

А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ
Институт клеточной биологии и генетической
инженерии НАН Украины

МИКРОПРОТОПЛАСТЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ПЕРЕНОСА ОТДЕЛЬНЫХ ХРОМОСОМ МЕЖДУ НЕСОВМЕСТИМЫМИ ВИДАМИ РАСТЕНИЙ



Рассмотрены перспективы ограниченного переноса генома у растений путем слияния изолированных микропротопластов, содержащих одну или несколько хромосом, с реципиентными протопластами. Проанализирована эффективность использования антимикротрубочковых соединений — фосфоаминов (ампрофосметил и кремарт), динитроанилинов (оризалин), а также пропизаида — и веществ, разрушающих центры организации микротрубочек (гризеофульвин и фенилкарбаматы), для микронуклеации. Рассмотрены преимущества комбинированного применения антимикротрубочковых соединений вместе с цитохалазином В как дестабилизатора актиновых филаментов для повышения выхода микропротопластов. Подведены итоги развития технологии опосредованного микропротопластами переноса хромосом. Рассмотрены примеры успешного переноса отдельных хромосом, опосредованного микропротопластами, от донорской линии картофеля в мезофильные протопласты *Nicotiana tabacum* и реципиентные клетки диких томатов *Lycopersicon peruvianum* с дальнейшей селекцией и регенерацией гибридов. Приведены примеры разработки альтернативных методов частичного переноса генома с использованием микропротопластов, полученных из гамет (микроспор) растений. Обсуждаются преимущества опосредованного микропротопластами переноса хромосом как эффективной технологии парасексуального скрещивания в сравнении с традиционной соматической гибридизацией.

© А.И. ЕМЕЦ, Я.Б. БЛЮМ, 2003

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2003. № 2

Путем трансформации ДНК могут быть перенесены только предварительно идентифицированные и клонированные гены. Полигенные признаки или признаки с неизвестными биохимическими или молекулярными механизмами, например устойчивость к некоторым болезням или стрессам, и прочие экономически важные признаки все еще не поддаются перенесению с помощью методов генетической инженерии. Одновременно и запросы селекционеров относительно переноса таких признаков, как апомиксис (продуцирование семян без половой репродукции) [1, 2], пока что не могут быть реализованы в адекватной мере с помощью классических технологий. Эти трудности возникают из-за половой несовместимости между донорскими дикими полиплоидными видами и культурными видами, проявлений мужской стерильности, слабой закладки семени и низкой частоты встречаемости желаемых признаков у потомков при обратном скрещивании.

С тех пор как удалось перенести специфический фрагмент хромосомы, содержащий доминантный признак устойчивости к ржавчине листьев, от диплоидного *Aegilops umbellulata* к пшенице [3], было осуществлено много попыток манипулирования хромосомами у растений. Это дало толчок развитию методов переноса хромосом от диких видов к культурным и манипуляций мейотическим спариванием хромосом и рекомбинацией [4–6]. Перенос определенной хромосомы от одного вида к другому и прямое получение моносомно дополненных растений представляет новые возможности для передачи экономически важных генов, интрогрессивного скрещивания и анализа эволюции геномов растений у сексуально несовместимых видов растений [7–9].

Соматическая гибридизация оказалась полезным практическим приближением к решению проблемы частичного переноса геномов, генерации новых ядерно-цитоплазматических взаимоотношений, преодолению барьеров половой несовместимости [10, 11]. Для осуществления частичного переноса геномов от донорских видов были развиты методы асимметрической соматической гибридизации. Согласно этой технологии облученные протопласты донора сливаются с интактными протопластами реципиента [12, 13]. Однако не считаясь с тем, что с помощью асимметрической гибридизации иногда удается достичь эффективного переноса одной-двух хромосом [14–16], этот подход далеко не всегда дает

удовлетворительные результаты. Асимметричные гибриды часто характеризуются полиплоидизацией, анеуплоидией, слабым ростом и регенерацией, отсутствием фертильности вследствие генетической громоздкости гибридных геномов и индуцированных облучением генетических повреждений [12, 13, 17, 18]. В связи с этим обеспечение условий для переноса единичных хромосом, которые содержат заданные гены, между связанными, но несовместимыми в половом отношении видами, и получение моносомно дополненных линий, что позволило бы ускорять интрогрессию генов посредством гомологического спаривания хромосом и рекомбинации или других механизмов переноса генов [8, 9, 19, 20], остается актуальной проблемой и по нынешний день.

Практически одновременно со становлением методов соматической гибридизации начали развиваться другие методические подходы к переносу генетического материала в объеме большем, чем конкретный ген (или определенная группа генов), но меньшем, чем гаплоидный геном (как это происходит в случае сексуальной гибридизации). В частности, опосредованного переноса генов можно достичь путем внесения в клетки млекопитающих изолированных метафазных хромосом, если только фрагментированные хромосомы интегрируются в реципиентный геном, хотя очень часто теряются из-за отсутствия селекции [21]. Вопреки всем недостаткам (необязательное сохранение сцепленных генов во время фрагментации хромосом и их дальнейшей интеграции, появление вследствие этого ошибочного сцепления) опосредованный хромосомами перенос генов в значительной степени позволил разрешить проблемы картирования генома человека, в особенности в случае локализации важных генов в непосредственной близости от маркерных генов [22, 23].

В экспериментах с растениями эта методика изначально имела ограниченный успех [24, 25], ибо до сих пор существуют значительные трудности с изолированием, проточной сортировкой и идентификацией хромосом растений. Главной проблемой, возникающей при цитометрических исследованиях и изолировании хромосом растений, является обеспечение эффективной остановки хромосом вследствие метафазного блока соответствующими митотическими токсинами. В частности, осложнения, возникавшие при

первых попытках переноса изолированных растительных хромосом — выделение индивидуальных хромосом для сортировки путем проточной цитометрии [26] и ограничение возможностей эффективного частичного переноса генома путем трансформации метафазными хромосомами [27] — в существенной степени объяснимы сильной ассоциацией хромосом. К нынешнему времени эти проблемы продолжают оставаться значительными, несмотря на постоянный прогресс в их решении [28, 29], хотя за последние годы произошел существенный скачок в развитии методических подходов для изолирования и идентификации индивидуальных хромосом у растений [30].

Перспективной альтернативой для ограниченного переноса генома у растений может быть слияние изолированных микропротопластов, которые содержат одну или несколько хромосом, с реципиентными протопластами. Получение микронуклеированных клеток в культуре клеток животных после их инкубации с колхицином эффективно использовалось на протяжении последней четверти XX столетия [31, 32]. Вследствие такой обработки метафазные хромосомы становятся разбросанными по клетке и деконденсируются индивидуально или в маленькие группы. Ядерная оболочка формируется возле деконденсированных хромосом, образуя микроядра, которые содержат разное количество хромосом на одно ядро. Путем центрифугирования микронуклеированных клеток можно изолировать микроклетки, которые будут содержать интерфазные микроядра с одной или несколькими хромосомами. Опосредуемый микроклетками перенос хромосом элиминирует зависимость от мейоза, уменьшая возможности рекомбинации, и позволяет создавать комбинации между сексуально несовместимыми видами [33]. Использование такого подхода дало возможность достаточно легко осуществлять перенос ограниченного количества хромосом в реципиентные клетки млекопитающих [21, 34, 35]. В дальнейшем метод опосредованного микроядрами переноса хромосом приобрел признание как потенциально полезный не только для переноса индивидуальных хромосом, но и для изучения экспрессии сцепленных и резидентных генов, изолирования и идентификации специфических для хромосом последовательностей рекомбинантной ДНК и

манипуляции специфическими хромосомными фрагментами [36–39]. В итоге этот метод существенно облегчил картирование генов и произвольных последовательностей ДНК на определенных хромосомах генома человека [40] и зарекомендовал себя в качестве мощного подхода в изучении регуляции экспрессии генов в соматических клетках человека [41].

Успешное развитие этого метода для манипуляций с клетками млекопитающих было обусловлено решением трех принципиальных моментов, обеспечивающих высокий уровень митотического блока и массовую индукцию микроядер колхицином или колцемидом в донорских линиях клеток, несущих селективные маркеры; изолирование маленьких микроклеток, которые содержали бы одну или несколько хромосом; эффективное слияние таких микроклеток с целостными клетками реципиентных линий.

Успех процедуры получения микронуклеированных клеток (процент микронуклеированных клеток и степень измельчения ядер) зависит от многих факторов, среди которых митотический индекс популяции клеток, подвергаемых микронуклеации, и эффективность действия ингибитора митоза, являющаяся производной его способности блокировать сборку микротрубочек в клетке. И хотя предшествующая этому этапу синхронизация культуры клеток в определенной степени повышает процент выхода микронуклеированных клеток, более существенно этот показатель улучшается за счет эффективности действия микротрубочкового ингибитора. Хотя колхицин уже давно используется для полиплоидизации растений [42] и широко применяется для метафазного блока их клеток [43, 44], его сродство к тубулину растительного происхождения значительно ниже, чем к тубулину животных [45, 46]. В то же время рядом исследований продемонстрировано, что ампрофосметил (АПМ), принадлежащий к классу фосфороамидных гербицидов, и оризалин, являющийся представителем динитроанилиновых гербицидов, обладают чрезвычайно высоким сродством к тубулину растений и проявляют, соответственно, высокую деполимеризирующую активность в отношении микротрубочек [45–49].

Именно использование АПМ позволило впервые индуцировать образование микроядер в суспензионной культуре клеток *Nicotiana plumbaginifolia*

[50]. Вскоре было описано получение микроядер с помощью обработки АПМ суспензионных культур картофеля (*Solanum tuberosum* L.), моркови (*Daucus carota* L.) и *Haplopappus gracilis* Nutt. [51]. Обработка АПМ клеток *N. plumbaginifolia* результативна в разбросанности метафазных хромосом в цитоплазме, что позволяло осуществить изолирование одиночных хромосом [50]. Собственно говоря, благодаря этим исследованиям и были разработаны экспериментальные условия для массовой индукции образования микроядер путем длительной обработки АПМ, а также для изолирования микроядер из микронуклеированных клеток с последующей их сортировкой при помощи проточной цитометрии. Вследствие обработки АПМ клеток растений на протяжении 5–6 ч разбросанные в цитоплазме метафазные хромосомы деконденсируются и появляются микроядра, а повышение концентрации АПМ до 36 мкМ с одновременным удлинением обработки до 48 ч приводит к увеличению частоты появления микроядер [51, 52]. Было установлено, что эффективность микронуклеации под влиянием АПМ существенно отличается для различных генотипов *N. plumbaginifolia* [50–53].

Оказалось, что эффективность влияния АПМ на образование микроядер в суспензионной культуре *N. plumbaginifolia* зависит не только от продолжительности его действия и концентрации, но и от уровня синхронизации клеточной культуры [54]. Эффективность микронуклеации (т.е. фрагментации ядра внутри интактной клетки), измеряемая в процентах микронуклеированных клеток к общему количеству клеток, была максимальной в случае использования 32 мкМ АПМ и составляла 15 %, а с использованием синхронизации оксимочевинной возрастала и до 30 %.

При дальнейшем выделении микропротопластов эта же группа исследователей использовала добавление в среду инкубации цитохалазина В [54]. Поскольку цитохалазин В относится к наиболее эффективным дестабилизаторам актиновых филаментов, еще раньше его было предложено использовать для микронуклеации клеток млекопитающих [34]. Показано, что усиленная дестабилизация цитоскелета при совместном использовании цитохалазина В и АПМ приводит к существенному увеличению количества микропротопластов вследствие повышенного распада обработанных протопластов при высокоскорост-

ном центрифугировании [54]. При этом после отмывания микропротопласты сохраняли способность формировать микрокалус, что доказывает их жизнеспособность. Приблизительно 40 % субпротопластов содержали количество ДНК, соответствовавшее субгаплоидному набору хромосом, а некоторые из них имели содержимое ДНК, эквивалентное наличию 1–2 хромосом. Использование цитохалазина В для получения микропротопластов *Helianthus* приводило к двукратному увеличению их выхода и позволяло поддерживать микроядра в стабильном состоянии (без слияния и образования реститутивных ядер) [55]. Хотя цитохалазин В обладает ярко выраженным негативным воздействием на регенерацию субпротопластов [56], его использование для получения микропротопластов должно сопровождаться правильным подбором тех его концентраций, которые будут оказывать минимальные эффекты на регенерацию растений [57].

Результаты сравнения микронуклеирующей способности АПМ и оризалина свидетельствуют о том, что в то время как оризалин более эффективно блокирует клетки растений в метафазе, АПМ лучше индуцирует образование микроядер [58]. В другой работе этими же авторами были представлены результаты по изучению влияния АПМ и оризалина в сравнении с колхицином на митотический блок, индукцию микроядер и удвоения хромосом после обработки ими трансформированной быстрорастущей суспензионной линии картофеля [59]. В то время как колхицин проявлял свои свойства при использовании в концентрациях 0,5–5 мМ, АПМ и оризалин блокировали более эффективно клетки в метафазе уже при концентрациях 15–32 мкМ, индуцируя при этом появление микронуклеированных клеток с более высокой частотой и обеспечивая более высокий выход микроядер. В результате анализа содержимого ядерной ДНК с помощью проточной цитофлуориметрии, а также подсчета количества хромосом в митотических клетках после удаления этих веществ и последующего субкультивирования было установлено, что оризалин более эффективно удваивает хромосомы, чем АПМ, не говоря уже о колхицине.

Однако вскоре было установлено, что кремарт (бутамифос, *O*-этил-*O*-(3-метил-6-нитрофенил)-*N*-*sec*-бутилфосфоротиоамидат), также принадлежащий к классу фосфоаминов, является

намного более эффективным индуктором микронуклеации в сравнении с АПМ и оризалином [60]. После обработки суспензионной культуры клеток картофеля кремартом (3,7–15 мкМ) на протяжении 48 ч с последующей инкубацией в смеси целлюлолитических ферментов в присутствии кремарта и цитохалазина В частота микронуклеации повышалась еще значительно в сравнении с показателями, полученными после обработки суспензионных клеток лишь кремартом (3,7–15 мкМ) на протяжении 48 ч. Эффективность микронуклеации кремартом (3,7 мкМ) также была подтверждена авторами в экспериментах на суспензионной культуре *N. plumbaginifolia*. В то же время опыты, проведенные на культуре суспензионных клеток представителя лилейных *Hemerocallis hybrida*, продемонстрировали ограниченные возможности как АПМ, так и кремарта в индукции микронуклеации [61]. Эффективной в этом случае оказалась обработка синхронизированной культуры клеток *H. hybrida* пропизамидом (8 мкМ) в течение 60 ч с добавлением цитохалазина В (20 мкМ) через 20 ч после начала обработки антимикротрубочковым агентом микронуклеации [62].

Поскольку развивающиеся микроспоры наряду с суспензионной культурой клеток являются еще одним потенциальным источником получения микроядер [63, 64], недавно микронуклеирующая эффективность различных типов антимикротрубочковых веществ была впервые детально охарактеризована при обработке развивающихся микроспор из пыльников *Solanum tuberosum* [63]. Как и при обработке соматических клеток, наиболее мощными индукторами микронуклеации оказались АПМ и оризалин (с несколько большим эффектом в случае АПМ при одинаковых концентрациях 25 мкМ). Колхицин и колцемид (концентрация 0,5 мМ) индуцировали образование гаметных микропротопластов в 9–10 раз слабее, чем АПМ. Интересным оказалось то, что достаточно эффективными индукторами микронуклеации оказались гризеофульвин и хлоризопротил-*N*-фенилкарбамат (ХИФК) [63] — вещества, блокирующие митоз за счет разрушения центров организации микротрубочек [45]. В особенности выраженным действием отличался ХИФК (при исследуемой концентрации 100 мкМ), принадлежащий к классу фенилкарбаматных гербицидов. Впоследствии

ХИФК был также успешно использован для получения гаметных микропротопластов из развивающихся микроспор нескольких видов лилий — *Lilium regale*, *L. longiflorum* и *L. speciosum* [64]. В этом случае ХИФК использовался в концентрации 10 мкМ, но длительность обработки микроспороцитов составляла от трех до четырех дней и его микронуклеирующие свойства оказались более предпочтительными по сравнению с АПМ и пропизамидом.

Если ранее гризеофульвин спорадически исследовался в качестве потенциального индуктора образования микроядер в суспензионной культуре клеток *Medicago sativa* [65], то фенилкарбаматные соединения не использовались с этой целью при обработке соматических клеток. Такая попытка была осуществлена нами для индукции микронуклеации в суспензионной культуре гусиной травы *Eleusine indica*, устойчивой к динитроанилинам [66]. Поскольку динитроанилин-устойчивые растения характеризуются перекрестной устойчивостью к фосфоамидам, обработка клеток *E. indica* с помощью АПМ и оризалина была малоэффективной [67]. При обработке суспензии клеток гусиной травы этими веществами в концентрациях 5–200 мкМ микроядра продуцировались в отдельных случаях, а при концентрациях выше 100 мкМ наблюдалось образование лишь реститутивных ядер. Более заметное образование микроядер отмечалось при использовании колхицина в концентрациях, превышающих 0,5 мМ, однако такие высокие концентрации этого антимикротрубочкового агента уже способны приводить к деструкции внутриклеточных структур. Обработка же суспензионной культуры динитроанилин-устойчивой линии *E. indica* изопропил-N-фенилкарбаматом (ИФК) в концентрациях 1–100 мкМ оказалась наиболее эффективной для индукции микроядер в клетках этого растения [67]. При использовании ИФК в концентрациях, превышающих 10 мкМ, наблюдалось образование 5–8 микроядер на клетку, что позволяло эффективно осуществлять выделение микропротопластов.

Таким образом, на сегодняшний день путем последовательных экспериментов установлено, что высокое сродство к растительному тубулину таких соединений, как динитроанилины, фосфоамида, пропизамид и фенилкарбаматы, обеспечивает их способность эффективно ини-

цировать метафазный блок и индуцировать массивную микронуклеацию в суспензионной культуре клеток [60, 62, 64, 67–69] и развивающихся микроспор [63, 64] различных видов растений. Вместе с разработкой эффективных процедур слияния микропротопластов [70] и селекции полученных гибридов [71] эти подходы сделали возможным дальнейшее развитие технологии опосредованного микропротопластами переноса хромосом, кульминационной точкой адаптации которого для растений стала продукция гибридных растений, содержащих одну хромосому картофеля и полный набор хромосом табака (*Nicotiana tabacum*) [70, 72] или помидора (*Lycopersicon esculentum* Mill.) [70] либо содержащих одну хромосому *N. plumbaginifolia* и полный набор хромосом помидора [70]. Эта же процедура была успешно применена для переноса единичной хромосомы от донорской линии картофеля к реципиентным клеткам диких томатов *Lycopersicon peruvianum* с последующей селекцией и регенерацией гибридов [71, 72].

В экспериментах по переносу небольшой части генетического материала (одной или двух хромосом) из микропротопластов клеточной линии *S. tuberosum* к мезофильным протопластам *Nicotiana tabacum* и *L. peruvianum* была использована донорская линия триплоидного картофеля — трансгенного картофеля, содержащего маркерные гены неомизинтрансферазы II (*npt II*) и β-глюкоронидазы (*uid*) [72]. Индукция массивной микронуклеации в донорских суспензионных клетках картофеля осуществлялась с помощью кремарта (7,5 мкМ) на протяжении 48 ч (до ферментативной обработки протопластов) и последующей ферментативной обработки, но уже с одновременным добавлением цитохалазина В (20 мкМ). Протопласты были изолированы из микронуклеированных клеток путем высокоскоростного центрифугирования. Обогащение клеток путем многократного фильтрования сквозь нейлоновые фильтры с последовательно меньшими порами позволило отделить микропротопласты, содержащие одну или две хромосомы, от больших субдиплоидных микропротопластов. Эти микропротопласты использовали для слияния с реципиентными протопластами. Было показано, что внесение небольшой части генома (1–2 хромосомы) и очень маленького количества цитоплазмы (тонкая прослойка возле микроядра)

значительно меньше дестабилизирует клетку-акцептор и оказывает довольно незначительное стрессогенное воздействие, положительно отражающееся на жизнеспособности и морфогенетическом потенциале клетки-акцептора. Это, в свою очередь, является очень важным фактором, так как часто вследствие соматической гибридизации формируются нефертильные растения, не имеющие практической ценности.

В дальнейшем была осуществлена идентификация и молекулярно-генетический анализ трансгенных хромосом картофеля, перенесенных в геном томата путем слияния через микропротопласты [73]. Трансгенные хромосомы картофеля 3 и 5, содержавшие гены *npt II* и *uid*, были идентифицированы в геноме гибридов с *L. peruvianum* при помощи ПДРФ-анализа с использованием специфических для этих хромосом маркеров. Было выявлено, что в донорском геноме картофеля каждый из трех интеграционных сайтов содержал гены *uid*, а два из них — также гены *npt II*. Результаты анализа моносомно дополненных гибридных растений, полученных после слияния с микропротопластами, показали, что каждый с этих трех сайтов локализуется на разных хромосомах картофеля. При этом гибридные растения имели лишь хромосомы, несущие селективный ген устойчивости к канамицину (*npt II*). Путем скрещивания моносомно дополненных гибридных растений с томатом (*L. peruvianum*) была достигнута половая передача донорской хромосомы картофеля, содержащей гены *npt II* и *uid*, в растения первого поколения. Хотя большинство таких растений содержало соответствующую хромосому картофеля, в некоторых случаях гены *npt II* и *uid* оказались интегрированными в геном томата при отсутствии дополнительной хромосомы картофеля.

Впоследствии метод опосредованного микропротопластами переноса хромосом был успешно адаптирован для представителей нескольких семейств двудольных, а также однодольных, а также использован для получения растений подсолнуха (*Helianthus annuus* L.) с экстрахромосомами гигантского подсолнуха (*H. giganteus* L.) или подсолнуха Максимилиана (*H. maximiliani* Schrad.) [55]. Недавно было сообщено о массивном получении микропротопластов из грейпфрута (*Citrus paradisi* Macf.) сорта Ruby Red и из родственного роду *Citrus* L. вида *Swinglea glutinosa*

(Blanco) Merr. путем обработки суспензионных культур клеток с помощью АПМ [57]. При этом порядка 75,2 % микропротопластов содержали одну хромосому, 17,1 % — две хромосомы, 4,6 % — три хромосомы, 2,0 % — четыре. Микропротопласты, полученные из грейпфрута сорта Ruby Red, были слиты с протопластами сладкого апельсина (*C. sinensis* (L.) Osbeck) сорта Succari, а микропротопласты *S. glutinosa* — с протопластами кислого апельсина (*C. aurantium* L.). В результате были получены эмбриониды или культуры суспензионных клеток реципиентных видов, хотя эмбриогенный потенциал продуктов слияния был уменьшен или ингибирован.

Недавно был предложен альтернативный метод частичного переноса генома с использованием микропротопластов, полученных из гамет *S. tuberosum* L. [63]. Хотя данный подход с использованием АПМ как наиболее эффективного индуктора образования микроядер еще не отработан методологически в совершенстве, поскольку в ходе работы был выявлен ряд технических трудностей, связанных, например, с изолированием гаметных протопластов, с повышением уровня синхронизации микроспор и т.п., он имеет перспективы для дальнейшего развития. Такой вывод базируется на том, что выделение гаметных микропротопластов не нуждается в процедуре центрифугирования, так как образованные после обработки АПМ микроядра формируют сразу микроклетки в микроспорах (на стадии тетрад). Поэтому выделение протопластов из микроспор требует лишь энзиматической обработки.

Таким образом, обобщая приведенный в обзоре фактический материал, следует отметить поступательное развитие технологии частичного переноса генетического материала (фактически изолированных метафазных хромосом) растений с использованием явления микронуклеации, базирующегося на образовании микропротопластов с содержимым генетического материала на субгаплоидном уровне. Использование антимикротрубочковых агентов с целью микронуклеации протопластов и последующего получения микропротопластов позволило разработать процедуру опосредованного микропротопластами переноса единичных хромосом. В ближайшем будущем существует достаточно высокая вероятность появления новых соединений с антимикротрубоч-

ковой активностью еще большей эффективности по сравнению с теми, что упомянуты в настоящей работе.

Опосредованный микропротопластами перенос хромосом представляет собой эффективную технологию парасексуального скрещивания для переноса интактных хромосом от одного вида к другому. Этот метод отличается от традиционной соматической гибридизации тем, что в нем во время слияния присутствует только фракция донорского материала. Это позволяет избежать больших затрат времени и многочисленных бек-кроссов, которые необходимы при получении таких линий генеративным методом или путем симметрической соматической гибридизации. Такое преимущество дает основания прогнозировать распространение технологии опосредованного микропротопластами переноса отдельных хромосом и групп хромосом на больший круг растений, имеющих хозяйственную ценность, в частности на представителей однодольных. Но следует признать, что проблема частичного переноса генетического материала с помощью этой технологии состоит не только в получении большого количества субгаплоидных микропротопластов, но также и в получении фертильных моносомно дополненных растений-регенерантов из продуктов слияния протопластов реципиента с микропротопластами донора, т.е. необходимы комплексные подходы к решению этой проблемы с целью ее распространения на больший круг растительных объектов.

Кроме переноса экономически важных признаков (устойчивость к стрессам и заболеваниям), которые контролируются полигенами, расположенными кластерами на определенных хромосомах, или неидентифицированными генами (например, апомиксис или неспецифичная устойчивость), технология слияния через микропротопласты имеет еще и другие экспериментальные преимущества. Ее использование позволяет: 1) конструировать библиотеки ДНК специфических хромосом путем ПЦР-клонирования добавленных хромосомных фрагментов; 2) осуществлять физическое картирование с высокой разделяющей способностью добавленных хромосом с помощью гибридизации *in situ*; 3) проводить идентификацию пространственной организации чужеродных добавленных хромосом в связи с экспрессией генов и трансмиссией.

SUMMARY. The perspectives of restricted plant genome transfer by means of fusion of isolated microprotoplasts containing one or few chromosomes with recipient protoplasts are considered. Efficiency of the usage of antimicrotubular compounds such as phosphoroamidates (amiprophosmethyl and cremart), dinitroanilines (oryzalin) as well as propizamide and microtubule organising center disrupters (griseofulvin and phenylcarbamates) for micronucleation are analyzed. Advantages of the combined usage of antimicrotubular drugs and cytochalasin B as disrupter of actin filaments for enhanced yield of microprotoplasts are considered. Results of subsequent establishment of microprotoplast-mediated chromosome transfer technique is summarized. The examples of successful microprotoplast-mediated transfer of individual chromosomes from a donor potato line into mesophyll protoplasts of *Nicotiana tabacum* and into recipient cells of wild tomato (*Lycopersicon peruvianum*) with subsequent selection and regeneration of hybrids are considered. Development of alternative methods of partial genome transfer using microprotoplasts produced from plant gametes (microspores) is presented. The advantages of microprotoplast-mediated transfer of chromosomes as an efficient technique of parasexual crossing in comparison with traditional somatic hybridization are discussed.

РЕЗЮМЕ. Розглянуто перспективи обмеженого перенесення геному у рослин шляхом злиття ізольованих мікропротопластів, що містять одну або декілька хромосом, з реципієнтними протопластами. Проаналізовано ефективність використання антимікротрубочкових сполук — фосфороамідів (аміпрофосметил та кремарт), динітроанілінів (оризалін), а також припізаміду — та речовин, які руйнують центри організації мікротрубочок (гризеофулвін та фенілкарбамати) для мікронуклеації. Розглянуто переваги комбінованого застосування антимікротрубочкових сполук разом з цитохалазином В як дестабілізатора актинових філаментів для підвищення виходу мікропротопластів. Підведено підсумки розвитку технології опосередкованого мікропротопластами перенесення хромосом. Розглянуто приклади успішного перенесення окремих хромосом, опосередкованого мікропротопластами, від донорської лінії картоплі до мезофільних протопластів *Nicotiana tabacum* та реципієнтних клітин диких томатів *Lycopersicon peruvianum* з подальшою селекцією та регенерацією гібридів. Наведено приклади розробки альтернативних методів часткового переносу геному з використанням мікропротопластів, отриманих із гамет (мікроспор) рослин. Обговорюються переваги опосередкованого мікропротопластами перенесення хромосом як ефективної технології парасексуального схрещування в порівнянні з традиційною соматичною гібридизацією.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hanna W.W. Use of apomixis in cultivar development // Adv. Agron. — 1995. — 54. — P. 333–350.
2. Koltunow A. M., Bicknell R. A., Chaudhury A. M. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilisation // Plant Physiol. — 1995. — 108. — P. 1345–1352.

3. Sears E. R. The transfer of leaf-rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat // Brookhaven Symp. Biol. — 1956. — 9. — P. 1–22.
4. Fedak G. Molecular aids for integration of alien chromatin through wide crosses // Genome. — 1999. — 42. — P. 584–591.
5. Riley R., Chapman V., Johnson R. Introduction of yellow rust resistance of *Aegilops comosa* into wheat by genetically induced homoeologous recombination // Nature. — 1968. — 217. — P. 383–384.
6. Law C.N., Snape J.W., Worland A.J. Intraspecific chromosome manipulation // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. — 1981. — 292. — P. 509–518.
7. Bennett M.D. Parental genome separation in F1 hybrids between grass species // Proc. Kew Chromosome Conference III. Held in Kew, U.K., 1–4 September 1987 / Ed. P.E. Brandham. — London: Her Majesty's Stationary Office, 1988. — P. 195–208.
8. Sybenga J. Genetic manipulation: generative vs somatic // Biotechnology in agriculture and forestry 9. Plant protoplasts and genetic engineering II / Ed. Y.P.S. Bajaj. — Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. — P. 26–53.
9. Sybenga J. Cytogenetics in plant breeding (Monographs on Theoretical and Applied Genetics 17). — Berlin etc.: Springer-Verlag, 1992. — 469 p.
10. Jacobsen E., de Jong J.H., Kamstra S.A., van den Berg P.M.M.M., Ramanna M.S. The first and second backcross progeny of the intergeneric fusion hybrids of potato and tomato after crossing with potato // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 88. — P. 181–186.
11. Waara S., Glimelius K. The potential of somatic hybridization in crop breeding // Euphytica. — 1995. — 85. — P. 217–233.
12. Gleba Y.Y., Hinnisdaels S., Sidorov V.A., Kaleda V.A., Parokonny A.S., Borysuk N.V., Cherep N.N., Negrutiu I., Jacobs M. Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by «gamma fusion» // Theor. Appl. Genet. — 1988. — 75, № 3. — P. 760–766.
13. Famelaer I., Gleba Y.Y., Sidorov V.A., Kaleda V.A., Parokonny A.S., Borysuk N.V., Cherep N.N., Negrutiu I., Jacobs M. Intrageneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Nicotiana sylvestris* obtained by «gamma-fusion» // Plant Sci. — 1989. — 61. — P. 105–117.
14. Емец А.И., Блюм Я.Б. Устойчивость растений к гербицидам с антимикротрубочковым механизмом действия: от природных мутантов к переносу генов // Физиология растений. — 1999. — 46, № 6. — С. 899–907.
15. Baird W.V., Blume Ya.B., Wick S. Cytoskeletal mutants// Plant microtubules — potential targets for biotechnological applications // Ed. P. Nick. — Frankfurt-Berlin: Springer Verlag, 2000. — P. 155–187.
16. Yemets A.I., Kundelchuk O.P., Smertenko A.P., Solodushko V.A., Rudas V.A., Gleba Y.Y., Blume Y.B. Transfer of amiprophosmethyl-resistance from *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridisation // Theor. Appl. Genet. — 2000. — 100, №6. — P. 847–857.
17. Puite K.J., Schaart J.G. Nuclear genomic composition of asymmetric fusion products between irradiated transgenic *Solanum brevidens* and *S. tuberosum*: limited elimination of donor chromosomes and polyploidization of the recipient genome // Theor. Appl. Genet. — 1993. — 86. — P. 237–244.
18. Wijbrandi J., Zabel P., Koornneef M. Restriction fragment length polymorphism analysis of somatic hybrids between *Lycopersicon esculentum* and irradiated *L. peruvianum*: evidence for limited donor genome elimination and extensive chromosome rearrangements // Mol. Gen. Genet. — 1990. — 222. — P. 270–277.
19. Jong J.H. de, Wolters A.M.A., Kok J.M., Verhaar H., Eden J. van. Chromosome pairing and the potential for intergeneric recombination in some hypotetraploid somatic hybrids of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum tuberosum* // Genome. — 1993. — 36. — P. 1032–1041.
20. Jacobsen E., Jong J.H. de, Kamstra S.A., Berg P.M.M.M. van den, Ramanna M.S. Genomic in situ hybridization (GISH) and RFLP analysis for the identification of alien chromosomes in the backcross progeny of potato (+) tomato fusion hybrids // Heredity — 1995. — 74. — P. 250–257.
21. McBride O. W., Peterson J.L. Chromosome-mediated gene transfer in mammalian cells // Ann. Rev. Genet. — 1980. — 14. — P. 321–345.
22. Jonge A.J.R. de, Smit S. de, Kroos M.A., Reuser A.J.J. Cotransfer of synthetic human genes into mouse cells using isolated metaphase chromosomes or cellular DNA // Hum. Genet. — 1985. — 69. — P. 32–38.
23. Porteous D.J. Chromosome mediated gene transfer: a functional assay for complex loci and an aid to human genome mapping // TIG. — 1987. — 7. — P. 177–182.
24. Laat A.A.M. de, Verhoeven H.A., Ramulu K.S. Chromosome transplantation and applications of flow cytometry in plants // Biotechnology in agriculture and forestry. 9. Plant protoplast and genetic engineering II / Ed. P.S. Bajaj. — Heidelberg: Springer-Verlag, 1989. — P. 343–359.
25. Griesbach R.J. Chromosome-mediated transformation via microinjection // Plant Sci. — 1987. — 50. — P. 69–77.
26. Laat A.M.M. de, Blaas J. Flow-cytometric characterization and sorting of plant chromosomes // Theor. Appl. Genet. — 1984. — 67. — P. 463–467.
27. Malberg R.L., Griesbach R.J. The isolation of mitotic and meiotic chromosomes from plant protoplasts // Plant Sci. Lett. — 1980. — 17. — P. 141–147.
28. Li L.J., Arumuganathan K., Rines H.W., Phillips R.L., Riera-Lizarazu O., Sandhu D., Zhou Y., Gill K.S. Flow cytometric sorting of maize chromosome 9 from an oat-maize chromosome addition line // Theor. Appl. Genet. — 2001. — 102, №35. — P. 658–663.
29. Lysak M.A., Cihalikova J., Kubalakova M., Simkova H., Kunzel K., Dolezel J. Flow karyotyping and sorting of mitotic chromosomes of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Chromosome Res. — 1999. — 7. — P. 444.
30. Dolezel J., Lysak M.A., Kubalakova M., Simkova H., Macas J., Lucretti S. Sorting of plant chromosomes // Methods in Cell Biol. Third Edition. — New York: Acad. press, 1995. — Part B. — P. 3–31.
31. Fournier R.E.K., Ruddle F.H. Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese ham-

- ster, and human somatic cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1977. — **74**. — P. 319–323.
32. Sekiguchi T., Shelton K., Ringertz N.R. DNA content of microcells prepared from rat, kangaroo and mouse cells // *Exp. Cell. Res.* — 1978. — **113**. — P. 247–258.
33. Kozac H., Fournier R.E.K., Leinwand L.A., Ruddle F.H. Assignment of the gene governing cellular ouabain resistance to *Mus musculus* chromosome 3 using human/mouse microcell hybrids // *Biochem. Genet.* — 1979. — **17**. — P. 23–34.
34. Fournier R.E.K. A general high-efficiency procedure for production of microcell hybrids // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1981. — **78**. — P. 6349–6353.
35. McNeil C.A., Brown R.L. Genetic manipulation by means of microcell-mediated transfer of normal human chromosomes into recipient mouse cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1980. — **77**. — P. 5394–5398.
36. Dhar V., Searle B.M., Athwal R.S. Transfer of Chinese hamster chromosome 1 to mouse cells and regional assignment of 7 genes: a combination of gene transfer and microcell fusion // *Somat. Cell Mol. Genet.* — 1984. — **10**. — P. 547–559.
37. Falconer M.M., Moran R.G. Complementation mapping in microcell hybrids: localization of Fpgs and Ak-1 on *Mus musculus* chromosomes 2 // *Somat. Cell Genet.* — 1983. — **9**. — P. 69–84.
38. Lugo T.G., Fournier R.E.K. Microcell fusion and mammalian gene transfer // *Gene transfer* / Ed. R. Kucherlapati. — New York: Plenum Publ. Corp., 1986. — P. 79–93.
39. Schultz R.A., Saxon P.J., Glover T.W., Friedberg E.C. Microcell-mediated transfer of a single human chromosome complements xeroderma pigmentosum group A fibroblasts // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1987. — **84**. — P. 4176–4179.
40. Johnson-Pais T.L., Leach R.J. Regional mapping strategies utilizing microcell hybrids // *Meth. Enzym.* — 1996. — **8**. — P. 20–29.
41. Thayer M. J. Regulation of tissue-specific gene expression in microcell hybrids // *Meth. Enzym.* — 1996. — **9**. — P. 30–37.
42. Blakeslee A.F. Redoublement du nombre de chromosomes chez les plantes par traitement chimique. — *C.R. Hebd Seances Acad. Sci.*, 1937. — **205**. — 476 p.
43. Hadlaczy G., Bistray G., Parznovszky T., Dudits D. Mass isolation of plant chromosomes and nuclei // *Planta*. — 1983. — **157**. — P. 278–285.
44. Utrilla J.D., Sans J., Torre C. de la. Colchicine-resistant assembly of tubulin in plant mitosis // *Protoplasma*. — 1989. — **152**. — P. 101–108.
45. Страшинок Н.М., Блюм Я.Б. Получение мутантов по генам белков микротрубочек // *Цитология и генетика*. — 1993. — **27**, № 6. — С. 79–96.
46. Morejohn L.C., Fosket D.E. Tubulins from plants, fungi, and protists: a review // *Cell and molecular biology of the cytoskeleton* / Ed. J.W. Shay. — New York: Plenum Press, 1986. — P. 257–329.
47. Falconer M.M., Seagull R.W. Amiprophos methyl (APM): a rapid, reversible, anti-microtubule agent for plant cell cultures // *Protoplasma* — 1987. — **136**. — P. 118–124.
48. Morejohn L.C., Bureau T.E., Mole-Bajer J., Bajer A.S., Fosket D.E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro // *Planta*. — 1987. — **172**. — P. 252–264.
49. Morejohn L.C., Fosket D.E. Inhibition of plant microtubule polymerization in vitro by the phosphoricamide herbicide amiprophos-methyl // *Science*. — 1984. — **224**. — P. 874–876.
50. Laats A.A.M. de, Verhoeven H.A., Ramulu K. S., Dijkhuis P. Efficient induction by amiprophos-methyl and flow cytometric sorting of micronuclei in *Nicotiana plumbaginifolia* // *Planta*. — 1987. — **172**. — P. 473–478.
51. Ramulu K.S., Verhoeven H.A., Dijkhuis P. Mitotic dynamics of micronuclei induced by amiprophos-methyl and prospects for chromosome-mediated gene transfer in plants // *Theor. Appl. Genet.* — 1988. — **75**. — P. 575–584.
52. Ramulu K.S., Verhoeven H.A., Dijkhuis P., Gilissen L.J.W. Chromosome behaviour and formation of micronuclei after treatment of cell suspension cultures with amiprophos-methyl in various plant species // *Plant Sci.* — 1988. — **56**. — P. 227–237.
53. Ramulu K.S., Verhoeven H.A., Dijkhuis P., Gilissen L.J.W. A comparison of APM-induced micronucleation and influence of some factors in various genotypes of potato and *Nicotiana* // *Plant Sci.* — 1990. — **69**. — P. 123–133.
54. Verhoeven H.A., Ramulu K.S. Isolation and characterization of microprotoplasts from APM-treated suspension cells of *Nicotiana plumbaginifolia* // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — **82**. — P. 346–352.
55. Binsfeld P.C., Wingender R., Schnabl H. Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by microprotoplast fusion in sunflower // *Theor. Appl. Genet.* — 2000. — **101**. — P. 1250–1258.
56. Lorz H., Paszkowski J., Diersks-Ventling C., Potrykus I. Isolation and characterization of cytoplasts and miniprotoplasts derived from protoplasts of cultured cells // *Physiol. Plant.* — 1981. — **53**. — P. 385–391.
57. Louzada E.S., Rio H.S. del, Xia D., Moran-Mirabal J. M. Preparation and fusion of *Citrus* sp. microprotoplasts // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* — 2002. — **127**. — P. 484–488.
58. Verhoeven H. A., Dijkhuis P., Ramulu K. S. Comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia* // *Planta*. — 1990. — **182**. — P. 408–414.
59. Ramulu K.S., Verhoeven H.A., Dijkhuis P. Mitotic blocking, micronucleation and chromosome doubling by oryzalin, amiprophos-methyl and colchicine in potato // *Protoplasma*. — 1991. — **160**. — P. 65–71.
60. Ramulu K.S., Dijkhuis P., Famelaer I., Cardi T., Verhoeven H.A. Cremart: a new chemical for efficient induction of micronuclei in cell and protoplasts for partial genome transfer // *Plant Cell Rep.* — 1994. — **13**. — P. 687–691.
61. Saito H., Nakano M. Partial synchronization of cell division and micronucleation in suspension-cultured cells of *Hemerocallis hybrida*: the effects of hydroxyurea and various spindle toxins // *Breed. Sci.* — 2001. — **51**. — P. 301–307.
62. Saito H., Nakano M. Isolation and characterization of microprotoplasts from propyzamide-treated cell suspen-

- sion culture of *Hemerocallis hybrida* // Breed. Sci. — 2002. — 52. — P. 51–56.
63. Matthews D., Millam S., Wilkinson M.J. Factors influencing the utility of gametic microprotoplasts for partial genome transfer in potato // Plant Cell Rep. — 1999. — 18. — P. 786–790.
64. Saito H., Nakano M. Preparation of microprotoplasts for partial genome transfer via microprotoplast fusion in Liliaceous ornamental plants // JARQ. — 2002. — 36(3). — P. 129–135.
65. Lo Schiavo F., Nuti Ronchi V., Terzi M. Genetic effects of griseofulvin on plant cell cultures // Theor. Appl. Genet. — 1980. — 58. — P. 43–47.
66. Yemets A.I., Klimkina L.A., Tarassenko L.V., Blume Ya.B. Efficient callus formation and plant regeneration from dinitroaniline-resistant and susceptible biotypes of goosegrass [*Eleusine indica* (L.) Gaertn.] // Plant Cell Rep. — 2003. — 21, №6. — P. 503–510.
67. Емец А.І., Табака П., Клімкіна Л.А., Блюм Я.Б. Опоередковане мікропротопластами перенесення окремих хромосом між несумісними видами рослин // Генетика та селекція в Україні на межі тисячоліть : В 4-х т. — Київ, 2001. — Т. 1. — С. 572–580.
68. Ramulu K.S., Dijkhuis P., Famelaer I., Cardi T., Verhoeven H.A. Isolation of subdiploid microprotoplasts for partial genome transfer in plants: enhancement of micronucleation and enrichment of microprotoplasts with one of a few chromosomes // Planta. — 1993. — 190. — P. 190–198.
69. Verhoeven H. A., Ramulu K. S., Gilissen L. J. W., Famelaer I., Dijkhuis P., Blaas J. Partial genome transfer through micronuclei in plants // Acta Bot. Neer. — 1991. — 40. — P. 97–113.
70. Ramulu K.S., Dijkhuis P., Rutgers E., Blaas J., Verbeek W.H.J., Verhoeven H.A., Colijn-Hooymans C.M. Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually incongruent plant species // Euphytica. — 1995. — 85. — P. 255–268.
71. Ramulu K. S., Dijkhuis P., Rutgers E., Blaas J., Krens F.A., Verbeek W. H. J., Colijn-Hooymans C.M., Verhoeven H. A. Intergeneric transfer of partial genome and direct production of monosomic addition plants by microprotoplast fusion // Theor. Appl. Genet. — 1996. — 92. — P. 316–325.
72. Ramulu K. S., Dijkhuis P., Rutgers E., Blaas J., Krens F. A., Dons J. J. M., Colijn-Hooymans C. M., Verhoeven H.A. Microprotoplast-mediated transfer of single specific chromosomes between sexually incompatible plants // Genome. — 1996. — 39. — P. 921–933.
73. Rutgers E., Ramulu K. S., Dijkhuis P., Blaas J., Krens F. A., Verhoeven H. A. Identification and molecular analysis of transgenic potato chromosomes transferred to tomato through microprotoplast fusion // Theor. Appl. Genet. — 1997. — 94. — P. 1053–1059.

Поступила 18.12.02