

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису

УДК 575.13.133

ЗАВГОРОДНЯ Ганна Валентинівна

АНАЛІЗ ЯДЕРНИХ ТА ЦИТОПЛАЗМАТИЧНИХ ГЕНОМІВ У  
АСИМЕТРИЧНИХ СОМАТИЧНИХ ГІБРИДІВ І ЇХ СТАТЕВИХ ПОКОЛІНЬ  
В РОДІ LYCOPERSICON

03.00.25. - клітинна біологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1995



00756314 (Q)

AB 31.829

... у відділі цитофізіології та клітинної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Науковий керівник - академік НАН України, доктор біологічних наук, професор ГЛЕБА Ю.Ю.

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук, професор ХРАПУНОВ С.М.

доктор біологічних наук, професор КУНАХ В.А.

Провідна організація - Інститут фізіології рослин НАН України

Захист відбудеться "28" травня 1995 р. о 10 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.19.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

Автореферат разіслано "27" січня 1995 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук

Л. В. Малишева

**Актуальність проблеми.** Багато корисних ознак сільськогосподарсько важливих овочевих культур визначаються не лише ядерними, але і цитоплазматичними геномами. Та не завжди вдається домогтися поліпшення цих культур за допомогою традиційних методів селекції. Зокрема, існують певні обмеження при схрещуванні культурного томату з дикими видами роду *Lycopersicon*. Це обумовлено, по-перше, односторонньою сумісністю культурного томату при схрещуванні з більшістю диких видів томату, тобто коли *L. esculentum* використовується в якості материнської форми і, по-друге, одnobатьківським, материнським успадкуванням цитоплазматичних генів при статевій гібридизації. Використання в селекційному процесі різноманітних диких видів томату шляхом соматичної гібридизації, для якої характерне двобатьківське успадкування плазмагенів, відкриває можливості використання корисних ознак, що кодується цитоплазматичними геномами цих видів.

В 1991 році в Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України були вперше отримані високофункціональні (фертильні) асиметричні соматичні гібриди з продуктів злиття мезофільних протопластів пластомного хлорофілдефектного мутанту *L. esculentum* Mill. та інактивованих гама-променями мезофільних протопластів дикого виду *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. (Ratushnyak et al., 1991). Після самозапилення асиметричних гібридів були отримані рослини  $F_1$  та  $F_2$ . До цього часу відомо лише декілька робіт по отриманню фертильних соматичних гібридів в роді *Lycopersicon* (Wijbrandi et al., 1990; Sacata and Monna, 1993). Однак, по-перше, ці гібриди були симетричними, а по-друге, у них та їх статевого покоління  $F_1$  дослідники аналізували в основному лише ядерний геном. Тому після

отримання фертильних асиметричних гібридів *L. esculentum* + *L. peruvianum* var. *dentatum* було доцільно прослідкувати характер успадкування ядерних та цитоплазматичних геномів рослинами статевих поколінь за допомогою молекулярно-генетичного аналізу. Оскільки публікації по такому молекулярно-генетичному вивченню асиметричних соматичних гібридів та їх статевих поколінь відсутні, проведення таких досліджень було цікавим і актуальним.

**Мета та задачі дослідження.** В зв'язку з вищесказаним, метою цієї роботи було проведення молекулярно-генетичного аналізу фертильних асиметричних соматичних гібридів *L. esculentum* Mill. + *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun., зокрема, вивчення долі ядерних та цитоплазматичних генетичних детермінант на протязі двох статевих генерацій.

Необхідно було вирішити такі задачі:

1. Вивчити та порівняти характер успадкування ядерного генетичного матеріалу у асиметричних гібридів та їх статевого покоління  $F_1$  за допомогою аналізу множинних молекулярних форм ферментів.

2. Дослідити успадкування генів рибосомальної РНК соматичними гібридами та рослинами двох статевих поколінь за допомогою блот-гібридизації яДНК з фрагментом 25S рДНК.

3. Вивчити характер сегрегації батьківських пластомів у асиметричних соматичних гібридів.

4. Простежити успадкування мітохондріальної ДНК у соматичних гібридів та статевого покоління, отриманого після самозапилення.

**Наукова новизна та практична цінність.**

Вперше для соматичних гібридів в роді *Lycopersicon* ви-

явлено перебудови в хлоропластному геномі, що свідчить про можливість маніпулювання ним.

Вперше для соматичних гібридів простежено успадкування мтДНК в двох статевих поколіннях.

Доведено стабільне успадкування цитоплазматичних геномів, змінених у асиметричних соматичних гібридів, в двох статевих поколіннях.

Вперше проведено комплексне молекулярно-генетичне дослідження фертильних асиметричних соматичних гібридів *L. esculentum* + *L. peruvianum* var. *dentatum* та їх двох статевих генерацій.

Результати досліджень можуть бути використані в подальших селекційних програмах томату.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на Міжнародному симпозиумі по протопластах (Упсала, Швеція, 1991), 1-ому Всесоюзному симпозиумі "Нові методи біотехнології рослин" (Пушино, 1991), 4-ій Всесоюзній конференції "Екологічна генетика рослин, тварин, людини" (Кишинів, 1991), конференції молодих вчених "Актуальні проблеми фізіології рослин та генетики" (Київ, 1992), Російському симпозиумі "Нові методи біотехнології рослин" (Пушино, Росія, 1993), 2-му з'їзді Українського товариства фізіологів рослин (Київ, 1993), Міжнародному генетичному конгресі (Бірінгем, Англія, 1993), Міжнародному конгресі по культурі тканин та клітин рослин (Флоренція, Італія, 1994), 4-му Міжнародному конгресі по молекулярній біології рослин (Амстердам, Нідерланди, 1994), Міжнародному симпозиумі по біотехнології та генетичній інженерії рослин (Київ, Україна, 1994).

**Публікації.** По матеріалам дисертації опубліковано та

прийнято до друку 17 робіт.

Автор висловлює глибоку вдячність науковому співробітнику Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України М.Н.Черепу за приємну і плідну співпрацю та допомогу, надану при підготовці роботи, а також науковим співробітникам того ж інституту Ратушняку Я.І. та Рудасу В.А.

**Структура та об'єм роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, експериментальної частини та обговорення, заключення, висновків та списку літератури, який містить 262 найменувань. Робота викладена на 145 сторінках машинопису та містить 10 рисунків та одну таблицю.

#### Матеріали і методи.

##### Характеристика рослинного матеріалу та зондів.

Асиметричні соматичні гібриди *Lycopersicon esculentum* Mill. (сорт Fruhe Liebe) + *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. (лінія 3772): клони 1D-4D, 7D, 8D та 11D-13D (Ratushnyak et al., 1991; Ratushnyak et al., 1993). 2. Статеве покоління  $F_1$  та  $F_2$ , отримане після самозапилення гібридів. 3. Пластомний хлорофілдефектний мутант Pl-alb 1 *L. esculentum* Mill. сорту Fruhe Liebe (реципієнт  $2n=2x=24$ ) (Самсонова, 1970). Насіння було люб'язно надіслано Т.А. Гавриленко (ВНДІ рослинництва ім. М.І. Вавилова, Санкт-Петербург, Росія). 4. Дикий тип культурного томата *L. esculentum* Mill. ( $2n=2x=24$ ) сорту Quedlinburger Fruhe Liebe. Насіння отримане від доктора Х.Леманна (Ін-т генетики, Гатерслебен, Німеччина). 5. Дикий вид томату *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. лінія 3772 (донор,  $2n=2x=24$ ). Насіння було люб'язно надано А.А.Жученко і Н.Ф.Бочарниковою (Ін-т генетики, Кишинів, Молдова).

В роботі в якості зондів для гібридизації ДНК були використані такі послідовності ДНК: 1. Фрагмент гену 25S рРНК із *Citrus limon* (Колоша, Фодор, 1986). 2. Послідовність першої субодиниці цитохромоксидази *coxI* (Hiesel et al., 1987). 3. Послідовність другої субодиниці цитохромоксидази *coxII* (Hiesel and Brennicke, 1983). 4. Послідовність третьої субодиниці цитохромоксидази *coxIII* (Hiesel et al., 1987). 5. Послідовність апоцитохрому *b* (*cob*) (Schuster and Brennicke, 1985). 6. Послідовність 18S + 5S + 5'nd5 (Brennicke et al., 1985). 7. Послідовність субодиниці АТФ-ази 9 (Schuster and Brennicke, 1987).

#### Аналіз множинних молекулярних форм ферментів (ММФФ).

Листя 2-3-тижневих рослин гомогенізували в буферному розчині для вилучення білків, який містив 0,05 М Трис-НСl, 0,2% меркаптоетанол (рН=7,5) у співвідношенні 1:3 рослинного матеріалу та буферу. Гомогенат центрифугували протягом 30 хв. при 40000g. Після цього супернатант відбирали і переносили в чисту пробірку. Електрофоретичне розділення білків проводили в 7,5% чи 10% поліакриламідному гелі. В якості електродної буферної системи використовували розчин вероналу (0,56%) і Трису (0,1%). Виявлення активності естерази, малатдегідрогенази, пероксидази, кислій фосфатази здійснювали згідно Brewer (1970).

#### Виділення хлоропластної, мітохондріальної та ядерної ДНК (хл-, мт- та ядДНК).

ДНК з хлоропластів, мітохондрій і ядер виділяли згідно раніше описаних методик (Wilson and Chourey, 1984; Bookjans et al., 1984) з незначними модифікаціями.

Рестрикцію ДНК проводили згідно рекомендацій постачальників ферментів (НПО "Фермент", м. Вільнюс, Литва) протягом 8 год при 37° С з надлишком ферменту.

Рестриктні фрагменти ДНК розділяли методом електрофорезу в горизонтальних 0,6-0,8% агарозних гелях розміром 20 x 18 x 0,4 см (агароза типу I, Sigma, США). Електрофоретичне фракціонування проводили з використанням Трис-ацетатного буферу. В якості маркерів молекулярних мас використовували ДНК фага  $\lambda$ , оброблену ендонуклеазою Hind III.

#### Виділення плазмідної ДНК і приготування зондів.

Для виділення плазмідної ДНК використовували метод лужного лізису (Birnboim and Doly, 1979). Клоновані фрагменти ДНК виділяли за методом (Winberg and Hamazekjold, 1980).

Радіоактивну мітку [<sup>32</sup>P]-дНТФ ("Ізотоп", Ташкент) вводили в ДНК зондів реакцією нік-трансляції, використовуючи набір для мічення ("Фермент", Вільнюс, Литва) за рекомендаціями постачальника.

Гібридизацію ДНК на фільтрах здійснювали за методом (Charch and Gilbert, 1984).

### **Результати та обговорення.**

1. Успадкування ядерного геному в двох статевих генераціях асиметричних соматичних гібридів.

#### 1.1. Ізоферментний аналіз і блот-гібридизація ядДНК.

Ізоферментний аналіз виявив відмінність між спектрами ізоферментів соматичних гібридів та їх статевим поколінням F<sub>1</sub>. Для соматичних гібридів ізоферменти малатдегідрогенази, пероксидази та кислій фосфатази показали спектри, які були практично ідентичні таким *L. esculentum* (Рис. 1 А, Б).

Зокрема, була показана відсутність локусу *Ars-1* перуанського томата в спектрах ММФ кислій фосфатази всіх отриманих соматичних гібридів, що говорить про їх асиметричність. ММФ естерази виявили гібридність ядерного генетичного матеріалу у гібридів. При порівнянні всіх проаналізованих ізоферментних спектрів соматичних гібридів із такими у їх статевого покоління  $F_1$  була показана тенденція до переважного виявлення видоспецифічних смуг активності ферментів від перуанського томату, а також - відмінність між спектрами самих рослин  $F_1$  (Рис. 1 В, Г).

Ядерну ДНК гібридів та рослин двох статевих генерацій  $F_1$  і  $F_2$  обробляли рестриктазами *EcoRV* і *DraI* та гібридизували з фрагментом 25S рДНК із *Citrus limon*. При використанні цих двох ферментів було виявлено гібридну природу ядерного матеріалу соматичних гібридів (Рис. 2 А-Г). Аналіз блот-гібридизації ядДНК рослин  $F_1$ , обробленої *Dra I*, показав для більшості з них присутність змінених спектрів. Зміни стосувались не тільки рухливості фрагментів, але й ступеня їх ампліфікації. Для рослин  $F_2$  в обох випадках була показана відсутність в гібридизаційному спектрі видоспецифічного фрагменту *L. esculentum*. Але з використанням ферменту *DraI* в доповнення до специфічних фрагментів від перуанського томату 5,8 і 5,1 т.п.н. для рослин  $F_2$  був виявлений новий, небатьківський фрагмент 6,5 т.п.н.

### 1.2. Нестабільність ядерного геному асиметричних соматичних гібридів.

Отримані дані підтверджують асиметричну природу ядерного генетичного матеріалу соматичних гібридів. Мінливість в рухливості і ступені ампліфікації фрагментів ядДНК рослин  $F_1$

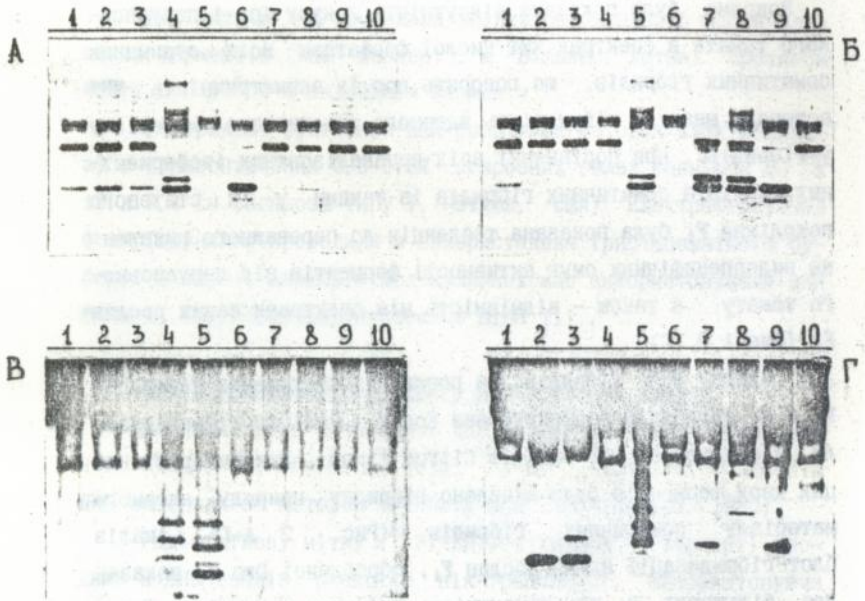


Рис. 1. Спектри множинних молекулярних форм малатдегідрогенази соматичних гібридів (А) та статевого покоління  $F_1$  (Б); кислій фосфатази у соматичних гібридів (В) та статевого покоління (Г). А, В: 1-3 - соматичні гібриди 12D, 7D, 8D; 4- *L. peruvianum* var. *dentatum* (3772); 5- *L. peruvianum* var. *dentatum* (3767); 6- *L. esculentum* Pl alb 1; 7-9 - соматичні гібриди 11D, 4D, 3D відповідно; 10- *L. esculentum*. В, Г: 1-3 - клон 4D та його покоління  $F_1$ ; 4- *L. esculentum* Pl alb 1; 5- *L. peruvianum* var. *dentatum* (3772); 6- *L. esculentum*; 7-9 - рослини покоління  $F_1$  клону 8D; 10- клон 8D.

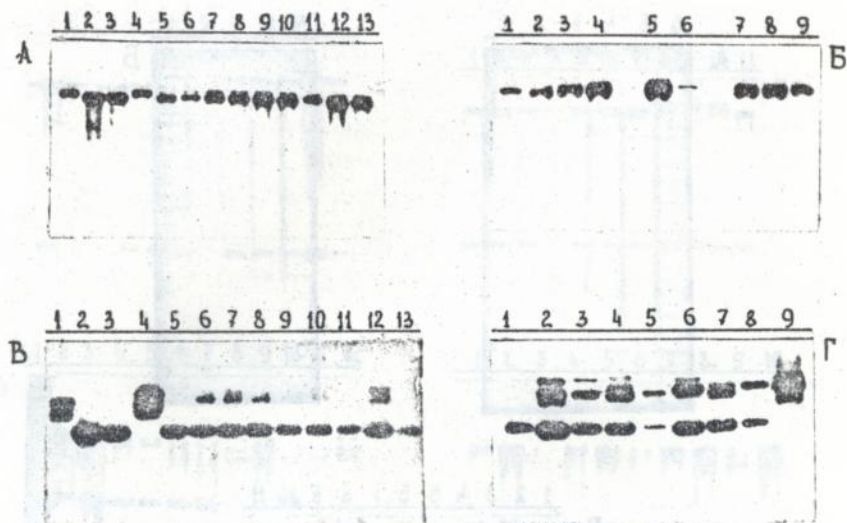


Рис. 2. Авторадіограма блот-гібридизації ядерної ДНК / EcoRV із фрагментом 25S рДНК соматичних гібридів (А) та статевого покоління  $F_1$  (Б); ядерної ДНК / Dra I соматичних гібридів (В) та статевого покоління  $F_1$ . А, В: 1- *L. peruvianum* var. *dentatum* (3767); 2- клон 1С; 3- *L. esculentum*; 4- *L. peruvianum* var. *dentatum* (3772); 5-13 - клони 1D-4D, 7D, 8D, 11D-13D. Б, Г: 1-2 - покоління  $F_1$  клону 1D; 3- покоління  $F_1$  клону 2D; 4- покоління  $F_1$  клону 3D; 5-6 - покоління  $F_1$  клону 4D; 7-8 - покоління  $F_1$  клону 8D; 9- покоління  $F_2$  клону 4D.

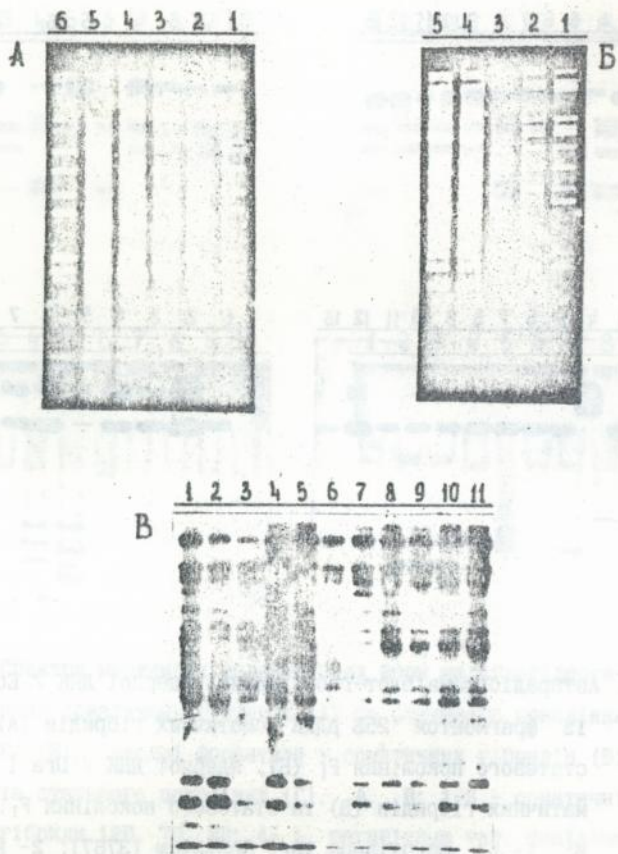


Рис. 3. Рестриктивні спектри хлДНК / Sac I (А) та хлДНК / Hind III (Б), та авторадіограма блот-гібридизації хлДНК / Hind III із сумарною хлДНК (В). 1- *L. esculentum*; 2- *L. peruvianum* var. *dentatum* (3772); 3-6 клони 1D-4D; 7- 7D; 8- 8D; 9-11 - 11D-13D.

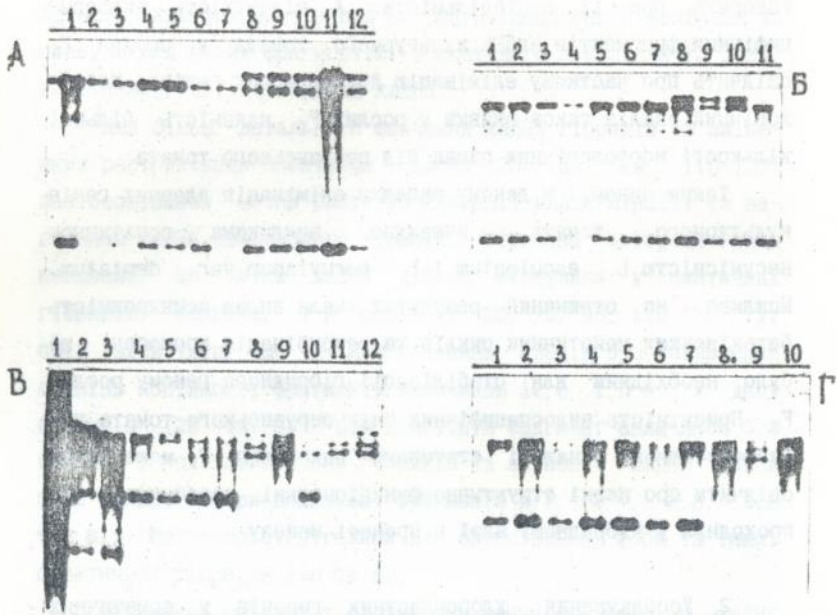


Рис. 4. Авторадіограма блот-гібридизації мтДНК / Bam HI соматичних гібридів (А) та статевого покоління  $F_1$  (Б), та мтДНК / Sal GI соматичних гібридів (В) та статевого покоління  $F_1$  (Г) із зондом 18S+5S=5'nD5. А, В: 1- *L. esculentum*; 2- *L. peruvianum* var. *dentatum* (3772); 3- клон SR; 4-12 - клони 1D-4D, 7D, 8D, 11D-13D. Б, Г: 1-2 - покоління  $F_1$  клону 1D; 3- покоління  $F_1$  клону 2D; 4- покоління  $F_1$  клону 3D; 5-7 - покоління  $F_1$  клону 4D; 8-10 - покоління  $F_1$  клону 8D; 11- покоління  $F_2$  клону 4D.

говорить про її нестабільність. А відсутність видоспецифічних фрагментів ядДНК культурного томата у рослин  $F_2$  свідчить про часткову елімінацію його ядерних генів. Морфологічний аналіз також виявив у рослин  $F_2$  наявність більшої кількості морфологічних ознак від перуанського томата.

Таким чином, в даному випадку елімінація ядерних генів культурного томата, очевидно, викликана соматичною несумісністю *L. esculentum* і *L. peruvianum* var. *dentatum*. Можливо, на отриманий результат мала вплив асинхронність батьківських мейотичних циклів та рекомбінація хромосом, що було необхідним для стабілізації гібридного геному рослин  $F_2$ . Присутність видоспецифічних смуг перуанського томата при ізоферментному аналізі статевого покоління  $F_1$  може також свідчити про певні структурно-функціональні перебудови, що проходили у гібридному ядрі в процесі мейозу.

## 2. Успадкування хлоропластних геномів у соматичних гібридів.

Для рестриктного аналізу хлДНК гібридів та їх статевого покоління  $F_1$  використовували декілька рестриктних ферментів, зокрема, *HindIII*, *SacI*, *EglII*. При використанні рестриктази *SacI* було показано, що хлоропластна ДНК усіх гібридів, які вивчалися, була ідентична спектру хлДНК *L. peruvianum* var. *dentatum* (Рис. 3 А). Аналогічний результат отриманий і для покоління  $F_1$ . Це може свідчити про те, що в цих гібридів відбулась направлена сегрегація хлоропластів.

При використанні рестриктази *Hind III* для аналізу хлДНК соматичних гібридів була показана наявність у частини з них змінених спектрів рестриктних фрагментів в порівнянні з батьківськими (Рис. 3 Б). Було показано відсутність двох

батьківських фрагментів від *L. peruvianum* var. *dentatum* та появу п'яти нових фрагментів. У статевого покоління  $F_1$  знайдені аналогічні перебудови хлДНК.

Для більш детального вивчення хлДНК гібридів із зміненими рестриктними спектрами (клони 2D, 3D, 8D, 11D-13D) застосовувався метод блот-гібридизації хлДНК/HindIII із загальною хлДНК культурного томата. Отримана авторадіограма показала, що зміни хлДНК дійсно відбулися у соматичних гібридів, зокрема, у гібридів 2D, 3D, 7D, 8D, 11D-13D. Тут слід відмітити, що у вищеназваних клонів був збільшений ступінь копійності фрагменту величиною 12,6 т.п.н. У двох гібридів (2D та 3D) був відсутній фрагмент величиною 6,2 т.п.н. У всіх соматичних гібридів із зміненою хлДНК також були наявні чотири додаткові фрагменти 4,1, 2,5, 2,3, 1,8 т.п.н., що не спостерігалися для батьківських форм та інших соматичних гібридів (1D та 4D).

Отриманий результат підтвердив наявність змін в хлДНК асиметричних гібридів, і може бути інтерпретований як рекомбінація хлДНК. Подальше рестриктне картування та секвенування змінених ділянок хлДНК допоможе визначити природу виявлених перебудов.

### 3. Аналіз успадкування мтДНК у соматичних асиметричних гібридів та двох статевих поколінь.

Для рестриктного аналізу мітохондріальної ДНК соматичних гібридів і статевого покоління  $F_1$  та  $F_2$  використовували рестриктази HindIII, BamHI, SalI і PstI. Рестриктний аналіз мтДНК з використанням цих ендонуклеаз виявив змінені рестриктні спектри у соматичних гібридів в порівнянні з батьківськими.

Для більш детального вивчення зазначених змін мтДНК у соматичних гібридів 1 рослин  $F_1$  була застосована блот-гібридизація із зондами *coxI*, *coxII*, *coxIII*, *cob*, 18S+5S+5'nd5, атр 9.

Блот-гібридизація мтДНК з використанням в якості зонда послідовності 1 субодиниці цитохромоксидази (*coxI*) практично не виявила змін в спектрах мтДНК. Лише при гібридизації мтДНК/*PstI* гібридизаційний спектр соматичних гібридів 1D-4D був ідентичним такому культурного томата, зокрема, за фрагментом величиною 22,9 т.п.н. Однак, для іншої групи гібридів (7D, 8D, 11D-13D) та для перуанського томату був виявлений фрагмент величиною 19 т.п.н. Аналіз гібридизаційних спектрів рослин  $F_1$  також виявив ідентичність їх із спектрами вихідних соматичних гібридів.

При використанні в якості зондів послідовностей *coxII* і *coxIII* цитохромоксидази суттєвих відмін в гібридизаційних спектрах соматичних гібридів не виявлено, за винятком розбіжностей в ступені ампліфікації деяких фрагментів.

Використання в якості зонду для блот-гібридизації нуклеотидної послідовності 18S+5S+5'nd5 показало суттєві відміни в гібридизаційних спектрах для всіх рестриктаз. Гібридизація мтДНК/*BamHI* виявила, що гібридизаційні спектри першої групи соматичних гібридів 1D-4D ідентичні спектру *L. peruvianum* var. *dentatum*. Однак, для соматичних гібридів 7D, 8D, 11D-13D знайдений новий гібридизаційний спектр, де був виявлений додатковий фрагмент 23,1 т.п.н. (Рис. 4 А). Також варто відмітити різницю в ступені ампліфікації фрагменту 18,2 т.п.н. У першій групі соматичних гібридів (1D-4D) він був значно ампліфікований, а у другій (7D, 8D, 11D-13D) - ступінь його копійності суттєво зменшувався, тоді як збіль-

шувався ступінь ампліфікації нового фрагменту 23,1 т.п.н. Гібридизаційний спектр рослин  $F_1$  та  $F_2$  був ідентичним спектру перуанського томата (Рис. 4 Б).

Гібридизація мтДНК/SalI також виявила, що гібридизаційний спектр мтДНК соматичних гібридів 1D-4D був ідентичний такому *L. peruvianum* var. *dentatum*. Гібридизаційний спектр клонів 7D, 8D, 11D-13D був рекомбінантним (Рис. 4 В). В цьому випадку виявлено два нових фрагменти (15,8 і 13,5 т.п.н.), які були відсутні у батьків. Встановлена також відсутність фрагменту 7,1 т.п.н., характерного для обох батьків. Тільки один соматичний гібрид 11D мав цей фрагмент, як і перша група клонів. Однак, це була єдина його відмінність в порівнянні з другою групою гібридів. Для рослин статевого покоління  $F_1$  також була показана ідентичність їх гібридизаційних спектрів вихідним соматичним гібридам (Рис. 4 Г).

При гібридизації мтДНК/HindIII із цим зондом показані суттєві відміни в гібридизаційних спектрах соматичних гібридів. Так, для гібридів першої групи (1D-3D) показана поява нового фрагменту 7,6 т.п.н., а також відмічена мінливість в ступені ампліфікації фрагментів 17,8 і 14,1 т.п.н. Для клонів 7D і 8D була характерною відсутність цього нового фрагменту, однак фрагмент 5,8 т.п.н. виявився більш ампліфікованим. Гібридизаційні спектри мтДНК статевого покоління  $F_1$  від рослин першої групи характеризувались більшою одноманітністю і були близькими до такого клону 4D. Гібридизаційний спектр мтДНК рослин  $F_1$ , отриманих від клону 8D, був ідентичним його спектру. Гібридизаційний спектр рослини  $F_2$  не мав змін в порівнянні з таким вихідного соматичного гібриду клону 4D.

Використання для блот-гібридизації в якості зонду послідовності *sov* показало такі результати. Для гібридизаційних спектрів мтДНК/*Bam*HI і мтДНК/*Hind*III не було виявлено значних змін в спектрах як соматичних гібридів, так і рослин  $F_1$ . При гібридизації мтДНК/*Sal*I показані змінні гібридизаційні спектри для соматичних гібридів. Зокрема, виявлено, що соматичні гібриди (клони 1D-4D) мали гібридизаційний спектр, аналогічний *L. peruvianum* var. *dentatum*. Тобто у них були присутні фрагменти 21,4, 18,6, 12,3, 10,9 та 10,0 т.п.н. У соматичних гібридів клонів 7D, 8D, 11D-13D додатково до вищезазначених фрагментів був показаний фрагмент величиною 13,5 т.п.н. Гібридизаційні спектри рослин першого покоління виявились ідентичними таким вихідних соматичних гібридів.

При використанні в якості зонду послідовності *atr 9* були виявлені деякі відмінності в гібридизаційних спектрах ДНК, зокрема з використанням рестриктази *Sal*I. В цьому випадку частина соматичних гібридів мала спектр мтДНК, ідентичний *L. peruvianum* var. *dentatum* (1D, 2D, 4D). Соматичний гібрид 3D мав змінений, гібридний спектр. У нього була виявлена сума батьківських фрагментів. У іншій групі гібридів (клони 7D, 8D, 11D-13D) був другий тип зміненого спектру, де мали місце тільки по одному батьківському фрагменту 18,6 і 12,9 т.п.н.

Таким чином, аналіз мтДНК соматичних гібридів та їх статевого покоління показав наявність значних перебудов, що можуть бути викликані процесами генетичної рекомбінації в гетероплазматичній стадії після злиття протопластів. Виявлені зміни мтДНК успадковувалися рослинами двох статевих генерацій.

Зведені результати досліджень подані в таблиці 1.

ЛІТЕРАТУРА  
1. Д. С. Сидоренко  
2. А. М. Удальцов

Таблиця 1

Молекулярно-біохімічні характеристики асиметричних соматичних гібридів  
*L. esculentum* + *L. peruvianum*

Генотип	Ядерний геном						Хлоропластичний геном		Мітохондріальний геном						
	Ізоферменти				ядДНК		Sac I	Hind III	Cox I	Cox II	Cox III	18S+5S +5'nd5	cob	atp9	
	Est	Prx	Mdh	Aps	EcoR V	Dra I									
<i>L. esculentum</i> Mill	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
<i>L. peruvianum</i> var. <i>dentatum</i> Dun	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Соматичні гібриди	1D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	P	P	P	P	R1	R1	P
	2D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R1	R1	E+P
	3D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R1	R1	P
	4D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	P	P	P	P	R1	R1	P
	7D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R2	R2	R
	8D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R2	R2	R
	11D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R2	R2	R
	12D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R2	R2	R
	13D	E+P	E	E	E	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R2	R2	R
Рослини F <sub>1</sub>	1F <sub>1</sub> 1D	ND	ND	ND	ND	E+P	R	P	P	P	P	P	R1	R1	ND
	2F <sub>1</sub> 1D	ND	ND	ND	ND	E+P	R	P	P	P	P	P	R1	R1	ND
	F <sub>1</sub> 2D	ND	ND	ND	ND	E+P	E+P	P	R	P	P	P	R1	R1	ND
	F <sub>1</sub> 3D	ND	ND	ND	ND	E+P	R	P	R	P	P	P	R1	R1	ND
	1F <sub>1</sub> 4D	E+P	E+P	E	E+P	E+P	R	P	P	P	P	P	R1	R1	ND
	2F <sub>1</sub> 4D	E	E+P	E	E+P	E+P	E+P	P	P	P	P	P	R1	R1	ND
	3F <sub>1</sub> 4D	ND	ND	ND	ND	E+P	R	P	P	P	P	P	R1	R1	ND
	1F <sub>1</sub> 8D	E+P	E+P	E+P	E+P	E+P	R	P	R	P	P	P	R2	R2	ND
	2F <sub>1</sub> 8D	E	E+P	E+P	E+P	E+P	R	P	R	P	P	P	R2	R2	ND
	3F <sub>1</sub> 8D	E	E+P	E	E+P	E+P	R	P	R	P	P	P	R2	R2	ND
Рослини F <sub>2</sub>															
F <sub>2</sub> 4D	ND	ND	ND	ND	P	P	ND	ND	P	ND	P	R1	R1	ND	

E - *L. esculentum* Mill.P - *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun.

R - рекомбінантний

ND - не визначено

## ВИСНОВКИ

1. З'ясовано характер успадкування ядерних, хлоропластних і мітохондріальних генетичних детермінант у вперше отриманих фертильних асиметричних соматичних гібридів *L. esculentum* Mill. + *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. та їх статевих поколінь.

2. Виявлено генетичну нестабільність ядерного геному асиметричних соматичних гібридів, яка проявилася в частковій елімінації ядерного генетичного матеріалу культурного томата у рослин двох поколінь.

3. Цитоплазматичні геноми досліджених соматичних гібридів переважно успадковувались від *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum*.

4. У частини соматичних гібридів були виявлені перебудови хлоропластної ДНК, що, можливо, є наслідком рекомбінації батьківських геномів.

5. Показано значні перебудови мітохондріальної ДНК соматичних гібридів, які можуть бути результатом рекомбінаційних подій.

6. Показано стабільне успадкування змінених мітохондріальної та хлоропластної ДНК рослинами двох статевих поколінь.

### Список робіт, опублікованих по темі дисертації.

1. Piven N.M., Ratushnyak Y.I., Rudas V.A., Latypov S.A., Zavgorodnyaya A.V. Selection of somatic hybrids in *Lycopersicon* and *Solanum* using chlorophyll-deficient mutants and gamma-irradiation // Abstr. VIII Intern. Protoplasts

Symposium. - Uppsala. - 1991. - P. 28.

2. Ратушняк Я.И., Пивень Н.М., Латыпов С.А., Самойлов А.М., Завгородняя А.В., Глеба Ю.Ю. Изменение генетической структуры томата методом "гамма-слияния" протопластов *Lycopersicon esculentum* Mill. и *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Биополимеры и клетка. - 1991. - Т. 7. - С. 82-91.

3. Ratushnyak Y.I., Cherep N.N., Zavgorodnyaya A.V., Latypov S., Borozenko I.V., Rachkovskaya R.I., Gleba Y.Y. Fertile asymmetric somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Mol. Gen. Genet. - 1993. - V. 236. - P. 427-432.

4. Ратушняк Я.И., Череп Н.Н., Завгородняя А.В., Латыпов С.А., Борозенко И.В., Рачковская Р.И., Глеба Ю.Ю. Клеточно-инженерный синтез фертильных асимметричных гибридов томата методом "гамма-слияния" протопластов // Генетика. - 1993. - Т. 29. - С. 164-176.

5. Cherep N.N., Zavgorodnyaya A.V., Ratushnyak Y.I., Gleba Y.Y. Chloroplast DNA rearrangement in *Lycopersicon* asymmetric somatic hybrids // Abstr. XVIIth Intern. Congress of Genetics. - Birmingham. - England. - 1993. - P. 191.

6. Ratushnyak Y.I., Cherep N.N., Zavgorodnyaya A.V., Latypov S.A., Kochevenko A.S., Gleba Y.Y. Alloplasmic incompatibility in cybrid plants of tomato obtained by cell engineering methods // Abstr. VIIIth Intern. Congress of Plant Tissue and Cell Culture. - Firenze. - Italy. - 1994. - P. 102.

7. Cherep N.N., Zavgorodnyaya A.V., Ratushnyak Y.I., Gleba Y.Y. Organelle and nuclear genomes analysis of tomato cybrid plants // Abstr. 4th Intern. Congress of Plant

Molecular Biology. - Amsterdam. - Netherlands. - 1994. - P. 153.

8. Ратушняк Я.И., Кочевенко А.С., Череп Н.Н., Завгородняя А.В., Латыпов С.А., Глеба Ю.Ю. Аллоплазматическая несовместимость у цибридных растений, обладающих геномом *Lycopersicon esculentum* Mill. и плазмагенами *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Генетика (в печати).

9. Zavgorodnyaya A.V., Cherep N.N., Ratushnyak Y.I., Gleba Y.Y. Genetic instability of asymmetric somatic hybrids *Lycopersicon esculentum* Mill. + *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Abstr. Intern. Symposium "Plant biotechnology and Genetic Engineering. - Kiev - 1994. - P. 76.

10. Череп Н.Н., Завгородняя А.В., Ратушняк Я.И., Глеба Ю.Ю. Реконструкция хлоропластной ДНК асимметричных соматических гибридов *Lycopersicon esculentum* Mill. + *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Генетика (в печати).

**Завгородняя А.В.** Анализ ядерного и цитоплазматических геномов у асимметричных соматических гибридов и их полового поколения в роде *Lycopersicon*

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25. - клеточная биология, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 17 научных работ по теме диссертации.

Проведено молекулярно-генетическое исследование асимметричных соматических гибридов *Lycopersicon esculentum* Mill. + *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. и двух половых поколений. Показана нестабильность ядерного генома соматических гибридов, вызвавшая частичную элиминацию

хромосом культурного томата. Показаны также изменения, произошедшие как в хлоропластном, так и в митохондриальном геномах исследуемых гибридов. Эти изменения могут быть следствием генетической рекомбинации. Показано стабильное наследование измененных цитоплазматических геномов в двух половых поколениях, полученных после самоопыления соматических гибридов.

Ключевые слова: соматические гибриды; ядерный, хлоропластный и митохондриальный геномы; рекомбинация.

Zavgorodnyaya A.V. *Analysis of nuclear and cytoplasmic genomes of asymmetric somatic hybrids and their sex progenies in Lycopersicon genus.*

Thesis for gaining a scientific degree of Candidate of Biological Sciences on speciality 03.00.25. - Cell Biology, Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1995.

The results of 17 scientific papers are defended.

Molecular-genetic investigation of asymmetric somatic hybrids obtained between *L. esculentum* Mill. and *L. peruvianum* var. *dentatum* Dun. and their two sex generation was carried out. Instability revealed for nuclear genome of somatic hybrids has caused a partial elimination of chromosomes of cultivated tomato. Changes in structure of both chloroplast and mitochondrial DNAs were also revealed which may be explained by genetic recombination of genomes. A regular inheritance of these changed genomes was traced in two sex generations of corresponding somatic hybrids.

Key words: somatic hybrids; nuclear, chloroplast and mitochondrial genomes; recombination.

AB 31.829