

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

САХНО Людмила Олександрівна

УДК581.143.5 + 1575.123 + 577.21

ТРАНСГЕНОМНІ (*BRASSICA NAPUS+B.NIGRA*) ТА ТРАНСГЕННІ (*ORYCHOPHRAGMUS VIOLACEUS*) РОСЛИНИ РОДИНИ ХРЕСТОЦВІТИХ

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ- 2003

Дисертацією є рукопис.

**Робота виконана** у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної Академії Наук України.

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук

**Кучук Микола Вікторович,**

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

заст. завідувача відділом генетичної інженерії

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук

**Парій Федір Микитович,**

Інститут цукрових буряків УААН,

провідний науковий співробітник лабораторії селекції цукрових буряків

кандидат біологічних наук

**Спірідонова Катерина Василівна,**

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,

науковий співробітник відділу генетики клітинних популяцій

**Провідна установа:** Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Захист відбудеться 24 квітня 2003 р. о “14” годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Акад. Заболотного, 148

Автореферат розісланий 20 березня 2003 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

Кравець О.А.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Ріпак *Brassica napus* L., що належить до роду *Brassica* родини хрестоцвітих, на сьогодні займає друге місце серед олійних культур по валовому збору рослинної олії в світі (Murphy, 1996). У 2000 році прийнято “Програму вирощування ріпаку в Україні на 2001-2005 роки”. Якщо в 1998 р. ця культура в Україні займала 19,2 тис. га, то в 2000 р. – вже понад 270 тис. га, до 2005 року передбачається довести площу вирощування до 1 млн. 200 тис. га (Пересипкін та ін., 2000).

Ефективна селекційна робота з цією культурою вже не може обійтися без використання біотехнологічних методів дослідження (Puddephat, 1996). Генетичний потенціал сільськогосподарських видів, і, зокрема, ріпаку, обмежений внаслідок окультурення і проведення довготривалого штучного відбору. Для його збагачення використовують гібридизацію як з близькими культурними, так і дикими видами. Метод соматичної гібридизації дозволяє подолати, в більшості випадків, бар’єри статевої несумісності. Серед представників культурних видів, що залучались до соматичної гібридизації з ріпаком, слід назвати капусту броколі *B.oleracea* L.var. *italica* (Kao et al., 1992), гірчицю чорну *B.nigra* (Sjodin, Glimelius, 1989), гірчицю білу *B.hirta* (Primard et al., 1986). Отримати соматичні гібриди між гірчицею чорною і ріпаком промислового сорту вітчизняної селекції важливо як з теоретичної, так і практичної точки зору: можна дослідити міжгеномну взаємодію трьох (А,В,С) геномів роду *Brassica* (U, 1935), поєднаних в одній рослині, і отримати вихідний селекційний матеріал ріпаку, стійкий до грибкових захворювань (Sjodin, Glimelius, 1988).

Серед диких видів, що залучались до соматичної гібридизації з культурними видами хрестоцвітих, можна назвати *Eruca sativa* Lam. (Sikdar et al., 1990), *Thlaspi perfoliatum* (Fahleson et al., 1994), *Diplotaxis catholica* (Kirti et al., 1995), *Lesquerella fendleri*(Gray)Wats (Skarzhinskaya et al., 1996), *Moricandia arvensis* (Toryama et al., 1987, O’Neill et al., 1996), *Capsella bursa-pastoris* (L.)Mediz (Нітовська, 1997, Sigareva, Earle, 1999). *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz. - ще один представник дикої флори, що належить до хрестоцвітих, цікавий тим, що масло з його насіння має чудову якість завдяки підвищеному вмісту олеїнової, лінолевої і пальмітінової кислот і малому вмісту ліноленої та ерукової кислот (Li et al., 1995). Важливим є також те, що статеві гібриди між ріпаком та *O.violaceus* є нестабільними (Li et al., 1995), тому отримання соматичних гібридів стає актуальним.

Одержання генетичномаркованих (хлорофілдефектних та трансформованих з використанням гетерологічної системи транспозонів (*Spm/dSpm* кукурудзи)) рослин *O.violaceus* необхідне для включення цього дикого виду в експерименти з ріпаком. Вони можуть бути використані як для

клонування унікальних генів *O.violaceus*, так і для вивчення системи переносу транспозуючих генів між геномами у нестабільних статевих гібридів *B.napus* і *O.violaceus* (Li et al., 1995).

Таким чином, отримання соматичних гібридів *B.napus+B.nigra* та трансформованих рослин *O.violaceus* дозволить підвищити генетичний потенціал ріпаку для вітчизняної селекції.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дослідження проводились в рамках бюджетних тем відділів цитофізіології та клітинної інженерії (до 2000 року) та генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ (після 2000 року) “Вивчення молекулярно-генетичних процесів в реконструйованих клітинних системах і трансгенних рослинах”, “Вивчення молекулярно-біологічних та генетичних процесів в трансгенних і трансгеномних клітинних лініях та рослинах” та “Дослідження біологічних процесів в генетично модифікованих рослинах”. Наукова робота проводилась також в рамках наукових проєктів пріоритетного напрямку 01.11.00 “Біотехнологія”, в рамках Державної науково-технічної програми 02.12 “Перспективні біотехнології “ Міністерства України у справах науки і технологій.

#### **Мета і задачі дослідження.**

Метою роботи було отримання та вивчення міжвидових соматичних гібридів між ріпаком і гірчицею чорною та хлорофілдефектних і трансформованих рослин *O.violaceus* для їх використання в експериментах з ріпаком в програмах з соматичної та статевої гібридизації.

В завдання роботи входило:

- 1) підібрати умови виділення і культивування протопластів ріпаку сортів вітчизняної селекції та регенерації з них рослин;
- 2) отримати соматичні гібриди між ріпаком і гірчицею чорною та вивчити їх ядерну та пластомну організацію;
- 3) отримати хлорофілдефектні рослини *O.violaceus* як маркерні для соматичної гібридизації;
- 4) підібрати умови виділення і культивування протопластів *O.violaceus* і регенерації з них рослин;
- 5) отримати трансгенні рослини *O.violaceus* шляхом прямого переносу генів за допомогою обробки ПЕГ-ом;
- 6) вивчити активність системи *Spm* транспозонів кукурудзи в трансформованих рослинах.

Об'єкт дослідження – соматична гібридизація та генетична трансформація представників родини хрестоцвітих (*Brassicaceae*).

Предмет дослідження – отримання та морфологічний, біохімічний і цитогенетичний аналізи соматичних гібридів між ріпаком (*Brassica napus* L.) і гірчицею чорною (*B.nigra* L.) і отримання та молекулярно-біологічний і біохімічний аналізи трансгенних рослин *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz.

*Методи дослідження* – методики соматичної гібридизації та генетичної трансформації шляхом прямого переносу генів в протопласти за допомогою ПЕГ, методики морфологічного, цитогенетичного та біохімічного аналізу отриманих соматичних гібридів (вивчення ізозимних спектрів амілази, естерази та аспаратамінотрансферази, вивчення хлДНК за допомогою рестриктних ендонуклеаз), методики аналізу отриманих трансформантів (виділення сумарної рослинної ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, тест на активність -глюкуронідази).

**Наукова новизна.** Вперше підібрано умови культивування протопластів і регенерації з них рослин ріпаку промислових сортів вітчизняної селекції Мар'янівський, Ковалевський, Калинівський та Федорівський.

На основі ріпаку сорту Мар'янівський отримано соматичні гібридні рослини між ріпаком і гірчицею чорною, що поєднують ядерні геноми вихідних форм і мають пластидну ДНК ріпаку.

Вперше підібрано умови культивування протопластів і прискореної регенерації рослин з мезофільних протопластів *O.violaceus* та отримано хлорофілдефектні рослини цього виду.

Вперше одержано трансгенні рослини *O.violaceus* шляхом прямого перенесення генів за допомогою ПЕГ. Показано, що система *Spm* транспозонів кукурудзи є активною в трансформованих рослинах.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблені підходи отримання соматичних гібридів за допомогою злиття протопластів дозволяють значно збагатити генофонд ріпаку та створити унікальний в генетичному відношенні рослинний матеріал, що об'єднує в одній рослині три відомих для роду *Brassica* геноми (A, B, C).

Соматичні гібриди між ріпаком і гірчицею чорною, яка має повню стійкість до захворювання чорної ніжки можуть бути використані в селекційно-генетичних дослідженнях з метою отримання на їх основі ліній і сортів, стійких до цього захворювання.

Гібридні рослини передані до Національного Аграрного Університету для вивчення можливості їх включення в селекційний процес.

Трансгенні рослини *O.violaceus* можуть бути задіяні в програмах з соматичної та статевої гібридизації з культурними видами родини хрестоцвітих (ріпак, гірчиця, капуста).

Хлорофілдефектні рослини *O.violaceus* використано в дослідях з соматичної гібридизації з ріпаком.

**Особистий внесок здобувача** полягає в розробці завдань досліджень, проведенні всіх основних експериментів і дослідів, аналізі літератури, підготовці та написанні наукових статей. Спільно з науковим керівником проведено вибір об'єктів і напрямку досліджень, розробку структури дисертаційної роботи. Генетичну конструкцію, використану в дослідях з трансформації, отримано від В.І.Климюка (Icon Genetics, GmbH - Halle, Biozentrum, Germany).

**Апробація роботи.** Результати досліджень доповідалися на Міжнародній конференції “Биология культивируемых клеток и биотехнология “ (Новосибирск, 1988), II Російському симпозиумі “Новые методы биотехнологии растений” (Пушино, 1993), Міжнародному симпозиумі “Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources“ (Ялта, 2002), Міжнародній науковій конференції “Сучасні проблеми інтродукції рослин та збереження біорізноманіття екосистем” (Чернівці, 2002), VIII конференції молодих вчених “Сучасні напрямки у фізіології та генетиці рослин” (Київ, 2002) та на наукових семінарах відділу цитофізіології та клітинної інженерії (1988-2000), генетичної інженерії (2000-2002).

**Публікації.** За результатами дисертації опубліковано 10 наукових робіт, в тому числі 5 статей у провідних наукових журналах.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація складається із списку умовних скорочень, вступної частини, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, висновків і списку літератури, що містить 292 посилання. Робота викладена на 144 сторінках, включає 14 таблиць та 24 рисунки.

#### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Як вихідний матеріал для досліджень використовували насіння ярого ріпаку (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) промислових сортів вітчизняної селекції Мар'янівський, Ковалевський, Калинівський та озимого ріпаку сорту Федорівський; насіння канадської лінії гірчиці чорної (*Brassica nigra* L.) K-2656; насіння дикого виду *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shultz. (Китай).

**Культивування вихідного матеріалу.** Насіння вводили в культуру *in vitro* за стандартною методикою (Методи культивування растительных объектов *in vitro*. – Киев. – 1988. – Препринт/АН УССР, Институт ботаники; 88.3). Рослини вирощували в асептичних умовах на безгормональному середовищі MS (Murashige and Skoog, 1962) при 16-годинному світловому фотоперіоді, освітленні 3000 – 4000 лк та температурі 23 – 25С. Ріпак та гірчицю чорну розмножували живцюванням, для *O.violaceus* нами запропонована методика регенерування рослин з експлантів черешку листа (Сахно и др., 2002).

**Хлорофілдефектні рослини *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shultz.** Отримання хлорофілдефектних рослин *O.violaceus* проводили в умовах селективного тиску спектиноміцину (500 мг/л) (Zubko, Day, 1998) на середовищі MS з додаванням 1 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК.

**Культивування протопластів *B.napus* і *B.nigra* і соматична гібридизація.** Мезофільні протопласти *B.nigra* та гіпокотильні протопласти *B.napus* виділяли за раніше розробленою методикою (Сахно, Скаржинская, 1990).

Перед злиттям мезофільні протопласти донора (*B.nigra*) опромінювали  $\gamma$ -променями в дозі 500 Гр ( $Co^{60}$ , 0,1 Гр/с), гіпокотильні протопласти реципієнта (*B.napus*) обробляли 10мМ розчином йодацетаміду протягом 20 хв при 4С.

Злиття протопластів проводили за методикою Менцеля (Menczel et al., 1981).

Гіпокотильні протопласти і продукти злиття культивували у рідких модифікованих середовищах Шепарда (Shepard, 1980). Для регенерації рослин отримані калуси переносили на агаризоване поживне середовище MS, яке містило 1 мг/л БАП та 1 мг/л НОК. Рослини-регенеранти укорінювали на безгормональному середовищі MS, потім висаджували в ґрунт.

**Культивування протопластів *O.violaceus*.** Для виділення протопластів *O.violaceus* використовували листя 3–4-тижневих асептично вирощуваних рослин згідно методики, розробленій нами (Сахно и др., 2002). Культивування мезофільних протопластів проводили в рідких середовищах SW1 (Нітовська, 1997), PCN4 (Dovzhenko et al., 1998). Регенерацію рослин здійснювали на декількох агаризованих середовищах MS з 0,2 М манітолом та різними концентраціями БАП та НОК.

**Генетична трансформація.** Генетичну трансформацію мезофільних протопластів *O.violaceus* шляхом обробки ПЕГ в присутності плазмідної ДНК *E.coli* pIC401 здійснювали за методикою Negrutiu et al. (1987) в умовах, запропонованих Зубко и др. (1991).

Генетична конструкція pIC401, що була використана в експериментах з генетичної трансформації, містила селективний *nptII*-ген, репортерний *gus*-ген, структурний *bar*-ген, який знаходився в межах неавтономного транспозону *dSpm*, і *Spm* транспозазу (*SpmTPase*). *Gus*-ген в плазміді був відокремлений від 35S промотора інсерцією *dSpm* елементу і ставав функціональним тільки після *dSpm* транспозиції (рис.1).

Плазмідну ДНК pIC401 з *Echerihia coli* DH10-B виділяли, використовуючи колонки GIAGEN згідно протоколу для виділення дуже низькокопійних плазмід (GIAGEN<sup>R</sup> Plasmid Purification Handbook, 1998).

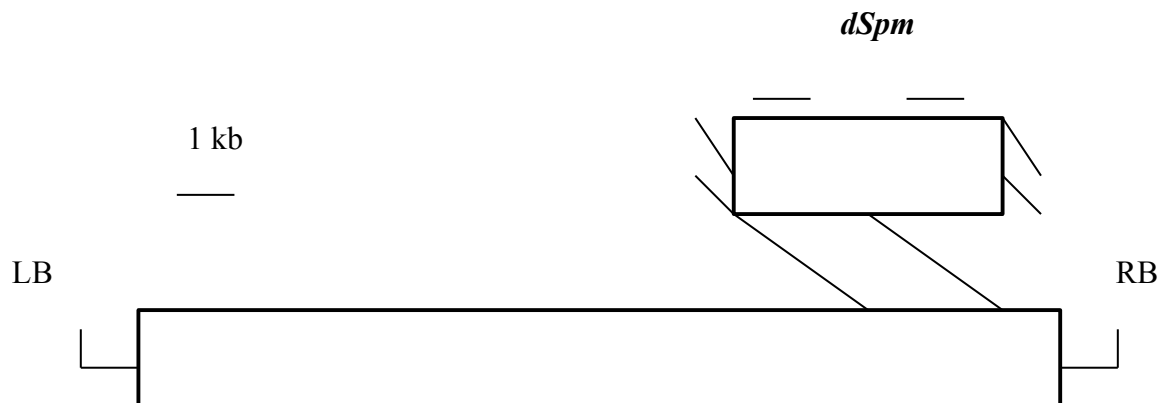


Рис.1. Схема конструкції рІС 401. LB і RB – граничні послідовності Т-ДНК, *nptII* – селективний ген, *dSpm* – неавтономний елемент, в межах якого знаходиться ген *bar*, ген *gus* – маркер процесу транспозиції.

**Аналіз отриманих рослин.** Для підтвердження гібридності рослин-регенерантів, отриманих в експериментах з соматичної гібридизації між ріпаком і гірчицею чорною, проводили аналіз морфологічних ознак, цитогенетичний аналіз, вивчали множинні молекулярні форми естерази, амілази, аспартатамінотрансферази та рестриктні спектри хлоропластної ДНК. Для цього використовували методики, прийняті в нашому Інституті (Биохимический анализ в клеточной биологии растений. – Киев. – 1988. – Препринт /АН УССР, Институт ботаники, 88.1).

Для доказу інтеграції чужорідних генів в геном отриманих рослин-регенерантів *O.violaceus* проводили слідуючі біохімічні та молекулярно-біологічні аналізи: 1) вивчення активності -глюкуронідази. Її визначали, проводячи гістохімічну реакцію за Jefferson (1987); 2) полімеразна ланцюгова реакція. Сумарну рослинну ДНК виділяли з листової тканини за методикою Cheung et al. (1993). Для ПЛР використовували праймери, розроблені Demeke et al. (1999) для гену *npt II* та нами (Сахно и др., 2002) для генів *gus*, *bar*, *Spm* та фрагменту 35S-*gus*, наявність якого підтверджує явище транспозиції.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

### Культивування протопластів ріпаку *B.napus L.*

Для успішного проведення експериментів по соматичній гібридизації потрібно було розробити ефективну методику культивування протопластів та регенерації рослин з протоклонів ріпаку для конкретних сортів вітчизняної селекції, враховуючи те, що регенерація рослин з протопластів залежить від генотипу та умов культивування (Bidney et al., 1983; Glimelius, 1984, Varsby et al., 1986; Pelletier, 1990).

Для виділення протопластів використовували гіпокотилі 5–7-добових проростків. Рідке середовище Sh (Shepard, 1980), яке містило 1 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л НОК та 0,4 мг/л БАП, виявилось найбільш придатним для індукції поділу протопластів та утворення клітинних колоній. Перші поділи спостерігали протягом 24-36 годин (культивування в темноті при 25С), на 4-5 добу ділилось більше 60% клітин. Культивування клітинних колоній проводили в рідких середовищах протягом приблизно 30 діб. За цей час колонії переносили на розсіяне світло та двічі розводили суспензію клітин свіжим поживним середовищем у співвідношенні 1:2, поетапно знижуючи концентрацію ауксинів. Колонії, які досягали розмірів 0,5 – 1,5 мм у діаметрі, переносили на агаризовані регенераційні середовища з різним вмістом і концентраціями фітогормонів для індукції морфогенезу. Найвища частота регенерації для всіх сортів ріпаку спостерігалась на середовищі, що містило 1 мг/л БАП та 1 мг/л НОК.



Рослини-регенеранти мали морфологію та набір хромосом, характерні для вихідних рослин *B.napus*.

Таким чином, нами розроблена ефективна методика культивування гіпокотильних протопластів, яка дозволяє отримувати морфологічно і фізіологічно нормальні рослини ріпаку.

### **Отримання соматичних гібридів між ріпаком (*Brassica napus* L.) та гірчицею чорною (*Brassica nigra* L.).**

Рід *Brassica* характеризується наявністю трьох типів геномів - А, В, С, причому *B.napus* має геном АС, *B.nigra* – геном В (U,1935). Об'єднання трьох геномів в одній рослині важливо з точки зору вивчення міжгеномної взаємодії. Крім того, у гірчиці чорної спостерігається повна природна стійкість до широко розповсюдженої хвороби чорної ніжки, що спричинює гриб *Phoma lingam* (Sjodin et al.1988). Тому гібридні рослини можуть бути корисними і з практичної точки зору.

Перед злиттям протопластів проводили інактивацію протопластів як реципієнта (гіпокотильні протопласти ріпаку обробляли 10 мМ розчином йодацетаміду 20 хв при 4С), так і донора (мезофільні протопласти гірчиці опромінювали  $\gamma$ -променями в дозі 500 Гр). Обробка йодацетамідом дозволяла позбутися розвитку протопластів ріпаку, що не були задіяні в гібридизації. Йодацетамід не викликав швидкої загибелі протопластів, залишаючи їх життєздатними протягом 24-36 годин, але припиняв процес мітотичного поділу клітин. Ефективність поділу мезофільних протопластів гірчиці в даних умовах культивування низька, а обробка гамма-променями зводить її нанівець. Продукти злиття культивували в умовах, ефективних для культивування ізольованих гіпокотильних протопластів ріпаку.

В ході дослідів було отримано 138 калусних клонів, з яких шість регенерували на середовищі Sh з 1мг/л БАП та 1мг/л НОК. Ефективність регенерації становила 4,4%. Рослини-регенеранти були морфологічно нормальними, добре укорінювались і були висаджені в ґрунт в умовах теплиці. Фенотипічно вони були або близькі до ріпаку (лінії *6Bng11*, *6Bng23*, *6Bng27*), або займали проміжне положення (лінії *6Bng4*, *6Bng6*, *6Bng 19*). Морфологія листової пластинки вихідних форм та лінії *6Bng4* представлена на рис.2. Листова пластинка гірчиці чорної в культурі має ланцетовидну форму, рівний край, характерна наявність прилистків. Лист ріпаку має округлу форму, зубчастий край, прилистки відсутні, листова пластинка в 2-3 рази більша, ніж у гірчиці. Рослини-регенеранти ліній *6Bng4*, *6Bng6*, *6Bng 19* мали листя, за розмірами близьке до ріпакового, але форма наблизилась до *B.nigra*, наявні прилистки, зубчатість краю збереглась, але значно менш виражена. Слід відзначити, що всі регенеранти проявляли гетерозис: більш швидкий і потужний ріст, більш інтенсивне зелене забарвлення листя в порівнянні з вихідними формами, що може бути зумовлено їх гібридною природою. Висаджені в ґрунт регенеранти цвіли, утворювали фертильний пилок і насіння при самозапиленні та зворотньому запиленні пилом ріпаку.

Рослини-регенеранти вивчали за допомогою цитогенетичного аналізу. Виявилось, що рослини ліній *6Bng11*, *6Bng23*, *6Bng27* мали число хромосом  $2n=38$ , рослини лінії *6Bng19* -  $2n=54$ , рослини лінії *6Bng6* -  $2n=48$ , рослини лінії *6Bng4* -  $2n=46$ .

Результати аналізу множинних молекулярних форм ферментів амілази, естерази та аспартатамінотрансферази наведено на рис.3. Виявлено, що три лінії - *6Bng4*, *6Bng6*, *6Bng19* – мали форми досліджуваних ферментів, характерні для обох батьківських видів. Подібні результати отримані в роботах по соматичній гібридизації *B.oleracea* та *B.campestris* (Terada et al., 1987, Yamashita et al., 1989), *B.napus* і *B.nigra* (Sjodin and Glimelius, 1989). Три лінії рослин-регенерантів (*6Bng11*, *6Bng23*, *6Bng27*) за досліджуваними характеристиками нагадували ріпак, але відрізнялись від нього інтенсивністю смуг ізоферментів, що може бути наслідком соматональної мінливості в культурі *in vitro* (Larkin, Scowcroft, 1981, Phillips et al., 1994).

При дослідженні хлоропластної ДНК виявилось, що всі проаналізовані клони характеризуються наявністю хлДНК, специфічної для *B.napus*. На рис.4 представлено рестриктні спектри (*BamHI*) хлДНК вихідних рослин та аналізованих клонів.

Сегрегацію хлоропластів після злиття протопластів часто спостерігали в гібридах *Brassicaceae* (Morgan and Maliga 1987, Langren and Glimelius, 1990, Sundberg et al. 1991, Bauer-Weston et al., 1993, Walter and Earle, 1993, Fahleson et al., 1994, Forsberg et al., 1994). Вважають, що спрямованість сегрегації хлоропластів може відображати несумісність ядерно-цитоплазматичних детермінант (Thanh et al., 1988, Perl et al., 1991, Walter and Earle, 1993, Sundberg and Glimelius, 1991). Інші дослідники наголошують на тому, що в гібридних клітинах зберігаються хлоропласти того виду, геном якого переважає в гібридному ядрі (Sjodin and Glimelius, 1989, Wolters et al., 1991; 1993), або виду, для якого розроблялись умови культивування протопластів (Forsberg et al., 1994).

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок про те, що три з проаналізованих клонів рослин-регенерантів (*6Bng4*, *6Bng6*, *6Bng19*) є соматичними гібридами між ріпаком і гірчицею чорною. Вони поєднують ядерні геноми обох батьківських форм, але мають пластом, характерний для ріпаку. Поєднання трьох геномів, які виявлені в роді *Brassica*, в одній рослині, що характерно для отриманих соматичних гібридів *B.napus+B.nigra*, веде до появи морфологічно та фізіологічно нормальних рослин, які проявляють гетерозис: більш швидкий і потужний ріст, більш інтенсивне зелене забарвлення листя в порівнянні з вихідними формами, що може бути зумовлено їх гібридною природою.

#### **Розробка умов культивування *in vitro* для *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shultz.**

Для включення *O.violaceus* в роботу по соматичній гібридизації з культурними видами хрестоцвітих, насамперед, з ріпаком, нами були розроблені методики культивування цього дикого виду в умовах *in vitro*.

*O. violaceus* має розетковий тип росту, тому його важко розмножувати методом живцювання. Іноді спостерігається спонтанне утворення розеток на коренях. Для надійного та швидкого розмноження цієї рослини нами запропоновано підхід по регенерації рослин з експлантів черешку листа. На середовищі MS з 1 мг/л БАП і 0,1 мг/л НОК за 3-4 тижні з на кожному з сегментів черешку листа розміром близько 10 мм формувалось по 6-8 пагонів, що легко укорінювались при перенесенні на безгормональне середовище.

При додаванні в регенераційне середовище антибіотику спектиноміцину було отримано хлорофілдефектні рослини. Після перенесення пагонів на безгормональне середовище без спектиноміцинового тиску частина пагонів відновлювала фотосинтетичну активність, але більшість залишалась хлорофілдефектними. Ці останні були пізніше включені в роботу по соматичній гібридизації з ріпаком. Природа хлорофілдефектності, спричинена спектиноміцином, з'ясована в роботах Зубко (1998, 1999) - це блокування функцій пластидних рибосом.

Виявилось, що при культивуванні мезофільних протопластів *O. violaceus* вдається досягти швидкої регенерації фізіологічно нормальних рослин. Проміжок часу, необхідний для регенерації рослин з протопластів у хрестоцвітих, є досить довгим і сягає 2-11 місяців (Glimelius, 1984; Chuong et al., 1985; Kao, Segum-Swartz, 1987). В випадку *O. violaceus* він суттєво зменшується, перші пагони з'являються вже після трьох тижнів від початку експерименту. Причинами цього можуть бути як вдало підібрані умови культивування, так і особливості *O. violaceus* як об'єкту досліджень.

Перші поділи протопластів спостерігали на 2-3-ю добу на середовищах SW1 (Нітовська, 1997) або Km8rmod (Glimelius, 1984). До кінця першого тижня культивування частота поділів сягала 70-80%. Формування мікроколоній проходило більш інтенсивно при розведенні суспензії свіжим середовищем PCN4 (Dovzhenko et al., 1998). Після двох тижнів від початку експерименту утворювався ембріогенний калус світло-жовтого кольору, який на середовищі MS з 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК та 0,2М манітолом давав початок рослинам-регенерантам. Отримані рослини переносили на безгормональне середовище для подальшого росту. Слід відмітити, що вони легко укорінювались і адаптувались при перенесенні в ґрунт. Рослини-регенеранти зацвітали як в умовах культивування *in vitro*, так і в умовах теплиці. В обох випадках необхідною стадією була яровізація (7С протягом тижня) (Cheng et al., 2002; Luo et al., 2001).

Таким чином, нами розроблено умови виділення та культивування мезофільних протопластів *O. violaceus* та регенерування рослин із сформованого ембріогенного калусу. Запропоновано методику отримання рослин-регенерантів з сегментів черешку листа, отримано хлорофілдефектні рослини при регенерації з черешкових експлантів на середовищах зі спектиноміцином.

**Отримання трансформованих рослин *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shultz. шляхом прямого переносу генів за допомогою ПЕГ та їх молекулярно-біологічний аналіз**

Під час культивування мезофільних протопластів *O. violaceus*, що пройшли обробку ПЕГ-ом в присутності плазмідної ДНК *pIC401*, зі 190 калусних клонів відібрано 14, які розвивалися на середовищі для регенерації з 10 мг/л фосфінотрицину (PPT). З них 11 регенерували у фенотипічно нормальні рослини. Перші регенеранти сформувались приблизно за 6 тижнів від початку експерименту. Відносна ефективність регенерації дорівнювала 5,8%. Наші результати узгоджуються з отриманими в роботах з прямої трансформації протопластів у *Nicotiana tabacum* (Negrutiu et al., 1987), *Arabidopsis thaliana* (Karesch et al., 1991), *B. oleracea* (Mukhopadhyay et al., 1991; Радчук и др., 2000), *B. napus* (Golz et al., 1990).

Слід відзначити, що принциповим для регенерації в умовах селективного тиску фосфінотрицину стала наявність в середовищі буферу (МЕС, 500 мг/л) і проведення першого етапу селекції на розсіяному світлі. Оскільки PPT є інгібітором глютамінсинтетази, що грає ведучу роль в асиміляції аміаку і регуляції метаболізму азоту в рослині, при його застосуванні азотний метаболізм в тканинах порушується, і аміак накопичується в токсичних кількостях. Аміак продукується під час реакцій, які пов'язані з фотосинтетичним електронним транспортом, його накопичення зростає при наявності світла. В цих умовах чутливість рослинних тканин до фосфінотрицину збільшується, що може привести до швидкої загибелі навіть трансформованих клітин (D'Halluin et al., 1992).

Для підтвердження трансгенної природи отриманих рослин-регенерантів були проведені ПЛР з праймерами, специфічними до генів *bar*, *gus*, *Spm* транспозази, *nptII* та до фрагменту *35S-gus*, що є доказом явища транспозиції.

При ампліфікації з праймерами, специфічними до *bar*-гена, показано, що всі проаналізовані клони мали *bar*-ген (рис.5, табл.1).

У семи отриманих клонів детектується сигнал при ампліфікації з праймерами, специфічними для *Spm* транспозази (рис.6,б, табл.1), у шести – з праймерами, специфічними до *gus*-гена (рис.7,а, табл.1). Слід нагадати, що *gus*-ген знаходиться в конструкції (рис.2) в нефункціональному стані, без промотора, і відновлює свою функціональність лише при ексцизії транспозону. При проведенні ПЛР-аналізу з праймерами, один з яких зачіпає промотор, а другий знаходиться на репортерному *gus*-гені, був зареєстрований сигнал, що говорить про те, що відбулась транспозиція у шістьох тестованих клонах (рис.7,б, табл.1).

Наявність *nptII*-гена виявлено у трьох аналізованих клонів (рис.6,а, табл.1).

При проведенні гістохімічної реакції на *gus*-активність виявлено характерне забарвлення листя у шести рослинних ліній (рис.8, табл.1). Це говорить про те, що *Spm/dSpm* система активна в отриманих рослинах і може бути використана для інсерційного мутагенезу. *Gus*-активність

очікувалась ще в одному клоні, який має транспозазу, *gus*-ген і характеризується транспозицією. Відсутність забарвлення є свідченням мовчання перенесеного гена, причин такому явищу може бути декілька (Matzke, Matzke, 1995), насамперед, інактивація за рахунок метилювання.

Табл.1

Молекулярно-біологічний та біохімічний аналізи трансформованих рослин *O.violaceus*

Клон	ПЛР					<i>Gus</i> -активність
	<i>nptII</i>	<i>bar</i>	<i>gus</i>	<i>Spm</i>	Транспозиція	
1	-	+	-	-	-	-
2	-	+	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-	-
4	-	+	+	+	+	-
5	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	-	+	+	+	+	+
8	-	+	-	-	-	-
9	-	+	-	+	-	-
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+

Явище неповного переносу, що спостерігається в даній системі, можна пояснити, з одного боку, особливостями методу прямої трансформації, в процесі якої можуть відбуватися структурні зміни ДНК, яка переноситься (Matzke, Matzke, 1995), з другого – розміром конструкції, що дорівнює 20 kb. Внаслідок цього така велика за розміром плазмідна швидше буде піддаватися руйнуванню порівняно з плазмідами меншого розміру, причому швидше будуть еліминуватися гени, які розташовані далі від правої границі T-ДНК (Hellens et al., 2000, Park et al., 2000).

Таким чином, нами отримано стійкі до фосфінотрицину рослини *O.violaceus* і показано, що у більшості трансгенних рослин спостерігається явище транспозиції *Spm* системи кукурудзи з досить високою частотою (54,5%). Раніше подібна система була розроблена та використана для інсерційного мутагенезу у *Arabidopsis thaliana* (Tissier et al., 1999). Авторами було отримано приблизно 80% трансформантів, які мали інсерції в різні хромосомні сайти. Наші експерименти підтверджують можливість використання даної системи для *O.violaceus*, іншого виду з родини хрестоцвітих.

Для наступної соматичної та статевої гібридизації з культурними видами *Brassicaceae* відібрано 5 клонів *O.violaceus*, які були отримані в ході експериментів з генетичної трансформації мезофільних протопластів. Трансгенні лінії характеризуються наявністю генів *bar*, *gus*, *Spm*

транспозази та у них спостерігається явище транспозиції. Отримані рослини *O.violaceus* дадуть можливість вивчити поведінку *Spm* системи транспозонів у нестабільних статевих гібридів з промисловими видами роду *Brassica*. Їх включення в експерименти з ріпаком дозволить підвищити генетичний потенціал ріпаку сортів вітчизняної селекції.

## ВИСНОВКИ

- 1) Запропоновано ефективну методику культивування гіпокотильних протопластів ріпаку промислових сортів вітчизняної селекції та підібрано умови регенерації рослин.

- 2) Отримано ферильні соматичні гібриди між ріпаком та гірчицею чорною на основі ріпаку вітчизняної селекції (сорт Мар'янівський). З використанням ізоферментного та цитогенетичного аналізів доведено, що регеновані рослини мають ядерний матеріал обох вихідних форм. За допомогою рестриктного аналізу хлДНК показано, що соматичні гібриди *B.napus+B.nigra* мають пластом ріпаку.
- 3) Вперше одержано хлорофілдефектні рослини *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz. при додаванні в регенераційне середовище спектиноміцину в процесі регенерації рослин з сегментів черешку листа.
- 4) Запропоновано ефективну методику культивування мезофільних протопластів *O.violaceus* і підібрано умови регенерації рослин, за яких формування регенерантів відбувається за 3-4 тижні від початку експерименту.
- 5) Вперше отримано трансгенні рослини *O.violaceus* шляхом прямого переносу ДНК в протопласти при використанні обробки ПЕГ-ом. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції та -глюкуронідазної (*gus*) проби доведено інтеграцію чужорідних генів в геном *O.violaceus* та показано активність системи *Spm* транспозонів кукурудзи в трансформованих рослинах *O.violaceus*.

## СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сахно Л.А., Скаржинская М.В. Регенерация растений из изолированных протопластов *Brassica* // Физиология растений. – 1990. – Т.37, № 1. – С.188 – 192.
2. Кириченко И.В., Кучук Н.В., Сахно Л.А., Глеба Ю.Ю. Индивидуальное культивирование растительных протопластов и клеток // Докл. АН УССР. Сер. Б. Геол., хим. и биол. науки. – 1990. - №3. – С.63 – 65.
3. Сахно Л.А., Череп Н.Н., Скаржинская М.В., Глеба Ю.Ю. Соматическая гибридизация в роде *Brassica*: получение гибридов между рапсом (*Brassica napus* L.) и горчицей черной (*Brassica nigra* L.) // Биополимеры и клетка. – 1991. – Т.7, № 5. – С.62 – 65.
4. Сахно Л.А., Василенко М.Ю., Овчаренко О.А., Кучук Н.В. Ускоренная регенерация растений из мезофильных протопластов и сегментов черешка листа *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Schulz. // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т.34, №1. - С.75 – 79.
5. Сахно Л.А., Сытник Е.С., Череп Н.Н., Комарницкий И.К., Кучук Н.В., Климыук В.И. Активность системы Spm транспозонов кукурузы у трансгенных растений *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz, полученных путем как прямого переноса ДНК в протопласты, так и агробактериальной трансформацией корневых эксплантов // Цитология и генетика. – 2002. – Т.36, № 6. – С. 3-8.
6. Скаржинская М.В., Сахно Л.А. Регенерация растений из изолированных протопластов и соматическая гибридизация видов семейства крестоцветных // Международная конференция “Биология культивируемых клеток и биотехнология “. – Новосибирск. - 1988. – С.291.
7. Сахно Л.А., Пастернак Т.П., Гирич А.М., Скаржинская М.В. Генетическая трансформация и соматическая гибридизация в роде *Brassica* // II Российский симпозиум “Новые методы биотехнологии растений”. – Пущино. – 1993. – С.49.
8. Sakhno L.A., Syitnik E.S., Shcherbak N.L., Komarnitskiy I.K., Kuchuk N.V., Klimyuk V.I. Activity of maize Spm-transposon system in transgenic *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz plants obtained either direct DNA uptake of protoplasts or *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation // International Symposium “Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources”. – Yalta (Ukraine). – 2002. – P.75.
9. Сахно Л.О., Кучук М.В. Морфогенез *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz в умовах *in vitro* // Міжнародна наукова конференція “Сучасні проблеми інтродукції рослин та збереження біорізноманіття екосистем”. – Чернівці. - 2002. – С.109-110.



10. Сахно Л.О. Отримання хлорофілдефектних рослин *Orychophragmus violaceus* (L.)O.E.Shultz в умовах *in vitro* // VIII конференція молодих вчених “Сучасні напрямки у фізіології та генетиці рослин”. – Київ. – 2002. – С.74.

**Сахно Л.О. Трансгеномні (*Brassica napus*+*B.nigra*) та трансгенні (*Orychophragmus violaceus*) рослини родини хрестоцвітих. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2003.

За темою дисертації захищається 10 наукових робіт.

Дисертаційна робота охоплює цикл експериментів по отриманню трансгенних і трансгеномних рослин у деяких представників родини хрестоцвітих. Об'єктами досліджень були промислові види *Brassicaceae*: ріпак *Brassica napus* і гірчиця чорна *B.nigra*, а також представник дикої флори - *Orychophragmus violaceus*. В результаті проведених дослідів підібрано умови культивування гіпокотильних протопластів ріпаку та мезофільних протопластів *O.violaceus* і регенерації з них рослин. Отримано соматичні гібриди між ріпаком і гірчицею чорною шляхом злиття при обробці ПЕГ-ом гіпокотильних протопластів ріпаку, оброблених йодацетамідом, і мезофільних протопластів *B.nigra*, опромінених гамма-променями. Регенеранти поєднують ядерні геноми обох батьківських форм (частково або повністю), і мають пластидний геном, характерний для ріпаку. Це доведено за допомогою морфологічного, цитогенетичного та біохімічного (аналіз множинних молекулярних форм ферментів амілази, естерази та аспартатамінотрансферази, аналіз хлДНК за допомогою рестриктних ендонуклеаз) аналізів. Вперше розроблено методику розмноження *O.violaceus* шляхом регенерування пагонів з експлантів черешку листа. В умовах тиску спектиноміцину за запропонованою методикою вперше отримано стабільні хлорофілдефектні рослини цього виду типу “albino”. Розроблена нами методика культивування протопластів *O.violaceus* була використана для отримання трансформованих рослин шляхом прямого переносу генів за допомогою обробки ПЕГ-ом в присутності плазмідної ДНК *E.coli* рIC401. Інтеграцію чужорідних генів (*bar*, *gus*, *nptII*, *Spm* транспозази) і явище транспозиції підтверджено за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Активність гетерологічної (*Spm/dSpm* кукурудзи) системи транспозонів в трансформованих рослинах *O.violaceus* показана за допомогою -глюкуронідазної (*gus*) проби.

Ключові слова: *B.napus*, *B.nigra*, *Orychophragmus violaceus*, протопласт, соматична гібридизація, генетична трансформація, хлорофілдефектність, транспозон, *Spm/dSpm*.

**Сахно Л.А. Трансгеномные (*Brassica napus*+*B.nigra*) и трансгенные (*Orychophragmus violaceus*) растения семейства крестоцветных. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2003.

Диссертация включает цикл экспериментов по получению и анализу трансгеномных и трансгенных растений у некоторых представителей семейства крестоцветных. Объектами исследований были промышленные виды *Brassicaceae*: рапс *Brassica napus* и горчица черная *B.nigra*, а также представитель дикой флоры - *Orychophragmus violaceus*.

Целью работы было получение и анализ межвидовых соматических гибридов между рапсом и горчицей черной, а также хлорофиллдефектных и трансформированных растений *O.violaceus* для их включения в эксперименты с рапсом в программах по соматической и традиционной гибридизации.

Разработана методика культивирования гипокотильных протопластов промышленных сортов рапса селекции Национального Аграрного Университета. Получены соматические гибриды гибридов между рапсом и горчицей черной в результате культивирования продуктов слияния (при обработке ПЕГ-ом) гипокотильных протопластов рапса, инактивированных иодацетамидом, и мезофильных протопластов *B.nigra*, облученных гамма-лучами. Гибридная природа полученных регенерантов подтверждена с помощью морфологического, цитогенетического и биохимического (анализ множественных молекулярных форм ферментов амилазы, эстеразы и аспаратаминотрансферазы и анализ хлДНК с помощью рестриктных эндонуклеаз) анализов. Показано, что соматические гибриды рапса и горчицы черной морфологически и физиологически нормальны, имеют ядерный геном исходных форм (полностью или частично) и пластом рапса.

Впервые разработана методика размножения *O.violaceus* с использованием эксплантов черешка листа. При добавлении в регенерационную среду антибиотика спектиномицина впервые получены стабильные хлорофиллдефектные растения этого вида типа “albino”.

Разработана эффективная методика культивирования мезофильных протопластов *O.violaceus* и подобраны условия регенерации растений, при которых формирование регенерантов происходит в короткий срок - в течение 3-4 недель с начала эксперимента.

Впервые получены трансгенные растения *O.violaceus* путем прямого переноса ДНК в мезофильные протопласты при обработке ПЕГ-ом в присутствии плазмидной ДНК *E.coli* pIC401. Генетическая конструкция pIC401, которая была использована в экспериментах, содержала селективный *nptII*-ген, репортерный *gus*-ген, структурный *bar*-ген, который находился в границах неавтономного транспозона *dSpm*, и *Spm* транспозазу (*SpmTPase*). *Gus*-ген в плазмиде отделен от 35S промотора инсерцией *dSpm* элемента и становился функциональным только после *dSpm* транспозиции.

Интеграция чужеродных генов (*bar*, *gus*, *nptII*, *Spm* транспозазы) и явление транспозиции подтверждены с помощью полимеразной цепной реакции. Показано, что происходит неполный перенос генов. Это может быть объяснено как особенностями метода прямого переноса генов, при котором могут происходить нарушения в структуре ДНК, так и большим размером конструкции (20 kb), что может вызывать элиминацию генов, в первую очередь, расположенных дальше от правой границы вектора.

Активность гетерологичной (*Spm/dSpm* кукурузы) системы транспозонов в трансформированных растениях *O.violaceus* показана с помощью -глюкуронидазной (*gus*) пробы. Отмечено, что у трансгенных растений происходит эксцизия неавтономного *dSpm* транспозона с достаточно высокой частотой (54,5%). Из этого следует, что *Spm/dSpm* система может быть использована для инсерционного мутагенеза. Полученные трансформированные растения дадут возможность изучить поведение *Spm* системы транспозонов у нестабильных половых гибридов *O.violaceus* с сельскохозяйственно важными видами рода *Brassica*. Включение трансгенных растений *O.violaceus* в эксперименты с рапсом позволит увеличить генетический потенциал рапса отечественной селекции.

Ключевые слова: *B.napus*, *B.nigra*, *Orychophragmus violaceus*, протопласт, соматическая гибридизация, генетическая трансформация, хлорофиллдефектность, транспозон, *Spm/dSpm*.

#### Summary

**Sakhno L.O. Transgenomic (*Brassica napus*+*B.nigra*) and transgenic (*Orychophragmus violaceus*) plants of *Brassicaceae*.- Manuscript.**

Thesis for a candidate's degree by speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2003.

The results of 10 scientific publications are defended.

The thesis is devoted to obtaining the transgenomic and transgenic plants in *Brassicaceae*. Commercial species of rapeseed and *Brassica nigra* also wild *Cruciferae* species *Orychophragmus violaceus* are the objects of our investigations. The method for rapeseed protoplast culture of ukrainian varieties was developed. Somatic hybrids were obtained as a result of protoplast fusion between iodacetamide treated hypocotyle protoplasts of rapeseed and -irradiated mesophyll protoplasts of *B.nigra*. Hybrid status of regenerants was confirmed by morphological, cytogenetical and biochemical (isosymes and cpDNA) analyses. Somatic hybrid plants possessed nuclear genomes both *B.napus* and *B.nigra* and rapeseed plastom. Obtained plants are valuable for the purposes of practical selection. The methods for

*O.violaceus* shoot regeneration from petiole explants and mesophyll protoplast cultivation were proposed. For the first time chlorophylldeficient *O.violaceus* plants were obtained as a result of spectinomycin addition to the regeneration medium for petiole explants. For the first time the method for direct gene transfer to mesophyll *O.violaceus* protoplasts has been worked out and transgenic plants have been regenerated. Plasmid construction used in the experiments included selective *nptII* gene, reported *gus* gene serving as an excision marker, structural *bar* gene located within the *dSpm* element and *Spm* transposase. The integration of introduced genes into regenerated plants and transposition event were revealed by polymerase chain reactions. *Gus*-gene activity was confirmed by -glucuronidase probe.

Key words: *B.napus*, *B.nigra*, *Orychophragmus violaceus*, protoplast, hybridization, genetic transformation, chlorophyll deficiency, transposon, *Spm/dSpm*.