок	очень мелкий (2-4)	светло-зеленый



**Рис. 3.** Рестриктивные спектры хлДНК (*EcoRI*) *L. esculentum* сорта Quedlinburger Frühe Liebe (1), цибридов *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) клонов К1С и К1К (2 и 3, соответственно), цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона 1С (4) и *L. peruvianum* var. *dentatum* линии 3767 (5)



**Рис. 4.** Восстановление нормального роста и развития у цитоплазматического гибрида *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) клона К1С, полученного после обратного переноса хлоропластов цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) на ядерный фон *L. peruvianum* var. *dentatum*: 1 — *L. peruvianum* var. *dentatum* линии 3767; 2 — цибрид *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) клона 1С; 3 — цибрид *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) клона К1С; 4 — *L. esculentum* сорта Quedlinburger Frühe Liebe. Все растения 50-дневного возраста

Для осуществления обратного переноса хлоропластов и получения растений заданной аллоплазматической конституции путем соматической цибридизации у нас были все необходимые предпосылки. Во-первых, мы имели в своем распоряжении пластомный хлорофиллдефектный мутант *L. peruvianum* var. *dentatum* [28], который могли использовать в качестве реципиента хлоропластов перуанского томата цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*). Во-вторых, раньше в нашей лаборатории были отработаны эффективные методики донор-реципиентного слияния протопластов и регенерации цибридных растений для видов рода *Lycopersicon* [18, 26, 28].

Хотя и известны сообщения о получении цибридов без использования селективного давления [34], мы применили  $\gamma$ -облучение мезофильных протопластов цибрида-донора *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) для целенаправленной элиминации его ядерного генома. Отбор продуктов слияния основывался на способности гибридных колоний к позеленению. Именно такая схема селекции, направленная на перенос хлоропластов донорного вида, наиболее подходит для продуцирования цитоплазматических гибридов в роде *Lycopersicon* [18, 23, 26, 28]. Предварительный скрининг растений-регенерантов, сочетающих пластом *L. peruvianum* var. *dentatum* от

цибрида 1С и ядро перуанского томата, осуществляли с помощью цитогенетического анализа: вели поиск кариотипов с числом хромосом  $2n=2x=24$  (рис. 1). Определение природы унаследованного ядерного генома у всех диплоидных кариотипов проводили путём анализа морфологических признаков и изоферментных спектров эстеразы и пероксидазы. Все изученные диплоидные клоны содержали только видоспецифичные полосы изозимов от *L. peruvianum* var. *dentatum* (рис. 2, а, б). К тому же эти растения имели морфологию перуанского томата и были фертильными (табл.). Таким образом, результаты цитогенетического, изоферментного и морфологического анализов свидетельствовали, что диплоидные регенеранты обладают ядром *L. peruvianum* var. *dentatum* и полностью функциональны. В свою очередь, рестриктивный анализ хлДНК показал, что растения этих клонов унаследовали пластом *L. peruvianum* var. *dentatum* (рис. 3) и, подтвердил успешный обратный перенос хлоропластов цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) на исходный ядерный фон перуанского томата. Цибридные растения *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)), полученные вследствие обратного переноса хлоропластов, полностью восстанавливали нормальный рост и развитие (рис. 4), темно-зеленую окраску листьев, и мужскую фертильность, а также в отличие от цибрида томата были способны произрастать в открытом грунте. К тому же у них отсутствовал признак карликовости, но взамен было отмечено незначительное отставание в росте и крайне редкое засыхание отдельных побегов.

Нарушение пластид-митохондриальных коммуникаций вследствие пере-

стройки межорганельных биохимических и молекулярных взаимодействий [35], как и способность межорганельного влияния пластид на генетический аппарат митохондрий [36], на фенотипическом уровне могут приводить к возникновению таких функциональных признаков как карликовость, вытягивания и скручивание листа, ветвление стебля [19]. Исходя из этого можно предположить, что новые 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 *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*), могли быть связаны с рекомбинацией митохондриальной ДНК и/или пластом-хондриомной несовместимостью. С другой стороны, несмотря на восстановление мужской фертильности и отсутствие каких-либо изменений в морфологии цветка у всех полученных клонов цибрида перуанского томата, здесь нельзя исключать остаточного эффекта ядерно-митохондриального несоответствия вследствие как первичной, так и, возможно, вторичной рекомбинации в митохондриальном геноме после двух циклов слияния протопластов. Тем не менее, обсуждать эту проблему здесь крайне сложно и некорректно, поскольку, во-первых, она требует отдельного скрупулезного анализа хондриома у цибридных клонов *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)), а, во-вторых, в настоящей работе их митохондриальный геном вообще не изучали.

### Выводы

Итак, цибридные растения *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+



*L. peruvianum* var. *dentatum*)), полученные вследствие обратного переноса хлоропластов, почти полностью восстанавливали все аномальные морфологические и функциональные признаки. То есть, было доказано, что, по крайней мере, часть признаков измененного фенотипа цибрида *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*), которые могли быть вызваны нарушениями ядерно-хлоропластных взаимодействий, а именно, частичная хлорофиллдефектность и ингибирование развития полностью исчезали, когда в экспериментах по слиянию протопластов пластом этого цибрида возвращали к исходному родительскому ядерному геному. Таким образом, теперь уже с полной уверенностью можно утверждать, что эти признаки не были следствием ядерных и/или хлоропластных мутаций, а обусловлены пластом-геномной несовместимостью.

### Список литературы

1. Renner O. Zur kenntnis der nichtmen-delnden Buntheit der Laubblätter // Flora Jena. — 1936. — В. 30. —S. 218–290.
2. Палилова А.Н., Орлов П.А., Волуевич Е.А. Фундаментальные и прикладные проблемы взаимодействия ядерной и цитоплазматических генетических систем у растений // Вестник ВОГиС. — 2005. — Т.9, №4. — С. 499–504.
3. Anderson W.R. Evidence of plasmon differentiation in *Lycopersicon* // Rep. Tomato Genet. Coop. —1964. — Vol. 14. — P. 4–6.
4. Mutschler M.A. Transfer of *Lycopersicon pennellii* cytoplasm into tomato (*L. esculentum*) does not create cytoplasmic male sterility // Rep. Tomato Genet. Coop. — 1990. — Vol. 40. — P. 25–26.
5. Carlson P.S., Smith H.H., Dearing R.D. Parasexual plant hybridization // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. —1972. — Vol. 69, № 8. — P. 2292–2294.
6. Melchers G., Labib G. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts. I. Selection of light resistant hybrids of “haploid” light sensitive varieties of tobacco // Mol. Gen. Genet. — 1974. — Vol. 135. — P. 277–294.
7. Глеба Ю.Ю., Бутенко Р.Г., Сытник К.М. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация *Nicotiana tabacum* L. // Докл. АН СССР. — 1975. — Т. 221, № 5. — С. 1196–1198.
8. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. — Киев: Наук. думка, 1984. — 159 с.
9. Gleba Y.Y., Shlumukov L.R. Selection of somatic hybrids // Plant Cell Line Selection. — New York: VCH Verlagsgesellschaft, 1990. — P. 257–286.
10. Liu J., Xu X., Deng X. Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 2005. — Vol. 82, № 1. — P. 19–44.
11. Medgyesy P. Selection and analysis of cytoplasmic hybrids // Plant Cell Line Selection. — Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1990. — P. 287–316.
12. 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. — Vol. 79, № 4. — P. 550–555.
13. Perl A., Aviv D., Galun E. Protoplast-fusion-derived *Solanum* cybrids: application and phylogenetic limitations // Theor. Appl. Genet. — 1990. — Vol. 79, № 5. — P. 632–640.
14. Perl A., Aviv D., Galun E. Nuclear-organelle interaction in *Solanum*: interspecific cybridizations and their correlation with a plastome dendrogram // Mol. Gen. Genet. — 1991. — Vol. 228, № 1–2. — P. 193–200.
15. 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. — Vol. 88, № 5. — P. 525–529.
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-Verlag, 2004 — P. 635–659
  17. Kushnir S.G., Babychuk E., Bannikova M. et al. Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome // Mol. Gen. Genet. — 1991. — Vol. 225, № 2. — P. 225–230.
  18. Ратушняк Я.И., Кочевенко А.С., Череп Н.Н и др. Аллоплазматическая несовместимость у гибридных растений, обладающих геномом *Lycopersicon esculentum* Mill. и плазмагенами *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Генетика –1995. — Т. 31, № 3. — С. 660–667.
  19. 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. — Vol. 25, № 6. — P. 627–639.
  20. 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. — Vol. 105, № 6–7. — P. 822–828.
  21. Thanh N.D., Pay A., Smith M.A. et al. Intertribal chloroplast transfer by protoplast fusion between *Nicotiana tabacum* and *Salpiglossis sinuata* // Mol. Gen. Genet. — 1988. — Vol. 213, № 2. — P. 86–190.
  22. 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.
  23. Derks F.H.M., Hakkert J.C., Verbeek W.H.J., Colijn-Ноуmans С.М. Genome composition of asymmetric hybrids in relation to the phylogenetic distance between the parents. Nucleus-chloroplast interaction // Theor. Appl. Genet. — 1992. — Vol. 84, № 7–8. — P. 930–940.
  24. 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, № 1. — P. 87–97.
  25. Kushnir S.G., Schlumukov L.R., Pogrebnyak N.J. et al. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plastome // Mol. Gen. Genet. — 1987. — Vol. 209, № 1. — P. 159–163.
  26. Kochevenko A., Ratushnyak Y., Korniyev D. et al. Functional cybrid plants of *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* with chloroplasts of *Lycopersicon esculentum* // Plant Cell Rep. — 2000. — Vol. 19, № 6. — P. 588–597.
  27. Рудас В.А. Получение пластомных хлорофиллдефектных мутантов у видов семейства пасленовых // Цитология и генетика. — 1994. — Т. 28, № 2. — С. 42–48.
  28. Кочевенко А.С., Рудас В.А., Ратушняк Я.И. Анализ природы мутации хлорофиллдефектности у *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* путем получения цитоплазматических гибридов // Генетика. — 1999. — Т. 35, № 1. — С. 62–67.
  29. Самсонова И.А. Исследование мутабельности пластома. I. Характеристика пластомного мутанта томата // Генетика. — 1970. — Т. 6, № 6. — С. 36–41.
  30. Ratushnyak Y.I., Latypov S.A., Samoylov A.M. et al. Introgressive hybridization of tomatoes by “gamma-fusion” of the *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. protoplasts // Plant Sci. — 1991. — Vol. 73, № 1. — P. 65–78.
  31. Brewer G.J. An introduction to isozyme techniques. New York: Academic Press, 1970. — 230 p.
  32. Bookjans G., Stummann B.M., Henningesen K.W. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength // Anal. Biochem. — 1984. — Vol. 141, № 1. — P. 244–247.

33. 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. — Vol. 236, № 2–3. — P. 427–432.
34. Глеба Ю.Ю., Пивень Н.М., Комарницький І.К., Сытник К.М. Парасексуальные цитоплазматические гибриды (цибриды) *Nicotiana tabacum* + *N. debnei*, полученные слиянием протопластов // Докл. АН СССР. — 1978. — Т. 240, № 5. — С. 1223–1226.
35. Mackenzie S., McIntosh L. Higher plant mitochondria // Plant Cell — 1999. — V. 11, № 4 — P. 571–586
36. Hedtke B., Wagner I., Burner T., Hess W.R. Interorganellar crosstalk in higher plants: impaired chloroplast development affects mitochondrial gene and transcript levels // Plant J. — 1999 — Vol. 19, № 6. — P. 635–643.

Представлена В.А. Кунахом  
Поступила 22.01.2009

ЗВОРОТНИЙ ПЕРЕНОС ХЛОРОПЛАСТІВ  
ЯК ДОКАЗ ПЛАСТОМ-ГЕНОМНОЇ  
НЕСУМІСНОСТІ ЦИБРИДНИХ РОСЛИН  
ТОМАТА *LYCOPERSICON ESCULENTUM*  
(+ *L. PERUVIANUM* VAR. *DENTATUM*)

А.С. Кочевенко, М.В. Кучук, Я.І. Ратушняк

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, м. Київ ДСП-22, 03680, вул. Заболотного, 148 e-mail: yakivr@yahoo.com

Цибрид томата *Lycopersicon esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*), що поєднував ядерний геном *L. esculentum* Mill., пластом *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. і гібридний хондріом, мав невластивий вихідним батьківським видам фенотип. Зокрема, серед нових ознак були мармуровість і світло-зелене забарвлення листків (часткова хлорофілдефектність), а також збільшення тривалості вегетаційного періоду

(пригнічення розвитку), які могли виникнути внаслідок ядерно-хлоропластної несумісності. Щоб унеможливити появу цих ознак аномального фенотипу за рахунок хромосомних чи цитоплазматичних мутацій, було здійснено зворотний перенос хлоропластів цибрида томата на вихідний ядерний фон пластомного хлорофілдефектного мутанта *L. peruvianum* var. *dentatum* шляхом донор-реципієнтного злиття протопластів. Серед отриманих зелених регенерантів було відібрано близько двадцяти клонів з ядерним геномом і пластомом *L. peruvianum* var. *dentatum*. Усі отримані цибридні рослини дикого томата *L. peruvianum* var. *dentatum* (+ *L. esculentum* (+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) виявилися повністю функціональними і фертильними та характеризувалися повноцінним розвитком і темно-зеленим забарвленням листків. Вони були здатні до нормальної вегетації в польових умовах і рясно зав'язували плоди з життєздатним насінням. Таким чином, відновлення *de novo* вихідних фенотипових і функціональних ознак у цибридних рослин перуанського томата зі зворотного перенесеними хлоропластами є прямим доказом несумісності ядерного геному *L. esculentum* і пластоми *L. peruvianum* var. *dentatum*.

Ключові слова: *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* var. *dentatum*, цибрид томата, злиття протопластів, зворотній перенос хлоропластів, відновлений фенотип, пластом-геномна несумісність.

CHLOROPLAST RE-TRANSFER AS  
AN EVIDENCE OF PLASTOME-GENOME  
INCOMPATIBILITY IN *LYCOPERSICON*  
*ESCULENTUM* (+ *L. PERUVIANUM* VAR.  
*DENTATUM*) TOMATO CYBRID PLANTS

A.S. Kochevenko, N.V. Kuchuk,  
Ya.I. Ratushnyak

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Zabolotnogo str., 148, 03680; Kiev DSP-22, Ukraine e-mail: yakivr@yahoo.com

Morphology of the *Lycopersicon esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) cybrid plants possessing *L. esculentum* Mill. nuclear genome, *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. plastome and hybrid chondriome differed from such of initial parental species. Partial chlorophyll deficiency as well as inhibition of growth and development were observed among the new traits, which could arise from the nucleo-chloroplast incompatibility. In order to reject appearance of abnormal phenotype as a consequence of chromosome or plastome mutations wild species chloroplasts were transferred from the cybrid to an initial nuclear background of *L. peruvianum* var. *dentatum* by "donor-recipient" protoplast fusion. As a result, five plant clones containing

*L. peruvianum* var. *dentatum* nuclear genome and plastome were found among the regenerants obtained. These *L. peruvianum* var. *dentatum*(+ *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*)) five cybrids were fully functional and fertile plants with normal growth, development and dark-green leaves. Thus restoration of normal phenotype in cybrid plants after back transfer of chloroplasts is direct evidence of plastome-genome incompatibility in *L. esculentum*(+ *L. peruvianum* var. *dentatum*) cybrid.

Keywords: *Lycopersicon esculentum*, *L. peruvianum* var. *dentatum*, tomato cybrid, protoplast fusion, chloroplast re-transfer, restored phenotype, plastome-genome incompatibility.