

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису
УДК 575.224+576.5

ЄМЕЦЬ Алла Іванівна

СОМАТИЧНІ ГІБРИДИ ПАСЛЬОНОВИХ НА ОСНОВІ МУТАНТІВ
NICOTIANA PLUMBAGINIFOLIA, СТІЙКИХ ДО ДІЇ СПОЛУК
З АНТИМІКРОТРУБОЧКОВОЮ АКТИВНІСТЮ

03.00.25 - клітинна біологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1996



00759713 (W)

Дисертацією є рукопис
Робота виконана на кафедрі клітинної біології та генетичної інженерії
біологічного факультету Київського університету імені Тараса Шевченка

Науковий керівник -

член-кореспондент НАН України,
доктор біологічних наук
БЛЮМ Ярослав Борисович

Офіційні опоненти -

доктор біологічних наук,
професор
КУНАХ Віталій Анатолійович

кандидат біологічних наук,
н. співр.
РАТУШНЯК Яків Іванович

Провідна організація -

Інститут фізіології рослин та
генетики НАН України

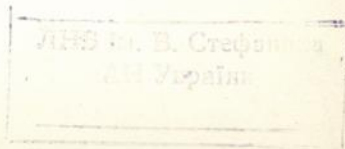
Захист дисертації відбудеться "4" квітня 1996 р. о 14⁰⁰ год. на
засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.19.01 при Інституті клітинної
біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 252143, Київ-
143, вул. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології
та генетичної інженерії НАН України.

Автореферат розісланий "4" березня 1996 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради,
кандидат біологічних наук

Л. В. Малишева



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Мікротрубочки - це цитоплазматичні структури, які складаються з димерів α - та β -тубуліну, і разом з мікрофіламентами та проміжними філаментами формують високоорганізований цитоскелет еукаріотичних клітин (Alberts et al., 1989). Вони приймають участь в підтриманні форми клітин, регуляції їх росту та морфогенезу, в організації цитоплазми та забезпечують поділ клітин, утворюючи мітотичне веретено (Блюм, 1988; Dustin, 1989; Mandelkow & Mandelkow, 1995). Як і у випадку клітин тварин, множинність функцій мікротрубочок в клітинах рослин зв'язують з гетерогенністю α - та β -тубулінів (Hussey et al., 1991). Ця гетерогенність являється результатом того, що різні ізоформи тубулінів кодується мультигенною родиною генів α - та β -тубулінів (Hussey et al., 1991; Koczak et al., 1992; Snustad et al., 1992). В подальшому ізоформи рослинного тубуліну можуть інтенсивно піддаватись посттрансляційним модифікаціям, внаслідок чого гетерогенність цього білку ще збільшується (Смертенко, 1996). Тому поглиблення уяв про функціональні взаємозв'язки між різними членами родини генів тубуліну у рослини являється основою не тільки для розуміння фундаментальних механізмів росту і розвитку клітин, загальних для всіх еукаріотичних організмів, але й для розуміння таких специфічних функцій мікротрубочок рослин, як їх участь в побудові клітинної стінки та формуванні препрофазної стрічки і фрагмoplastу під час мітозу (Cyt & Palevitz, 1995; Seagull, 1989; Shibaoka & Nagai, 1994).

Прогрес в даному питанні може бути досягнутий шляхом: а) вивчення організації генів тубуліну в клітинах рослин та їх тканиноспецифічної експресії; б) отримання мутантних ліній по генах білків мікротрубочок і, в першу чергу, по генах тубуліну; в) переносу мутантних генів тубуліну в інші клітини з метою вивчення можливих функціональних змін або порушень структури мікротрубочок. На сьогоднішній день вже знайдено декілька природних мутантних ліній рослин, стійких до дії гербіцидів з антимікротрубочковим механізмом дії, серед яких добре вивчені *Eleusine indica* та *Setaria viridis* (Smeda & Vaughn, 1994). Було показано, що резистентність принаймі в *E. indica* пов'язана зі змінами в структурі β -тубуліну (Vaughn & Vaughan, 1990; Smeda & Vaughn, 1994).

Раніше експериментальним шляхом Я.Б. Блюмом та співр. вперше були отримані β -тубулінові мутанти *Nicotiana plumbaginifolia* зі стійкістю до дії аміпрофосметилу (АПМ, гербіцид фосфоротіоамідного ряду) (Страшнюк и др., 1993) і трифлураліну (ТФЛ, гербіцид динітроанілінового ряду) (Blume et al., 1991; Блюм и др., 1996), котрі характеризуються вираженою антимікротрубочковою активністю. Метою отримання таких мутантів було їх використання при створенні гібридних клітинних систем з маркерним білком (мутантним β -тубуліном) у складі мікротрубочок як для подальшого

вивчення особливостей функціонування цього мутантного білку, так і для вивчення особливостей поведінки різних мікротрубочкових структур (інтерфазна сітка, препрофазна стрічка, веретено поділу, фрагмопласт) в соматичних гібридах. Поряд з цим, оскільки ще не вдалося ізолювати жодного мутантного гену тубуліну, відповідалього за стійкість до вищезгаданих типів гербіцидів, з метою подальшого переносу в інші види рослин, то розробка підходів соматичної гібридизації для здійснення такого переносу є також актуальною в теоретичному і практичному плані.

Мета та завдання дослідження. В зв'язку з викладеним вище метою даної роботи було отримання та аналіз високофункціональних симетричних та асиметричних соматичних гібридів на основі мутантів *N. plumbaginifolia* по β -тубуліну, стійких до дії АПМ та ТФЛ, та рослин *N. sylvestris* і *A. belladonna* (реципієнти), які б успадкували ознаку даної резистентності, для вивчення особливостей функціонування мутантної β -субодиниці тубуліну в складі мікротрубочкових структур гібридних клітин.

До конкретних задач роботи входило:

1. Отримати симетричні гібриди *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* і *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі до дії АПМ, та *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* і *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі до дії ТФЛ.

2. Отримати асиметричні гібриди *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* і *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі до дії АПМ, та *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* і *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі до дії ТФЛ.

3. Провести цитогенетичний аналіз гібридних ліній.

4. Вивчити фертильність отриманих гібридів та успадкування ознак стійкості до гербіцидів в їх першому поколінні.

5. Порівняти стійкість мікротрубочок в протопластах гібридів та в протопластах батьківських ліній до дії АПМ та ТФЛ за допомогою імунофлюоресцентної мікроскопії.

6. Провести ідентифікацію наявності мутантних ізоформ β -тубуліну *N. plumbaginifolia* в отриманих гібридах шляхом біохімічного аналізу.

Наукова новизна. Вперше серед вищих рослин отримані високофункціональні соматичні гібриди *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* і *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі до сполук з антимікротрубочковим механізмом дії - ампрофосметилу та трифлураліну. Зокрема, вперше отримані γ -гібриди на основі *N. plumbaginifolia* (донор) та *A. belladonna* (реципієнт). Встановлено, що стійкість до даних речовин пов'язана з успадкуванням мутантного гену тубуліну від *N. plumbaginifolia*, продукт якого - мутантна ізоформа β -тубуліну - є складовою частиною мікротрубочок гібридних клітин. Отримані гібридні лінії можуть бути використані для вивчення механізмів подальшої переважної сегрегації хромосом одного з батьків в соматичних гібридах та

встановлення структурно-функціональних особливостей їх веретена поділу, яке може забезпечувати правильність розходження в мітозі хромосом, успадкуваних від різних батьків.

Практична цінність. На прикладі β -тубулінових мутантів *N. plumbaginifolia*, стійких до АПМ (фосфоротіоамідний гербіцид) та ТФЛ (динітроаніліновий гербіцид), продемонстровано можливість ефективного використання асиметричної соматичної гібридизації для переносу ознаки стійкості до цих типів гербіцидів (мутантні гени β -тубуліну) до близькоспоріднених (*N. sylvestris*) та філогенетично віддалених (*A. belladonna*) видів рослин. Гібриди, які успадкували одну хромосому від відомого мутанту *N. plumbaginifolia*, можуть бути використані як вихідний матеріал для ідентифікації та клонування мутантного гену β -тубуліну і перенесення його у важливі види сільськогосподарських культур для отримання стійких до даних гербіцидів сортів рослин.

Результати досліджень використовуються в учбовому процесі на кафедрі клітинної біології та генетичної інженерії Київського університету ім. Тараса Шевченка при читанні спецкурсів "Скелетні структури клітини та їх функції" та "Клітинна селекція рослин", а також можуть бути використані при читанні спецкурсу "Клітинна інженерія рослин".

Основні положення, які виносяться на захист. На основі проведених досліджень на захист виносяться наступні положення:

1. Отримання соматичних гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійких до дії АПМ та ТФЛ, шляхом симетричної гібридизації.

2. Отримання соматичних гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійких до дії АПМ та ТФЛ, шляхом асиметричної гібридизації.

3. Встановлення закономірностей розподілу хромосомного матеріалу в отриманих гібридах.

4. Вивчення фертильності отриманих гібридів та успадкування ознак стійкості до гербіцидів в їх першому поколінні.

5. Наявність підвищеної стійкості мікротрубочок до дії АПМ та ТФЛ в протопластах гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* порівняно зі стійкістю мікротрубочок протопластів батьківських ліній.

6. Успадкування мутантної форми β -тубуліну в отриманих гібридах.

7. Можливість використання стійкості до АПМ та ТФЛ на прикладі *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* комбінацій, як селективних маркерів в соматичній гібридизації рослин.

Апробація роботи. Результати дисертаційної роботи доповідались на II-му (1993) та III-му (1995) Російських симпозіумах "Нові методи біотехнології рослин" (Пушино, Росія); XV-му Міжнародному ботанічному конгресі (Йокагама, Японія, 1993); II-му з'їзді товариства фізіологів

рослин України (Київ, Україна, 1993); VIII-му Міжнародному конгресі по культурі рослинних тканин і клітин (Флоренція, Італія, 1994); IV-му Європейському конгресі по клітинній біології (Прага, Чехія, 1994); Міжнародному симпозиумі "Біотехнологія та генетична інженерія рослин" (Київ, Україна, 1994); Міжнародному симпозиумі "Молекулярна біологія та біотехнологія рослин" (Нью-Делі, Індія, 1994); Міжнародному симпозиумі по стійкості бур'янів та сільськогосподарських рослин до гербіцидів (Кордова, Іспанія, 1995); X-му Європейському цитоскелетному форумі (Стокгольм, Швеція, 1995); семінарі Європейського товариства молекулярних біологів "Контроль циклу клітинного поділу вищих рослин" (Сегед, Угорщина, 1995).

Публікації. Основні результати дисертації викладені у 11 друкованих роботах, список яких наведено в кінці автореферату.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, результатів дослідження та їх обговорення, заключення, висновків та списку цитованої літератури, який містить найменувань. Робота викладена на сторінках, містить рисунків та 6 таблиць.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В роботі використовували наступний рослинний матеріал: мутант *Nicotiana plumbaginifolia* ($2n=20$), стійкий до дії АПМ (Страшнюк и др., 1993), та мутант *N. plumbaginifolia* ($2n=20$), стійкий до ТФЛ (Блюм и др., 1996). Рослини *N. sylvestris* ($2n=24$) та *A. belladonna* ($2n=72$) дикого типу, а також канаміцин-стійкі лінії рослин *N. sylvestris* та *A. belladonna* (з колекції Ін-ту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України). В якості аптимікротрубочкових сполук використовували АПМ, фосфоротіоамідний гербіцид, отриманий від Chemagro Division, Baychem Corp. (США) та ТФЛ, динітроаніліновий гербіцид, отриманий від DowElanco (США).

Рослини вирощували в асептичних умовах на безгормональному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) (Murashige & Skoog, 1962) при освітленні 4-5 клк та температурі 25°C. При симетричному злитті в якості реципієнтів використовували канаміцин-стійкі лінії рослин *N. sylvestris* та *A. belladonna*, при асиметричному - рослини *N. sylvestris* та *A. belladonna* дикого типу. Мезофільні протопласти виділяли за відпирацьованою раніше методикою (Сидоров и др., 1985). Для отримання γ -гібридів (асиметричне злиття) протопласти рослин-донорів опромінювали γ -променями в дозі 200 Гр (потужність дози - $9,6 \times 10^{-2}$ Гр/с, ^{60}Co). Злиття мезофільних протопластів проводили за методикою Менцеля та співавт. (Menczel et al., 1981). Культивування продуктів злиття *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* здійснювали в рідкому поживному середовищі КМ8р (Kao & Michayluk, 1975), а *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* - в рідкому поживному

середовищі MO-1 (Gleba et al., 1982). Селективний тиск здійснювали на стадії 3-5 клітинних поділів, додаючи в культуральні середовища селективні концентрації АПМ (5 мкМ) чи ТФЛ (12 мкМ), відповідно, та 100 мг/л канаміцину (в разі отримання гібридів при симетричному злитті). Регенерацію гібридних клонів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* проводили на твердому селективному середовищі МС, що містило 1 мг/л кінетину, 0,1 мг/л 3-індолилцетової кислоти (ІОК) та селективні концентрації АПМ чи ТФЛ, а також 100 мг/л канаміцину - в разі отримання гібридів шляхом симетричного злиття. При селекції гібридних клонів *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* використовували селективне тверде середовище МС, що містило 1 мг/л зеатину, 0,1 мг/л ІОК, селективні концентрації АПМ або ТФЛ, а також у випадку симетричного злиття - 100 мг/л канаміцину. Регенеранти вкорінювали на безгормональному середовищі МС, а потім висаджували в ґрунт.

Для первинної перевірки гібридних ліній на стійкість до АПМ або ТФЛ проводили аналіз регенераційної здатності їх листових експлантів на відповідних регенераційних середовищах, які містили селективні концентрації гербіцидів. Порівнювали також різницю приросту калусу батьківських та гібридних рослин на середовищах для калусогенезу з різними концентраціями АПМ або ТФЛ через 4 тижні після їх висадки. Калус індукували, відповідно, на середовищах для калусогенезу тютюну (Сидоров и др., 1985) та беладонни (Earpen et al., 1978).

Для оцінки фертильності гібридів проводили самозапилення та в ряді випадків зворотне запилення. Для аналізу усадкування стійкості до АПМ та ТФЛ в їх першому поколінні насіння, одержане від самозапилення та зворотнього запилення, стерилізували та висаджували на середовища без гербіцидів та середовища з селективними концентраціями АПМ чи ТФЛ.

Для проведення цитогенетичного аналізу кінчики коренів рослин обробляли 0,5%-ним розчином колхіцину, фіксували в суміші етанол/оцтова кислота (3:1) та фарбували ацетоорсеїном (розчин 1%-ного орсеїну в 45%-ній оцтовій кислоті). Давлені препарати готували в 45%-ній оцтовій кислоті.

Імунофлюоресцентний аналіз стійкості кортикальних та мітотичних мікротрубочок мезофільних протопластів гібридних та батьківських рослин до АПМ та ТФЛ здійснювали за методом (Meijer & Simmonds, 1988) з деякими модифікаціями. Мікротрубочки фарбували мишиними моноклональними антитілами Tu-01 проти α -тубуліну. ДНК в клітинах фарбували за допомогою Hoechst 33258.

Виділення та очищення тубуліну із мезофілу рослин *N. plumbaginifolia*, *N. sylvestris*, *A. belladonna* та гібридів, отриманих на їх основі, проводили за методом (Morejohn & Fosket, 1986) з деякими змінами. Двомірний електрофорез тубуліну здійснювали за методом (O'Farrell, 1975). Імуноблотинг субодиниць тубуліну проводили за методом (Towbin et al.,

1979). Для ідентифікації α -субодиниці використовували моноклональні антитіла Tu-01, а для β -субодиниці - Tu-06, які були люб'язно надані д-ром В. Вікліцкі (Ін-т молекулярної генетики, Прага, Чеська Республіка).

Для статистичної обробки експериментальних даних використовували стандартні методи обробки результатів (Деркач, 1963; Урбах, 1964).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

I. Отримання гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійких до дії АПМ та ТФЛ

Вивчення впливу селективних концентрацій АПМ, ТФЛ та канаміцину на протопласти чутливих до їх дії батьківських ліній. Відомо, що АПМ (Morejohn & Fosket, 1984) і ТФЛ (Morejohn & Fosket, 1991) являються одними з найбільш ефективних антимікротрубочкових сполук, які руйнують мікротрубочки клітин рослин, що призводить до втрати здатності клітинами ділитися під час мітозу. Однак чутливість до цих речовин може варіювати в залежності від об'єктів, на які вони впливають (Falconer & Scagull, 1987). Канаміцин - аміноглікозидний антибіотик бактеріального походження - специфічно зв'язується з 70S-субодиницями рибосом, приводячи до помилки при зчитуванні мРНК і, таким чином, інгібує біосинтез білку в еукариот з наступною загибеллю чутливих клітин (Гейл і др., 1975; Маниатис і др., 1984). Тому на першому етапі досліджень вивчали вплив селективних концентрацій АПМ (5 мкМ) та ТФЛ (12 мкМ) на мезофільні протопласти *N. sylvestris* та *A. belladonna* та канаміцину (100 мг/л) - на протопласти мутантів *N. plumbaginifolia*, щоб визначити, чи приводять селективні концентрації даних речовин до повного інгібування росту клітин чутливих рослин.

Після внесення в середовища для культивування протопластів *N. sylvestris* та *A. belladonna* 5 мкМ АПМ або 12 мкМ ТФЛ, клітини повністю припиняли свій ріст і гинули. В подальшому при дослідженні впливу різних концентрацій АПМ та ТФЛ на ріст калусів цих рослин нами було показано, що для клітин калусу *N. sylvestris* критичними є ті концентрації АПМ, які лежать в межах 1-3 мкМ (Рис. 1а), ТФЛ - до 2 мкМ (Рис. 2а). Для калусу *A. belladonna* - критичними являються концентрації АПМ та ТФЛ в діапазоні до 1 мкМ (Рис. 2а, 2б). Концентрація 100 мг/л канаміцину теж була критичною для культивованих клітин *N. plumbaginifolia*. Оскільки таке повне пригнічення росту чутливих клітин до тих чи інших сполук в умовах їх селективного тиску важливе для селекції соматичних гібридів (Сидоров, 1990), то ці результати власне і дали підстави використовувати концентрації 5 мкМ АПМ, 12 мкМ ТФЛ та 100 мг/л канаміцину як селективні при отриманні гібридів.

Селекція *in vitro* соматичних гібридів зі стійкістю до дії АПМ та ТФЛ.
Шляхом симетричної гібридизації протопластів АПМ-стійкого мутанту *N. plumbaginifolia* з протопластами канаміцин-стійкої (Km^r) лінії *N. sylvestris* було відібрано 312 гібридних калусів, резистентних до селективних концентрацій АПМ та канаміцину (Табл. 1). З них здатністю до

Табл. 1. Селекція соматичних гібридів, стійких до дії сполук з анти-мікротрубочковим механізмом дії

Комбінація злиття	Кількість отриманих калусів на селективному середовищі	Кількість регенерованих з калусів рослин на селективному середовищі	Кількість відрібраних гібридів на селективному середовищі
	Симетричні	гібриди	
<i>N. plumbaginifolia</i> apm^r + <i>N. sylvestris</i> Km^r	312	93	68
<i>N. plumbaginifolia</i> tfl^r + <i>N. sylvestris</i> Km^r	190	32	8
<i>N. plumbaginifolia</i> apm^r + <i>A. belladonna</i> Km^r	102	22	13
<i>N. plumbaginifolia</i> tfl^r + <i>A. belladonna</i> Km^r	61	7	3
	Асиметричні (γ) гібриди		
$\gamma N.$ <i>plumbaginifolia</i> apm^r + <i>N. sylvestris</i>	157	41	17
$\gamma N.$ <i>plumbaginifolia</i> tfl^r + <i>N. sylvestris</i>	189	28	6
$\gamma N.$ <i>plumbaginifolia</i> apm^r + <i>A. belladonna</i>	64	17	5
$\gamma N.$ <i>plumbaginifolia</i> tfl^r + <i>A. belladonna</i>	58	11	4

регенерації в умовах селективного тиску характеризувались тільки 68 ліній, з яких для аналізу було взято 12. При симетричному злитті протопластів ТФЛ-стійкого мутанту *N. plumbaginifolia* з протопластами канаміцин-

стійкої лінії *N. sylvestris* було отримано 190 резистентних до ТФЛ та канаміцину калусів, з яких могло регенерувати тільки 32 лінії, що відрізнялись між собою по швидкості росту. З них 8, нормально розвинутих, було взято для подальшого аналізу (Табл.1). Майже всі отримані міжвидові гібриди *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* були морфологічно подібні до *N. sylvestris*, хоча частина мала проміжний фенотип, який поєднував ознаки як донора, так і реципієнта, що підтверджує результати по отриманню гібридів при злитті в даній комбінації (Hung et al., 1993).

При симетричній гібридизації протопластів *N. plumbaginifolia* та *A. belladonna* було відібрано 13 АПМ- та канаміцин-стійких гібридних ліній (Табл. 1), серед яких 4 гібриди (№Ab-201, №Ab-202, №Ab-203, №Ab-204) мали виражені морфологічні ознаки *N. plumbaginifolia*, а 9 були морфологічно подібними до *A. belladonna*. В аналогічній комбінації було також відселектовано 3 гібридні лінії, стійкі до ТФЛ та канаміцину (Табл. 1), які мали реципієнтну або химерну морфологію.

В результаті γ -гібридизації було отримано 17 АПМ-стійких гібридних ліній *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris*, та 6 ТФЛ-стійких гібридних ліній при злитті в аналогічній комбінації (Табл. 1). Внаслідок злиття в міжтрибній комбінації було отримано 5 високоасиметричних АПМ-стійких та 4 ТФЛ-стійких гібридних клонів *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* (Табл. 1). Отримані гібриди успадкували фенотип реципієнтів *N. sylvestris* або *A. belladonna*, відповідно, що і слід було очікувати при асиметричній соматичній гібридизації рослин з використанням γ -опромінення, оскільки воно призводить до інактивації клітин-донорів та індукції елімінації частини їх генетичного матеріалу (Глеба и Сытник, 1984).

Первинна перевірка отриманих гібридних ліній на стійкість до АПМ та ТФЛ. На першому етапі для доказу наявності стійкості до АПМ чи ТФЛ у отриманих гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* проводилась перевірка здатності листових експлантів гібридних та батьківських ліній до регенерації на середовищах з селективними концентраціями даних гербіцидів. За цих умов на листових експлантах мутантів *N. plumbaginifolia* та гібридів утворювалась велика кількість регенерантів, які на відміну від рослин-реципієнтів нормально розвивались в умовах селективного тиску. Аналогічні результати були отримані раніше при тестуванні вихідних мутантів (Страшнюк, 1993).

Стійкість до АПМ та ТФЛ у отриманих гібридів була підтверджена при визначенні відносного приросту маси їх калусів в присутності різних концентрацій даних гербіцидів (Рис. 1, 2). Так, калус висаджували на середовища, які містили концентрації АПМ від 1 мкМ до 15 мкМ та ТФЛ від 1 мкМ до 20 мкМ. Калусні тканини, індуковані з гібридних рослин та мутантів, утворювали на середовищах з селективними концентраціями гербіцидів білий пухкий калус, тоді як при тестуванні калусів *N. sylvestris* та *A. belladonna* спостерігали їх потемніння та гальмування росту. При по-

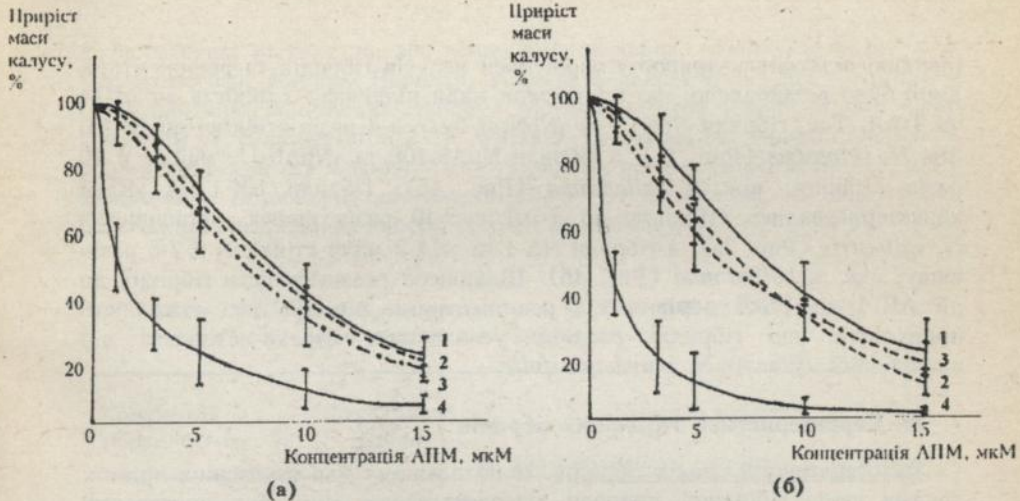


Рис. 1. Криві приросту маси калусів (%) батьківських та АПМ-стійких гібридних рослин в присутності різних концентрацій АПМ: а) 1 - *N. plumbaginifolia* arm^f, 2 - гібрид NrNs-1, 3 - гібрид γ NrNs-3, 4 - *N. sylvestris*; б) 1 - *N. plumbaginifolia* arm^f, 2 - гібрид NrAb-106, 3 - гібрид γ NrAb-1, 4 - *A. belladonna*

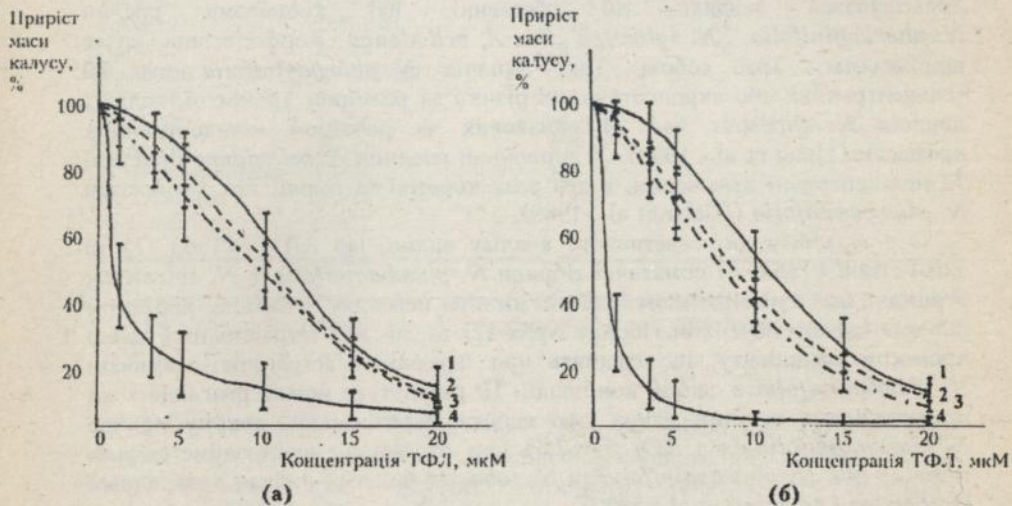


Рис. 2. Криві приросту маси калусів (%) батьківських та ТФЛ-стійких гібридних рослин в присутності різних концентрацій ТФЛ: а) 1 - *N. plumbaginifolia* tlf^f, 2 - гібрид NN-1, 3 - гібрид γ NN-3, 4 - *N. sylvestris*; б) 1 - *N. plumbaginifolia* tlf^f, 2 - гібрид NA-4, 3 - гібрид γ NA-3, 4 - *A. belladonna*

рівнянні відносного приросту сирової маси калусів гібридів та реципієнтних ліній було встановлено, що всі гібриди мали підвищену стійкість до АПМ чи ТФЛ. Так, гібриди NpNs-1 та γ NpNs-3 були в 8 разів стійкіші до АПМ, ніж *N. sylvestris* (Рис. 1а), а гібриди NpAb-106 та γ NpAb-1 - майже в 10 разів стійкіші, ніж *A. belladonna* (Рис. 1б). Гібриди NN-1 та γ NN-3 характеризувались стійкістю до ТФЛ в 9-10 разів вищою порівняно з *N. sylvestris* (Рис. 2а), а гібриди NA-4 та γ NA-3 мали стійкість в 7-8 разів вищу, ніж *A. belladonna* (Рис. 1б). Підвищена резистентність гібридів до дії АПМ чи ТФЛ порівняно з реципієнтними лініями дає можливість припустити, що гібридні рослини успадкували ознаки стійкості від відповідних мутантів *N. plumbaginifolia*.

II. Характеристика отриманих гібридів

Цитогенетичний аналіз гібридів. В подальшому для отримання прямих доказів щодо гібридної природи відселектованих ліній був проведений цитогенетичний аналіз. При аналізі соматичних гібридів доводиться враховувати те, що в процесі культивування та регенерації рослин, зокрема гібридів, хромосоми можуть зазнавати сильної перебудови та сильно змінюватись порівняно з хромосомами вихідних видів рослин (Кунах, 1979; Larkin & Scowcroft, 1981). В нашому випадку цитогенетичний аналіз полегшувався завдяки тій обставині, що хромосоми рослин *N. plumbaginifolia*, *N. sylvestris* та *A. belladonna* морфологічно дуже відрізняються між собою. Так, диплоїд *N. plumbaginifolia* має 20 телоцентричних або акроцентричних різних за розміром хромосом, тоді як диплоїд *N. sylvestris* має 24 однакових за розміром метацентричних хромосом (Hung et al., 1993). У диплоїдній рослині *A. belladonna* присутні 72 метацентричні хромосоми, в два рази коротші та тонші, ніж хромосоми *N. plumbaginifolia* (Gleba et al., 1988).

З результатів цитогенетичного аналізу видно, що АПМ- (Табл. 2) та ТФЛ-стійкі (Табл. 4) соматичні гібриди *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris*, отримані при симетричному злитті, містять невелику кількість хромосом донорів (за виключенням гібриду NpNs-22) та ди- або тетраплоїдний набір хромосом реципієнту, що свідчить про переважну сегрегацію хромосом *N. plumbaginifolia* в даній комбінації. Ці результати можна розглядати як підтвердження відомих даних про спонтанну елімінацію геному донора *N. plumbaginifolia* (від 33% до 67%) при отриманні високоасиметричних гібридів між *N. plumbaginifolia* та *N. tabacum* без якої-небудь попередньої їх обробки (Agoudgil et al., 1990).

При симетричній гібридизації протопластів *N. plumbaginifolia* та *A. belladonna* були відселектовані морфологічно різні гібриди, які відповідно мали різні набори хромосом (Табл. 2, 4). Так, АПМ- (Табл. 2) та ТФЛ- стійкі (Табл. 4) гібриди, які успадкували морфологію

A. belladonna, містили ди- або тетраплоїдний набір хромосом реципієнту та 1-3 хромосоми донору. Навпаки, гібриди з панелі NpAb-201 - NpAb-204 (морфологічно подібні до тютюну) містили ди- або тетраплоїдний набір хромосом *N. plumbaginifolia* та декілька хромосом беладонни. Наявність різних хромосомних наборів у цих гібридних рослин свідчить про те, що у соматичних гібридів *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* не відбувалось переважної елімінації хромосом того чи іншого батька.

Таблиця 2. Характеристика хромосомних наборів АПМ-стійких соматичних гібридів, отриманих при симетричному злитті

Соматичний гібрид/батько	Хромосомний набір	Кількість хромосом		
		<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>N. sylvestris</i>	<i>A. belladonna</i>
NpNs-1	2n=24-25	1	23-24	
NpNs-2	2n=49-50	1-2	48	
NpNs-4	2n=50	2	48	
NpNs-5	2n=49-50	1-2	48	
NpNs-7	2n=48-50	1-2	47-48	
NpNs-8	2n=25-26	1-2	24	
NpNs-10	2n=25-26	1-2	24	
NpNs-12	2n=32-34	8-10	24	
NpNs-22	2n=44	20	24	
NpAb-106	2n=145-147	1-3		144
NpAb-107	2n=71-75	1-3		70-72
NpAb-202	2n=26	20		5-6
NpAb-204	2n=42	40		2
<i>N. plumbaginifolia</i>	2n=20	20		
<i>N. sylvestris</i>	2n=24		24	
<i>A. belladonna</i>	2n=72			72

Скорочення: NpNs - соматичні гібриди між *N. plumbaginifolia* і *N. sylvestris*,
NpAb - соматичні гібриди між *N. plumbaginifolia* і *A. belladonna*, стійкі до дії АПМ

АПМ- (Табл. 3) та ТФЛ-стійкі (Табл. 5) міжвидові та міжтрибні гібриди, які були отримані внаслідок γ -гібридизації (γ -опромінення використовували для індукції елімінації генетичного матеріалу *N. plumbaginifolia*), містили незначну кількість генетичного матеріалу донорів та ди- або тетраплоїдні набори хромосом реципієнтів.

Таблиця 3. Характеристика хромосомних наборів АПМ-стійких соматичних γ -гібридів

Соматичний гібрид/батько	Хромосомний набір	Кількість хромосом		
		<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>N. sylvestris</i>	<i>A. belladonna</i>
γ PrNs-3	2n=25	1	24	
γ PrNs-4	2n=49-50	1-2	48	
γ PrNs-11	2n=25	2	48	
γ PrNs-16	2n=49-51	1-3	48	
γ PrAb-2	2n=146-149	2-5		144
γ PrAb-4	2n=73-78	1-6		72
γ PrAb-5	2n=147-148	3-4		144
<i>N. plumbaginifolia</i>	2n=20	20		
<i>N. sylvestris</i>	2n=24		24	
<i>A. belladonna</i>	2n=72			72

Скорочення: γ PrNs - соматичні γ -гібриди між *N. plumbaginifolia* та *N. sylvestris*, γ PrAb - соматичні γ -гібриди між *N. plumbaginifolia* та *A. belladonna*, стійкі до дії АПМ

Таблиця 4. Характеристика хромосомних наборів ТФЛ-стійких соматичних гібридів, отриманих при симетричному злитті

Соматичний гібрид/батько	Хромосомний набір	Кількість хромосом		
		<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>N. sylvestris</i>	<i>A. belladonna</i>
NN-1	2n=24-25	1-2	23-24	
NN-3	2n=24-25	1-2	23-24	
NN-4	2n=27	3	24	
NA-1	2n=144-146	2		142-144
NA-2	2n=144-146	2-3		140-142
NA-4	2n=73-74	1-2		72
<i>N. plumbaginifolia</i>	2n=20	20		
<i>N. sylvestris</i>	2n=24		24	
<i>A. belladonna</i>	2n=72			72

Скорочення: NN - соматичний гібрид між *N. plumbaginifolia* та *N. sylvestris*, NA - соматичний гібрид між *N. plumbaginifolia* та *A. belladonna*, стійкі до дії ТФЛ

Таблиця 5. Характеристика хромосомних наборів ТФЛ-стійких соматичних γ -гібридів

Соматичний гібрид/ батько	Хромосомний набір	Кількість хромосом		
		<i>N. plumbaginifolia</i>	<i>N. sylvestris</i>	<i>A. belladonna</i>
γ NN-2	2n=48-50	2	46-48	
γ NN-3	2n=24-25	1-2	23-24	
γ NN-4	2n=48-50	2	46-48	
γ NN-9	2n=27	3	24	
γ NA-1	2n=144-146	2		142-144
γ NA-2	2n=144-146	2		142-144
γ NA-3	2n=73-74	1-2		72
γ NA-4	2n=74-76	2-4		72
<i>N. plumbaginifolia</i>	2n=20	20		
<i>N. sylvestris</i>	2n=24		24	
<i>A. belladonna</i>	2n=72			72

Скорочення: γ NN - соматичний γ -гібрид між *N. plumbaginifolia* та *N. sylvestris*, γ NA - соматичний γ -гібрид між *N. plumbaginifolia* та *A. belladonna*, стійкі до дії ТФЛ

Вивчення фертильності гібридів та успадкування ознак стійкості до АПМ чи ТФЛ в їх першому поколінні. При аналізі фертильності 22 АПМ-і ТФЛ-стійких гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* спочатку були проведені досліді по самозапиленню цих рослин, що дозволило відібрати нефертильні лінії. Як правило, такі гібриди характеризувались великими хромосомними наборами, що, напевно, і було головною причиною їх нездатності до нормального функціонування та утворення репродуктивних органів. Так, серед проаналізованих ліній рослин *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* нефертильними виявились гібриди NpNs-4, NpNs-5, NpNs-7, γ NpNs-16, NN-3, NN-9, γ NN-3, γ NN-4. Всі вони мали тетраплоїдний набір хромосом реципієнта та 1-3 хромосоми *N. plumbaginifolia*, за виключенням гібриду γ NN-3 (2n=24-25). Остатній мав редуковану квітку (з аномально розвинутою маточкою), наслідком чого була його повна нездатність до запилення. Серед проаналізованих ліній в комбінації *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* нефертильними виявились гібриди NpAb-204, γ NpAb-2, γ NpAb-5, NA-1, NA-2, γ NA-1, γ NA-2, гепоми яких містили 144-149 хромосом (за виключенням гібриду NpAb-204, який мав 42 хромосоми: 2 хромосоми від беладонни та 40 хромосом від тютюну). Гібридні рослини, які

виявились фертильними при самозапиленні, в подальшому зворотно запилювались відповідною реципіентною лінією (*N. sylvestris* чи *A. belladonna*). У гібридів NpAb-107 та NA-1 після схрещування з беладошною не вдалось отримати насіння.

Для вивчення успадкування стійкості до АПМ та ТФЛ в першому поколінні гібридних рослин було проведено аналіз схожості насіння, отриманого від самозапилення та зворотнього запилення фертильних гібридів, на середовищах з селективними концентраціями гербіцидів (5 мкМ або 12 мкМ ТФЛ) (Табл. 6). Процент схожості насіння від самозапилення у проаналізованих гібридів на середовищах без гербіцидів складав від 56,8% до 93,4%, з АПМ чи ТФЛ - від 43,2% до 78,2% (для встановлення цих значень висаджували не менше 300 насінин кожного гібриду). Процент схожості насіння гібридів від зворотнього запилення з *N. sylvestris* або, відповідно, з *A. belladonna* на середовищах без гербіцидів складав 32,7-87,8%, з гербіцидами - 26,7-63,2% (Табл. 6). Очевидно, що ознаки стійкості до гербіцидів передавались в першому поколінні гібридів по складній схемі. Можливо, це пов'язано з аномальним хромосомним статусом гібридів чи відсутністю в деяких випадках гомологічної пари перенесених хромосом від *N. plumbaginifolia*, або ж зі складними порушеннями, які можуть відбуватися під час мейотичного поділу клітин в репродуктивних органах. Таким чином, ознака стійкості у фертильних АПМ- та ТФЛ-резистентних гібридів може успадковуватись в першому поколінні цих рослин.

Таблиця 6. Схожість насіння АПМ- та ТФЛ-стійких соматичних гібридів в присутності селективних концентрацій гербіцидів

Гібриди	Схожість насіння		Зворотнє запилення (з реципіентом)	
	Самозапилення		без гербіциду	з гербіцидом
	без гербіциду	з гербіцидом	без гербіциду	з гербіцидом
NpNs-1	90,1%	70,8%	87,8%	63,2%
NpNs-8	93,4%	78,2%	54,2%	33,8%
γNpNs-3	84,3%	72,8%	75,6%	58,9%
γNpNs-11	56,8%	43,2%	32,7%	26,7%
NpAb-107	78,4%	53,4%	-	-
NN-1	85,4%	62,8%	-	-
γNA-3	91,7%	75,4%	64,7%	49,8%

III. Докази природи стійкості гібридів

Аналіз гібридів за допомогою імунофлюоресцентної мікроскопії. Відомо, що хоча АПМ і ТФЛ належать до хімічно різних класів гербіцидів, вони характеризуються однаковими симптомами враження рослин та схожими механізмами дії: порушенням розвитку меристеми коренів та пагонів (Appleby & Valverde, 1989), що являється результатом деполімеризації сітки мікротрубочок після їх дії (Morejohn & Fosket, 1991). Відомо, що гербіциди цих двох класів зв'язуються з ізольованим тубуліном рослин та інгібують збирання рослинних мікротрубочок *in vitro* (Morejohn & Fosket, 1991). Тому для з'ясування стійкості мікротрубочок до дії АПМ чи ТФЛ в отриманих гібридах *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* проводили імунофлюоресцентну мікроскопію з метою візуалізації цих структур в інтерфазних та мітотичних клітинах після їх обробки даними гербіцидами.

При аналізі міжвидових гібридів та батьківських форм було встановлено, що кортикальні мікротрубочки протопластів АПМ-стійкої мутантної лінії *N. plumbaginifolia* та отриманих гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris*, стійких до АПМ, зберігали свою нативну структуру після обробки 5 мкМ АПМ на протязі 2 год (Рис. 3б, 3д - для гібриду $\gamma\text{NrNs-3}$). Аналогічні результати для вихідного мутанту вже були представлені раніше (Страшнюк, 1993). Було показано, що стабільність сітки мікротрубочок мутанту до даної речовини пов'язана з появою зміненої субодиноці β -тубуліну, що, можливо, є результатом мутації в гені β -тубуліну (Страшнюк, 1993). Кортикальні мікротрубочки протопластів, виділених з *N. sylvestris*, руйнувалися за цих умов (Рис. 3г).

Відомо, що більш чутливими до дії антимікротрубочкових сполук являються мітотичні структури (препрофазна стрічка, веретено поділу, фрагмопласт) (Hoffman & Vaughn, 1994), тому наступним етапом досліджень було вивчення впливу АПМ на регенеровані протопласти гібридних та батьківських рослин. Було показано, що повне руйнування мітотичних веретен регенерованих мезофільних протопластів *N. sylvestris* також виникає при обробці АПМ в концентрації 5 мкМ на протязі 2 год. Однак веретена мутанту та гібридів, як і кортикальні сітки мікротрубочок, за аналогічних умов обробки були резистентними до дії АПМ та зберігали свою нативну форму.

При тестуванні чутливості мікротрубочок протопластів гібридних рослин *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris*, стійких до трифлураліну, було показано, що як і в випадку з ТФЛ-стійкими мутантами *N. plumbaginifolia* (Страшнюк, 1993; Блюм и др., 1996), їх кортикальні та мітотичні мікротрубочки не руйнувалися при обробці 12 мкМ ТФЛ на протязі 2 год. Мікротрубочки протопластів батьківської лінії *N. sylvestris* повністю

деполімеризувалися після дії даної речовини за цих умов. Певне, стійкість мікротрубочок гібридів до дії АПМ чи ТФЛ може бути пов'язана з наявніс-

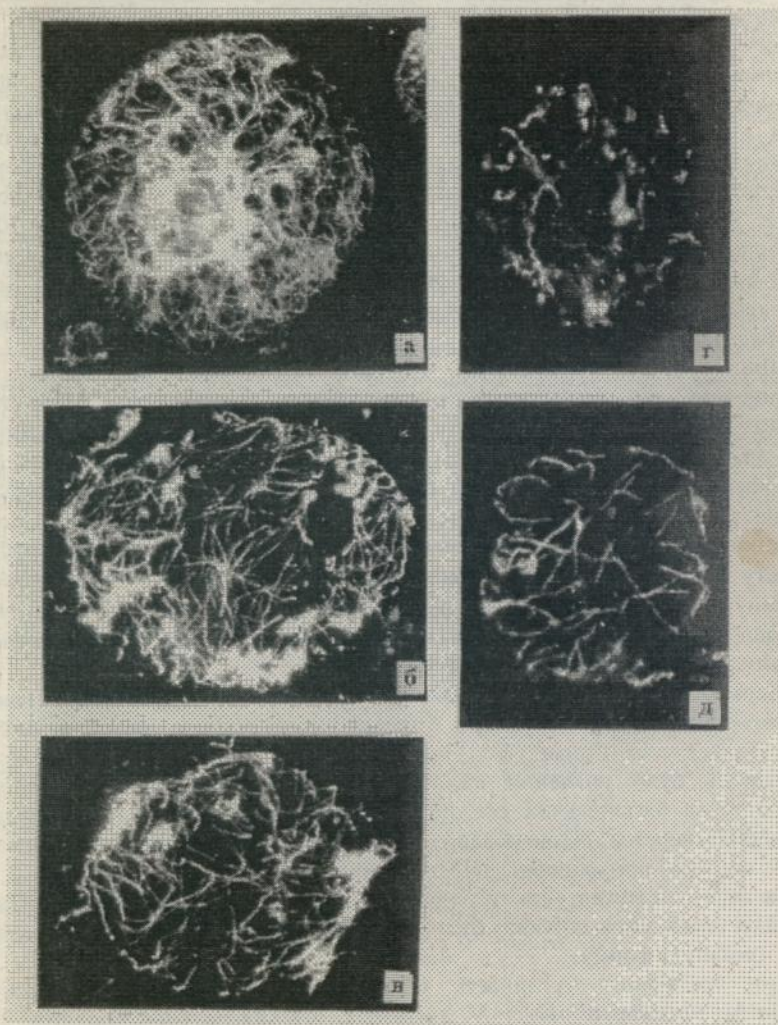


Рис 3. Результати імюфлюоресцентної мікроскопії кортикальних мікротрубочок після їх пофарбування моноклональними антитілами TU-01 в протонластах без обробки (а, б) та після обробки АПМ (в, г, д); а, б - АПМ-стійкий мутант *N. plumbaginifolia*; в, г - *N. sylvestris*; д - γ NpNs-3. Масштаб: в 1 см - 20 мкм.

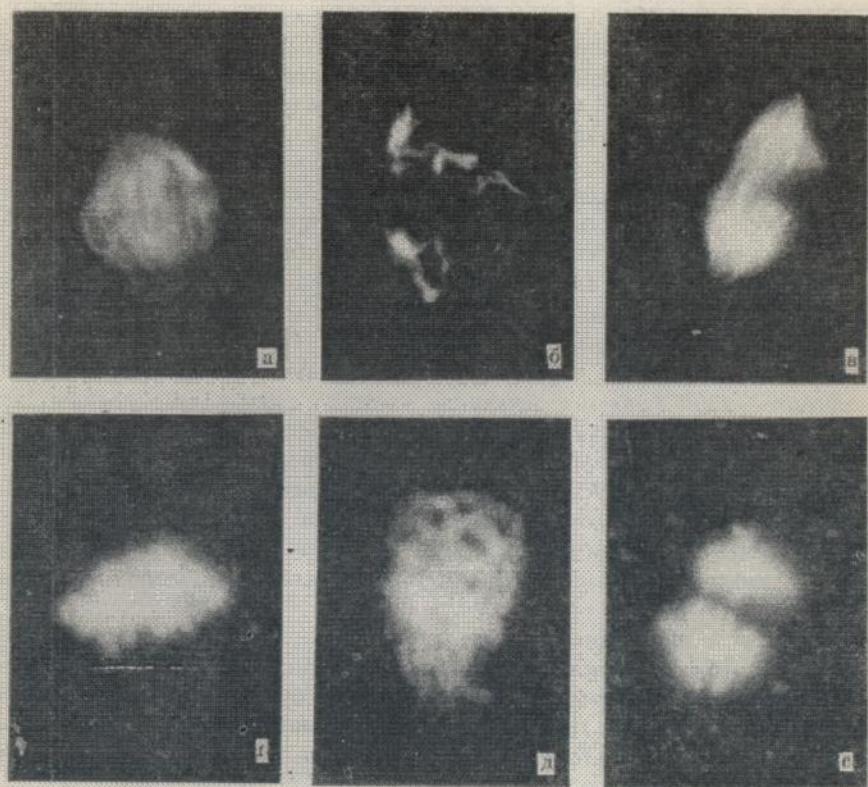


Рис. 4. Результати візуалізації мікротрубочок за допомогою мопоклопальних антитіл TU-01 (а, б, в) та пофарбування ДНК за допомогою Hoechst 33258 (г, д, е) в регенованих протопластах після їх обробки АПМ: а, г - АПМ-стійкий мутант *N. plumbaginifolia*; б, д - *A. belladonna*; в, е - NrAb-107. Масштаб: в 1 см - 10 мкм.

тю мутантного тубуліну, успадкованого від АПМ- або ТФЛ-резистентної рослини *N. plumbaginifolia*, який входить до їх складу.

При аналізі АПМ- або ТФЛ-стійких міжрибних гібридів *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* та батьківської лінії *A. belladonna* було встановлено, що в регенованих протопластах *A. belladonna* після обробки 5 мкМ АПМ або 12 мкМ ТФЛ теж спостерігалось повне руйнування мітотичних мікротрубочок (Рис. 4, зокрема для гібриду NrAb-107). Як видно із Рис. 4 в протопластах АПМ-стійкої лінії *N. plumbaginifolia* та гібриду NrAb-107, що діляться, за даних умов клітини не зупинялися в

прометафазі та зберігали нормальну форму верстена поділу (Рис. 4а, 4в). Протопласти, які аналізувалися, додатково забарвлювали за допомогою Ночст 33258 для детекції положення ДНК в клітинах (Рис. 4г, 4д, 4е).

Із результатів імунофлюоресцентного аналізу можна зробити висновок, що мікротрубочки і кортикальних сіток, і мітотичних структур протопластів АПМ- та ТФЛ-стійких гібридних ліній резистентні до дії даних антимікротрубочкових сполук на відміну від таких реципієнтних ліній (*N. sylvestris*, *A. belladonna*). Отже, стійкість мікротрубочок гібридів могла би бути пояснена наявністю в складі їх мікротрубочок мутантної ізоформи β -субодиниці тубуліну (як у випадку мутантів), яка експресується в результаті переносу мутантного гену β -тубуліну від АПМ- чи ТФЛ-стійкої рослини *N. plumbaginifolia*.

Біохімічний аналіз гібридних ліній. Відомо, що стійкість різних мутантних ліній нижчих еукаріот, клітин ссавців та рослин до антимікротрубочкових сполук забезпечується появою генетичних змін в одній із субодиниць тубуліну (Блюм и Страшнюк, 1993). Як уже згадувалось вище, у АПМ- та ТФЛ-резистентних ліній порівняно з чутливим типом *N. plumbaginifolia* були виявлені зміщення в більш кислу область однієї із ізоформ β -тубуліну (Рис. 5б для АПМ-стійкого мутанту), котра і забезпечувала стійкість мутантних рослин до даних речовин (Страшнюк, 1993).

Для того, щоб проаналізувати наявність мутантної ізоформи β -субодиниці тубуліну в складі мікротрубочок гібридів *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia*+*A. belladonna* був проведений двомірний електрофорез тубуліну гібридних та батьківських рослин з наступним імуоблотингом. Результати цих аналізів дали можливість встановити присутність в гібридах *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia*+*A. belladonna* поряд з ізоформами α - та β -тубулінів реципієнтів додаткової ізоформи β -тубуліну, яка була характерною для мутантів *N. plumbaginifolia*. Положення мутантної ізоформи β -субодиниці тубуліну серед інших ізоформ цього білку у гібрида *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* (№Ab-107), стійкого до АПМ, показано на Рис. 5г. Отже, в кожному із проаналізованих випадків появу цієї додаткової ізоформи β -тубуліну на електрофореграмах тубуліну гібридів слід пов'язувати з переносом мутантного гену β -тубуліну та його експресією від рослини-донора *N. plumbaginifolia*.

Ці дані дають можливість припустити, що отримані нами соматичні гібриди *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі до АПМ чи ТФЛ, успадкували мутантний ген β -тубуліну від відповідної резистентної батьківської лінії *N. plumbaginifolia*, який здатен забезпечувати стійкість гібридів до дії цих антимікротрубочкових сполук.

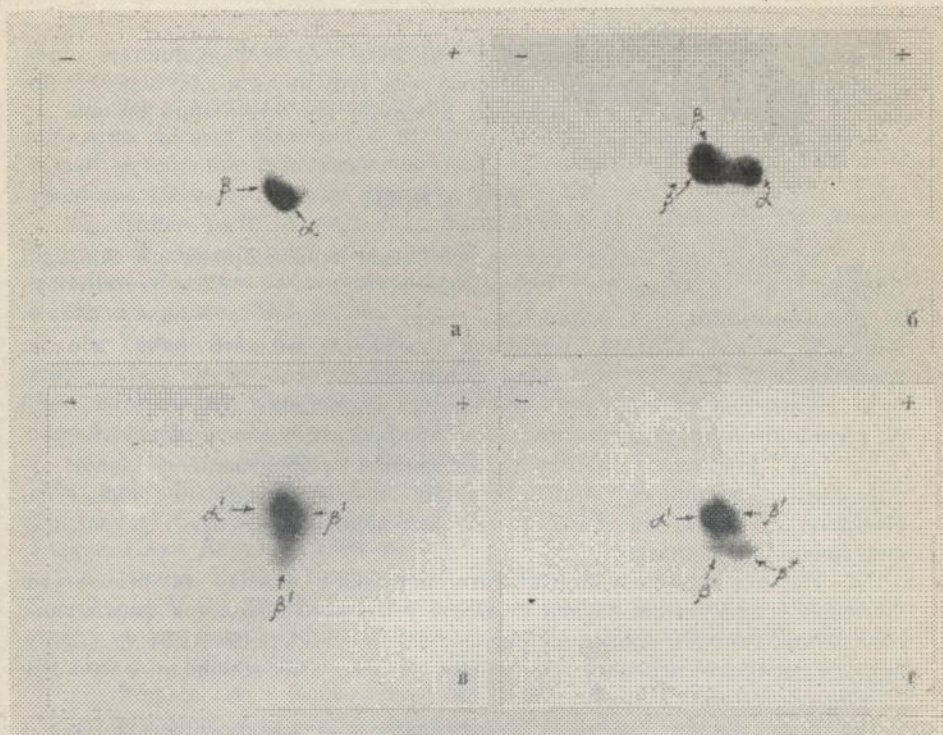


Рис. 5. Результати двовірного електрофорезу тубуліну, виділеного з: а - контрольної рослини *N. plumbaginifolia*, чутливої до АПМ; б - АПМ-стійкого мутанту *N. plumbaginifolia*; в - рослини *A. belladonna*; г - соматичного гібриду *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* (NpAb-107).

Таким чином, нами вперше серед вищих рослин отримані високофункціональні соматичні гібриди *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі до речовин з антимікротрубочковим механізмом дії - аміпрофосметилу (фосфоротіоамідного гербіциду) та трифлураліну (динітроанілінового гербіциду). Дані рослини представляють собою клітинні системи з маркерним білком (мутантна ізоформа β -тубуліну, яка з'являється внаслідок успадкування генетичного матеріалу від *N. plumbaginifolia*) в складі їх гібридних мікротрубочок, котрий відповідає за резистентність до вищеназваних сполук. Результати експериментів дають можливість стверджувати, що оскільки мутантний ген тубуліну, котрий забезпечує стійкість до аміпрофосметилу чи трифлураліну, поки що не ізольований, то перенос цієї ознаки стійкості до інших видів рослин можна здійснювати за допомогою методу соматичної гібридизації. В подальшому, гібриди, які успадкували мінімальну кількість

хромосом від *N. plumbaginifolia*, можуть бути використані для ідентифікації та клонування мутантного гену тубуліну з ціллю перенесення його у важливі сільськогосподарські культури для отримання стійких до даних гербіцидів сортів рослин.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу симетричної соматичної гібридизації отримані гібриди в комбінаціях *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, стійкі в кожному із випадків або до аміпрофосметилу (АПМ), гербіциду фосфоротіоамідного ряду, або до трифлураліну (ТФЛ), гербіциду динітроанілінового ряду. Ця стійкість була перенесена до гібридних клітин від відповідних батьківських ліній *N. plumbaginifolia*, резистентних до аміпрофосметилу або трифлураліну.

2. За допомогою методу асиметричної гібридизації (шляхом у-опромінення донорних ліній) отримані високоасиметричні гібриди зі стійкістю до АПМ та ТФЛ в тих же комбінаціях, що і в випадку симетричної гібридизації.

3. На підставі результатів цитогенетичного аналізу та результатів вивчення успадкування ознаки стійкості у першого покоління фертильних соматичних гібридів продемонстровано, що їх стійкість до АПМ та ТФЛ є прямим наслідком переносу генетичного матеріалу від відповідних мутантів *N. plumbaginifolia*.

4. Встановлено, що як і кортикальна сітка мікротрубочок, так і мітотичні структури мікротрубочок в протопластах, ізольованих із соматичних гібридів, стійких до гербіцидів з антимікротрубочковим механізмом дії, характеризуються підвищеною стійкістю до АПМ та ТФЛ в кожному окремому випадку. Це дозволяє стверджувати, що як і в випадку батьківських мутантних ліній *N. plumbaginifolia*, стійкість гібридів може бути наслідком генетично обумовлених змін структури мікротрубочок.

5. За допомогою двомірного електрофоретичного аналізу підтверджено, що стійкість окремих гібридів до АПМ і ТФЛ пов'язана з наявністю мутантних ізоформ β -тубуліну, успадкованих від батьківських *N. plumbaginifolia*.

6. Виходячи з результатів соматичної гібридизації запропоновано використання ознаки стійкості до АПМ та ТФЛ як селективних маркерів у соматичній гібридизації рослин, а мутантного β -тубуліну - як маркер для вивчення функціонування систем мікротрубочок в гібридних клітинах.

7. Продемонстрована принципова можливість використання асиметричної гібридизації для переносу ознаки стійкості до гербіцидів з антимікротрубочковим механізмом дії від відповідних мутантних рослин в філогенетично віддалені види вищих рослин.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації

1. Емец А.И., Страшнюк Н.М., Блюм Я.Б. Получение соматических гибридов высших растений с использованием мутантов по тубулину // Новые методы биотехнологии растений: Тез. докл. II Рос. симп. (Пушино, 18-20 мая 1993 г.).-Пушино, Россия, 1993.-с. 138.
2. Blume Ya.B., Yemets A.I., Strashnyuk N.M., Gleba Yu.Yu. Somatic hybrids of higher plants with mutant beta-tubulin // Abstr. of XV Int. Botanical Congress (Yokohama, Japan, August 28- September 3, 1993).-Yokohama, Japan, 1993.-p.550.
3. Yemets A.I., Kundelchuk O.P., Blume Y.B., Gleba Y.Y. Asymmetric somatic hybrids using β -tubulin mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* // Abstr.of VIII Int. Congress of Plant Tissue & Cell Culture (Firenze, Italy, June 12-17, 1994).-Firenze, Italy, 1994.-p. 101.
4. Yemets A., Rudas V., Strashnyuk N., Blume Ya.B. Symmetric hybrids using β -tubulin mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* // Abstr. of IV Eur. Congress of Cell Biology (Prague, Czech Republic, June 26 - July 1, 1994).-Prague, Czech Republic, 1994.-p. 448.
5. Blume Ya.B., Yemets A.I., Kundel'chuk O.P., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Strashnyuk N.M. Somatic hybrids with mutant tubulin // Abstr. of Int. Symp. "Plant Biotech. & Genet. Engineering" (Kiev, Ukraine, October 3-6, 1994).-Kiev, Ukraine, 1994.-p. 9.
6. Yemets A., Rudas V., Smertenko A., Blume Ya.B. (1994) Characterization of symmetric hybrids with mutant β -tubulin // Abstr. of Int. Symp. "Plant Mol. Biol. & Biotech." (New Delhi, December 14-17, 1994).-New Delhi, India, 1994.-p. 38.
7. Yemets A., Solodushko V., Smertenko A., Kundelchuk O., Blume Ya.B. Antimicrotubular drug-resistant plants and their somatic hybrids with mutant β -tubulin // Abstr. of 10th Eur. Cytoskeletal Forum (Stockholm, Sweden, May 27-31, 1995).-Stockholm, Sweden, 1995.-p.71.
8. Yemets A.I., Smertenko A.P., Solodushko V.G., Kundelchuk O.P., Blume Ya.B. Asymmetric somatic hybrids with mutant β -tubulin resistant to aminophosphomethyl // Proc. of Int. Symp. Plant Mol. Biol. & Biotech., New Delhi. 1995.-P. 45-51.
9. Blume Ya.B., Kundel'chuk O.P., Solodushko V.G., Sulimenko V.V., Yemets A.I. Asymmetric somatic hybrids of higher plants resistant to trifluralin // Proc. of Int. Symp. on Weed & Crop Resistance to Herbicides, Kluwer Academic Publishers. 1995.-P. 66-68.
10. Емец А.И., Кундельчук О.П., Смертенко А.П., Солодушко В.Г., Блюм Я.Б., Глеба Ю.Ю. Соматические гибриды высших растений с использованием мутанта *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивого к аминпрофосметилу // Генетика.-1996.-N 7.-С. 79-81.

11. Емец А.И., Блюм Я.Б., Смертенко А.П., Кундельчук О.Р., Рудас В.А., Глеба Ю.Ю. Получение γ -гибридов высших растений с мутантным β -тубулином // Доклады Академии наук (Россия).-1996, в печати.

Yemets A. I. Somatic hybrids of *Solanaceae* on the basis of *Nicotiana plumbaginifolia* mutants resistant to action of antimicrotubule compounds.

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, 1996.

The results of 11 scientific publications are defended.

As a result of symmetric and asymmetric hybridization high functional *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* and *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* somatic hybrids with the resistance to amiprofosmethyl (phosphorotioamide herbicide) or trifluralin (dinitroaniline herbicide), respectively, were obtained. By genetic, cytogenetic analysis, immunofluorescent microscopy methods and biochemical analysis it was shown that resistance deals with the transfer of mutant tubulin gene, because its product - the mutant β -tubulin isoform - is the component of microtubules of hybrid cells.

Емец А. И. Соматические гибриды Пасленовых на основе мутантов *Nicotiana plumbaginifolia*, устойчивых к действию соединений с антимикротрубочковой активностью.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25 - клеточная биология, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1996.

Защищается 11 научных работ по теме диссертации.

В результате симметричной и асимметричной гибридизации получены высокофункциональные соматические гибриды *N. plumbaginifolia* + *N. sylvestris* и *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna*, устойчивые в каждом из случаев к действию антимикротрубочковых веществ - амипрофосметила (фосфоротиоамидного гербицида) и трифлуралина (динитроанилинового гербицида). С помощью генетического, цитогенетического анализа, методов иммунофлюоресцентной микроскопии и биохимического анализа установлено, что устойчивость связана с переносом мутантного гена тубулина, продукт которого - мутантная изоформа β -тубулина - является составной частью микротрубочек гибридных клеток.

Ключевые слова: микротрубочки, β -тубулин, антимикротрубочковые вещества, устойчивость к гербицидам, амипрофосметил, трифлуралин, перенос устойчивости, соматические гибриды.



U45111

AB 34.243

AB 34.243