

Національна Академія Наук України
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

На правах рукопису

КУЧУК МИКОЛА ВІКТОРОВИЧ

УДК 575.22:577.21:581.143

**ВИКОРИСТАННЯ ПРИЙОМІВ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ І КЛІТИННОЇ
БІОЛОГІЇ ДЛЯ ОТРИМАННЯ НОВИХ ФОРМ У ВИДІВ З РОДИНИ БОБОВИХ І
ДЕЯКИХ ІНШИХ РОСЛИН.**

03.00.22 “Клітинна біологія” 03.00.15 “Генетика”

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Київ 1998

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі клітинної інженерії та цитофізіології рослин Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАНУ та в Ботанічному Інституті Університету м. Мюнхена, ФРН.

Офіційні опоненти

доктор біологічних наук, професор,
член-кор. НАНУ В.А.Кунах, Інститут
молекулярної біології і генетики НАНУ,

зав. відділом

доктор біологічних наук

нафтохімії НАНУ, зав.

А.П.Галкін, Інститут біоорганічної хімії та
лабораторією

доктор біологічних наук

НАН Беларусі, ст. наук. спів.

П.А. Орлов, Інститут цитології і генетики

Провідна організація

Інститут агроєкології і

біотехнології УААН

Захист відбудеться “ 10 ” грудня ” 1998 р. о 14 год. на засіданні Спеціалізованої Вченої Ради Д.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою 252143, Київ, вул. Заболотного 148.

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

Автореферат розісланий “ 30 ” жовтня 1998 р.

Вчений секретар

Спеціалізованої ради,

кандидат біологічних наук

Л.В.Тарасенко

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ.

Актуальність теми. Розвиток генетичної науки призвів до виникнення нової сфери діяльності людини, яка пов'язана зі зміною генетичної конституції живих істот за допомогою нових підходів та технологій, що об'єднані під загальною назвою генетична або генна інженерія. Уже зараз у мікробіологічній та фармацевтичній промисловості, в сільському господарстві використовують штами бактерій, грибів, дріжджів, клітинні лінії рослин та тварин, сорти рослин, які було отримано за допомогою генно-інженерних прийомів. Для багатоклітинних істот, які було змінено таким чином, навіть виникла окрема назва - трансгенні організми. Трансгенні організми - це рослини, риби, тварини, та інші істоти, що несуть в своєму геномі генетичну інформацію, яку було введено за допомогою методів генетичної трансформації. Виникнення трансгенних організмів пов'язано як з розвитком методів власне генної інженерії, тобто технології рекомбінантних ДНК, так і розробкою методів уведення реконструйованої ДНК у живі клітини та регенерації з них фізіологічно нормальних багатоклітинних істот.

Хоча з моменту опублікування перших повідомлень про отримання генетично модифікованих еукаріотичних організмів (англ. GMO) пройшло не більш ніж п'ятнадцять років, за цей час даний науковій напрямок дав основу для створення цілого ряду комерційних фірм, основною метою яких є створення трансгенних істот, які мають цілий ряд нових корисних ознак. Генетично модифіковані сорти рослин вже досліджуються на експериментальних полях, а деякі вже складають значну частину у валовому сільськогосподарському продукті такої країни як США. Так, в 1997р. трансгенні бавовна, соя і кукурудза зайняли 18%, 13% та 9% відповідно всіх посівних площ, на яких вирощувалися ці культури в США. Сучасний розвиток технологій генетичної інженерії дає можливість припустити, що вже до 2005 року світовий ринок продажу тільки насіння трансгенних рослин буде складати близько 6.6 мільярдів доларів для однієї компанії "Monsanto". Деякі інші оцінки ще більш оптимістичні.

Отримання генетично модифікованих рослин для видів з родини бобових завжди було в центрі уваги дослідників, які працюють в галузі молекулярної та клітинної біології рослин. Це визначається рядом причин, серед яких слід зазначити важливість цих видів для виробництва порівняно недорогого рослинного білка. Західна Європа за рахунок власних ресурсів покриває свої потреби в продуктах рослинного походження, що містять білок, лише на 29%. Інша частина імпортується з США, Бразилії, Аргентини у вигляді соєвих бобів. Причому споживання таких продуктів збільшується в середньому на 3% в рік. Помітне місце в постачанні в країни ЄС матеріалів ,що містять білок, займають Україна та Росія, чий

сумарний експорт за оцінкою західних експертів доходив до 1.14 млн. тонн зерна гороху. Але за останні роки ця цифра постійно знижується до 321 тис. тонн в 1997р. Збільшення виробництва бобових культур залежить від ряду умов, однією з яких є широке використання біотехнологічних підходів, зокрема генетичної інженерії рослин для селекції нових високопродуктивних і стійких до хвороб, шкідників та несприятливих чинників навколишнього середовища сортів рослин.

Таким чином, дослідження питань, які пов'язані з вивченням проблем переносу генетичної інформації у вищі рослини; оптимізація прийомів і методів отримання трансгенних рослин у видів з родини бобових і в зв'язку з цим розв'язання деяких проблем культивування протопластів та регенерації рослин з клітинних культур є певно актуальними і мають важливе значення як для кращого розуміння функціонування живих організмів, так і для практичного застосування.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Наукова робота виконувалась в рамках бюджетних тем відділу цитофізіології та клітинної інженерії ІКБГІ НАНУ “Вивчення молекулярно-генетичних процесів у клітинних системах, що реконструювалися, та трансгенних рослинах” і “Вивчення молекулярно- біологічних процесів у трансгенних та трансгеномних клітинних лініях та рослинах”. Дослідження також проводилися в межах наукових проектів пріоритетного напрямку 01.11. 00 Біотехнологія, проектів Державного фонду наукових досліджень, проекту програми підтримки наукових досліджень у країнах колишнього СРСР Міжнародного наукового фонду (ISF), проекту Європейського співтовариства INTAS, проекту Європейського Співтовариства “COPERNICUS”.

Мета та завдання дослідження. Основною метою роботи було отримання та аналіз генетично модифікованих рослин шляхом використання методів генетичної і клітинної інженерії.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- Оптимізувати методи ізолювання та культивування протопластів як найважливішої умови отримання трансгенних та трансгеномних форм рослин.
- Дослідити можливість підвищення регенераційної здатності у деяких видів з родини бобових.
- Оптимізувати умови “прямого переносу генів” і генетичної трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* для видів з родини бобових.
- Оптимізувати методи соматичної гібридизації для видів з родини бобових.
- За допомогою молекулярно-біологічних і біохімічних методів довести присутність чужинного генетичного матеріалу в геномах отриманих рослин.

Наукова новизна отриманих результатів. В результаті проведеної роботи було запропоновано та апробовано оригінальні способи культивування протопластів та протоколи регенерації рослин з протоклонів комерційних сортів люцерни та конюшини. Регенерація рослин у конюшини може бути отримана як шляхом прямого, так і непрямого ембріогенезу, що підтверджено результатами гістологічного аналізу. Ці роботи відкрили можливість отримання нових сортів рослин за допомогою методів соматичної гібридизації та прямого переносу генів в протопласти рослин.

Незалежно від зарубіжних дослідників були розроблені методи генетичної трансформації шляхом електропорації протопластів та отримані трансгенні рослини люцерни та клітинні лінії сої. Молекулярно-біологічний аналіз та аналіз активності ферменту неоміцинофосфотрансферази підтвердив трансгенну природу отриманих ліній.

Вперше був запропонований та апробований метод, що підвищує регенераційну здатність у люцерни та гороху шляхом генетичної трансформації "shooty"-мутантом *Agrobacterium tumefaciens* pGV 2206. В результаті проведених експериментів були отримані трансгенні регенераційні лінії люцерни та гороху, що дозволило запропонувати процедуру "подвійної трансформації", що дає можливість отримувати трансгенні лінії цих бобових культур з генами, які мають практичний інтерес. Цей підхід складається з декількох етапів. Як перший крок пропонується отримати лінії рослин, здатні до регенерації в культурі *in vitro*, за рахунок трансформації генами T-ДНК *A. tumefaciens*. Другий етап - це трансформація отриманих ліній, здатних до регенерації, певним геном, використовуючи методи як агробактеріальної трансформації, так і "прямого переносу генів". Третій етап - відновлення вихідного генотипу, що несе тільки певний ген, що цікавить, за рахунок хромосомної сегрегації в наступних генераціях. Третій етап визначається чисто статистичною можливістю інтеграції генів T-ДНК в різні хромосоми, які обумовлюють здатність до регенерації, і певних генів, що цікавлять, після повторної трансформації. З використанням системи "подвійної трансформації" були отримані трансгенні форми гороху, які містять Ds-елемент кукурудзи, що транспозується. Ці результати відкривають цілком нові перспективи в класичній генетиці такого об'єкту як горох та надають можливість для клонування унікальних генів цієї рослини за допомогою інсерційного мутагенезу.

Запропоновано та апробовано метод генетичної трансформації гороху за допомогою неонкогенних штамів *Agrobacterium tumefaciens*. Отримані трансгенні лінії, які несуть ген стійкості до гербіциду - фосфінотріцину. Для стабільного отримання нащадків у регенерантів гороху було розроблено метод індукції цвітіння та утворення насіння у пагонів гороху в культурі *in vitro*. У трансгенних ліній гороху цим шляхом було отримано нащадків. Молекулярно-біологічний аналіз підтвердив присутність послідовностей ДНК перенесеного

гену в генераціях генетично модифікованого гороху. Таким чином отримані лінії гороху, які мають стійкість до гербіциду, що відкриває нові можливості в селекції такої культурної рослини як горох. Крім того, власне метод розмноження гороху в культурі *in vitro* надає можливість використання методу мікроклонального розмноження для цієї культури. Такий метод широко використовується для розмноження декоративних та деяких сільськогосподарських рослин. Використання цього методу для гороху дозволяє незалежно від кліматичних умов розмножити унікальний селекційний матеріал без зміни його генотипу зі значно більш високим коефіцієнтом розмноження. Так, розрахунки свідчать, що з одного пагону до кінця року можна отримати до 500 000 генетично однорідних рослин при щомісячному коефіцієнті розмноження 3.

Отримано асиметричні соматичні гібриди між видами з родини бобових. Показано можливість використання перенесеного гену неоміцинофосфо-трансферази як генетичного маркера для відбору соматичних гібридів у видів з родини бобових.

У сукупності ці роботи, які проведено на рівні світової новизни, вперше дозволили використати біотехнологічні методи для поліпшення найважливіших сільськогосподарських видів з родини бобових. Крім того, ці дослідження є одними з перших по генетичній інженерії рослин, проведених як в Україні, так і на території колишнього СРСР.

Практичне значення отриманих результатів. Здатна до регенерації лінія люцерни на основі сорту “Весело-Подільська” використовується в наукових дослідженнях і селекційній практиці:

- Інституту цитології і генетики СО РАН (м.Новосибірськ, Росія) - довідка, підписана директором інституту акад. Шумним В. К.
- Полтавським НПО “Еліта” (м.Полтава) - довідка, підписана зам. директора Браженко І. П. і науковим співробітником Йопа А. А.
- ВНДІ кормів ім. В. Р. Вільямса (Московська обл., Росія) - акт передачі за підписами Мазіна В. В. - зав. відділом біотехнології і клітинної селекції, Агафодорової М. Н., с.н.с. і Солодкої Л. А., с.н.с.

Гібридні клітинні лінії використано в наукових дослідженнях:

- Селекційно-генетичного інституту (м.Одеса) - довідка, підписана зам. директора Сергієвим В. В., зав. відділом біотехнології Лук'янюк С. Ф.

Модифіковані лінії гороху передані для випробувань в

- МСКП “Нива” (м.Полтава) - лист, підписаний директором д.б.н. професором М. М. Чекаліним.
- Інститут рослинництва ім. Юрьєва (м.Харків) - лист, підписаний директором Інституту Л. В. Бондаренко та зав. відділом селекції гороху П. М. Чекригіним.

Особистий внесок пошукача. Автором виконано експерименти по оптимізації умов культивування протопластів, регенерації рослин, отриманню трансгенних та трансгеномних ліній. Запропонована ідея та здійснена схема “подвійної трансформації”. Молекулярно-біологічний та цитологічний аналізи проведені разом з співавторами статей, наведеними в авторефераті.

Апробація результатів роботи. Результати роботи доповідалися на наступних міжнародних конгресах, симпозіумах і конференціях:

- XIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture; Amsterdam, The Netherlands, June 24-29, 1990 - стендове повідомлення
- 14 International Conference on Plant Growth Substances; Amsterdam, The Netherlands, July 21-26, 1991 - стендове повідомлення
- All-Union Conference on Trends in Plant Biotechnology; Pushino, Russia, November 20-22, 1991 - доповідь
- 1st Conference on Grain Legumes; Anger, France, June 1-3, 1992- стендове повідомлення
- VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture; Firenze, Italy, June 12-17, 1994 - стендове повідомлення
- IVth European Congress of Cell Biology, Prague, Czech Republic, June 26-July 1, 1994 - стендове повідомлення
- Ith International Symposium on Plant Biotechnology and Genetic Engineering, Kiev, Ukraine, October 3-6, 1994 - доповідь
- Vth International Congress of Plant Molecular Biology, Singapore, 21-27 September, 1997 - стендове повідомлення
- VII International Conference In Vitro Plant Cell Biology, Biotechnology and Germplasm Preservation, Moscow, 25-28 November 1997 - доповідь

Публікації. Наукові результати по темі дисертації опубліковано в 45 друкованих роботах, що включає 1 монографію, 1 авторське свідоцтво СРСР, 1 брошура методичних рекомендацій і 20 статей, виданих в міжнародних, українських і російських (колишніх центральних СРСР) журналах. Монографія, яка має об'єм 8.84 друкованих аркуша, та 3 статті написані без співавторів.

Об'єм та структура роботи. Дисертація, викладена на 284 сторінках машинописного тексту, складається із вступу, двох глав огляду літератури, трьох глав експериментальної роботи, заключення, висновків, матеріалів і методів, списку використаної літератури, ілюстративного додатку. Робота містить 6 таблиць, 29 комбінованих малюнків. Бібліографічний список включає 581 літературних джерел, із них 553 на іноземних мовах.

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ РОСЛИН - ПРЕДСТАВНИКІВ РОДИНИ БОБОВИХ.

„Прямий перенос генів“ шляхом електропорації протопластів у видів з родини бобових. В експериментах по вивченню переносу генів шляхом електропорації були використані протопласти, які виділяли з незрілих зародків сої. Електропорацію проводили за допомогою вдосконаленого нами методу. Виживання протопластів після електропорації склало 50-60%. Культивування протопластів після електропорації проводили за розробленою методикою (Кучук, 1989). Відбір трансформантів здійснювали на поживному середовищі B5, яке містило 1 мг/л кінетину або БАПу з додаванням 50 мг/л канаміцинсульфату. За таких умов було відібрано 21 колонію, які були здатні до подальшого росту та спроможні зеленіти при освітленні. При подальших пасажах на свіжі середовища такого ж складу здатність до росту зберегли 5 колоній.

Аналіз активності неоміцинфосфотрансферази показав присутність цього ферменту у відселектованих клітинних лініях. Блотинг гібридизація за Саузерном виявила наявність послідовностей гену неоміцинфосфотрансферази у клітинних лініях, які було проаналізовано. Ефективність генетичної трансформації склала 1×10^{-5} від числа протопластів, що було використано для генетичної трансформації (Кучук та інш., 1990).

В іншій серії експериментів по електропорації калусних протопластів конюшини лугової були використані аналогічні умови, що і для протопластів сої. При подальшій селекції були відібрані сім клітинних ліній, які зберегли активний ріст в присутності канаміцинсульфату. Аналіз активності неоміцинфосфо-трансферази показав наявність цього ферменту у відібраних клітинних лініях.

Проведені експерименти довели принципову можливість отримання переносу генів у видів з родини бобових шляхом електропорації протопластів. Надалі нам вдалося використати електропорацію протопластів для отримання трансгенних рослин люцерни.

Люцерна північна (*Medicago borealis* L.), найближчий родич люцерни... посівної, є одним з культивованих представників цього виду, особливо в зонах помірного клімату. В одному досліді по електропорації використовували $1-2 \times 10^5$ протопластів люцерни північної, виділених з листя асептично вирощених рослин лінії 94, що була отримана з ВНДІ кормів ім. В. Р. Вільямса, п/о Лугова, Московська обл. Після переносу клітинних колоній люцерни на агаризоване поживне середовище, що містить 50 мг/л канаміцинсульфату, було відібрано 56 клонів, які були здатні до подальшого росту та спроможні зеленіти на світлі. Ці колонії переносили на свіже поживне середовище такого ж складу, і тільки 15 клонів продовжували активно рости. У всіх проаналізованих клітинних колоній була виявлена активність

неоміцинфосфотрансферази. Надалі у п'яти цих клонів на поживному середовищі B5, що містить 0.5 мг/л кінетину і 50 мг/л канаміцинсульфату, було індуковано утворення ембріодів, а після цього і нормальних рослин (Kuchuk et al., 1990).

Проведені нами експерименти вперше показали можливість отримання трансгенних рослин у люцерни шляхом електропорації протопластів. Ця робота досі залишається єдиною, що описує отримання трансгенних рослин цього виду за допомогою електропорації протопластів.

Цікаво відзначити, що в усіх проведених експериментах по електропорації протопластів, ізольованих з рослин видів з родини бобових, кількість канаміцинстійких клітинних клонів, що відбираються спочатку, значно зменшується після перенесення на свіжі поживні середовища того самого складу. Ці результати свідчать про можливість нестабільної інтеграції чужинних генів в геном рослин або ж про їх інактивацію за рахунок різноманітних механізмів, одним з яких може бути метилювання ДНК.

Проведені експерименти по електропорації протопластів видів з родини бобових свідчать про можливість застосування цього методу для генетичної трансформації цих видів, за умови наявності розробленої методики культивування протопластів. Метод електропорації протопластів являє собою один з підходів генетичної трансформації рослин і, хоча він має обмежене застосування, одночасно у нього є і ряд переваг порівняно з трансформацією за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*. Так, застосування цього методу не є видоспецифічним, на відміну від методів, що базуються на використанні "обеззброєних" штамів *A. tumefaciens*, які досить часто бувають авірулентними по відношенню до різноманітних сортів і видів рослин. Окрім трансформації ядра, метод електропорації протопластів можна застосовувати для генетичної трансформації хлоропластної ДНК, що відкриває цілком нові перспективи в отриманні високого рівня експресії чужинних генів в рослині, і одночасно обмежує безконтрольне розповсюдження цих генів з пилом.

Отримання трансгенних рослин люцерни та гороху з підвищеною здатністю до регенерації. В результаті перших на території СРСР експериментів по генетичній трансформації рослин, які були проведені в 1984-1985 роках у відділі цитофізіології та клітинної інженерії Інституту ботаніки, були відпрацьовані методи генетичної трансформації тютюну, основані на використанні *A. tumefaciens* (Кучук та Каневский, 1987).

Надалі експериментальна робота була зосереджена на розробці методів генетичної трансформації і отриманні трансгенних рослин у видів з родини бобових. Проведені дослідження по регенерації рослин у клітинних ліній *Medicago sativa* L. сорту "Веселоподолянская" на різноманітних поживних середовищах були безрезультатними. Для індукції здатності до регенерації у цього сорту люцерни було запропоновано спробувати використати "shooty"-

мутант *Agrobacterium tumefaciens* pGV 2206. Цей мутант був отриманий наприкінці 70-х років в результаті інсерції інактивуючої послідовності, що містить ген бактеріальної стійкості до канаміцину, в район генів синтезу ауксинів T-ДНК октопінового штаму B6 *A. tumefaciens* (Рис. 1). Раніше було встановлено, що після генетичної трансформації тютюну з використанням цього агро-бактеріального штаму, вдалося отримати клітинні лінії, що активно утворювали пагони.

Після спільного культивування експлантів люцерни з "shooty"-мутантом *A. tumefaciens* pGV 2206, були індуковані клітинні лінії на поживному середовищі B5, яке містить 0.2 мг/л 2,4 D і 0.5 мг/л кінетину, а також антибіотики - клафоран та карбеніцилін - для елімінації агробактерій. Клітинні лінії, які утворилися, пересаджували на свіже поживне середовище того самого складу і культивували протягом місяця, а після цього переносили на безгормональне середовище B5. Через місяць вирощування на цьому середовищі клітинні лінії люцерни починали утворювати ембріоподібні структури темно-зеленого кольору. Після пересадки цих структур на свіже поживне середовище того самого складу з відібраних 42 ліній проросли і дали нормальні рослини лише шість. При пересадці на свіжі безгормональні поживні середовища верхівки пагонів, що містять бокові бруньки, були здатні утворювати корені, але цей процес був більш тривалим, ніж при пересадці пагонів вихідного генотипу. В контрольному експерименті при дотриманні всіх умов вирощування, за винятком спільного культивування з "shooty"-мутантом *A. tumefaciens*, на безгормональному поживному середовищі клітинні лінії люцерни жодних ембріодів не утворювали, лише у деяких клонів спостерігали розвиток коренів.

Клітинні культури, індуковані з рослин люцерни, отриманих після регенерації, також зберігали здатність до ембріогенезу. Одержані рослини переносили в ґрунт, де вони цвіли та утворювали життєздатне насіння, яке зберігало при переносі їх в культуру *in vitro* здатність до регенерації рослин.

Для доказу присутності послідовностей T-ДНК плазміді pGV 2206 в рослинах люцерни, які були отримані після регенерації, була проведена Саузерн-блот гібридизація. Як зонд використовували ген стійкості до канаміцину, структурна частина якого була присутня в T-ДНК плазміді PGV2206. В результаті проведених експериментів було показано присутність послідовностей T-ДНК плазміді pGV2206 в геномі відібраних рослин люцерни, що доводить їх трансгенну природу (Kuchuk et al., 1990).

Проведені експерименти дозволили зробити висновок, що здатність до регенерації у трансгенних рослин люцерни могла бути викликана генами T-ДНК "shooty"-мутанта *A. tumefaciens* pGV 2206.

Отримані результати дозволили сформулювати новий підхід для поліпшення регенераційної здатності у рослин з низьким регенераційним потенціалом, полягає в наступному. Запропонований метод, який було названо "подвійною трансформацією", був використаний для трансформації такого важливого сільськогосподарського виду як горох.

В експериментах використовували лінію гороху 1288, що мала певний регенераційний потенціал, але в системі відбору на безгормональному поживному середовищі не виявляла жодних ознак утворення пагонів. Після співкультивування експлантів зі стебла та листків асептично вирощених рослин гороху лінії 1288 з "shooty"-мутантом *A. tumefaciens* pGV 2206 на поживному середовищі B5, що містить фітогормони (2.4 Д та БАП) було індуковано калус. Через один місяць культивування калус, що утворився, був пересаджений на безгормональне поживне середовище. В деяких ділянках калусної тканини почали утворюватися осередки регенерації у вигляді темно-зелених крапок. При подальшій пересадці ці осередки утворили клітинні лінії, які стабільно утворювали пагони. Таким чином вдалося відібрати 12 ліній гороху, здатних до регенерації, які постійно утворюють регенеранти на протязі тривалого часу. Так, одна з цих первинно отриманих ліній підтримується без втрати регенераційної здатності протягом восьми років. Молекулярно-біологічний аналіз з використанням блот-гібридизації за Саузерном показав присутність послідовностей T-ДНК у геномі відібраних регенераційних ліній гороху (Зубко та інш., 1990).

Досліджуючи можливість застосування запропонованої нами методики по індукції регенераційної здатності у гороху після співкультивування з "shooty"-мутантом *A. tumefaciens*, в експериментах по генетичній трансформації були використані вісім сортових ліній голландської селекції, отриманих від фірми "Nunhems Zaden" (Нідерланди). Після співкультивування рослинних експлантів з "shooty"-мутантом *A. tumefaciens* pGV 2206 нам вдалося у трьох з восьми зразків отримати лінії гороху з високою регенераційною активністю. Ці лінії були названі 912097-2206, 912074-2206 і 911136-2206.

На наш погляд, незважаючи на всі обмеження, розроблений метод отримання здатних до регенерації ліній у гороху та люцерни, дозволяє подолати проблеми, пов'язані з труднощами індукції утворення рослин з дедиференційованої тканини в культурі *in vitro*. Цей підхід був успішно застосований для отримання трансгенних рослин гороху, що несуть різноманітні генетичні конструкції, які представляють інтерес як для фундаментальної науки, так і для практичного застосування.

Конструювання рослин гороху, що містять мобільний Ds елемент кукурудзи. Одним з можливих підходів для ізолювання унікальних послідовностей ДНК є пошук і клонування генів за допомогою транспозонів - генетичних елементів, що транспозуються (gene tagging).

Серед рослинних транспозонів найбільш вивченою є родина мобільних Ac/Ds елементів кукурудзи. Тому, найчастіше вони використовуються як система гетерологічних транспозонів в експериментах по клонуванню генів.

Незважаючи на те, що коло рослин у яких працює гетерологічна система транспозонів Ac-Ds кукурудзи, постійно зростає, одночасно і дотепер немає публікацій, що описують подібні експерименти у гороху. Необхідно зазначити, що горох є однією з сільськогосподарських зернобобових культур, які найбільш широко використовуються, з добре вивченими і картованими хромосомами. Цей вид є представником родини бобових, що мають одну з унікальних генетичних систем симбіотичної фіксації азоту. Пошук і клонування унікальних генів гороху, зокрема генів симбіотичної фіксації азоту, з використанням гетерологічної системи транспозонів є достатньо привабливим як з точки зору фундаментальних, так і прикладних досліджень. Крім того, у гороху і дотепер не описані функціонуючі транспозони, хоча транспозонподібні послідовності ДНК були виявлені в його геномі при вивченні "менделевської" мутації - зморшкуватість насіння. Як перший крок при клонуванні унікальних генів з використанням методу "gene tagging" необхідно було отримати трансгенні рослини гороху, що містять Ds-елемент кукурудзи.

Для отримання трансгенних рослин гороху ми використовували різноманітні шляхи введення ДНК в рослинні клітини. Одним з методів була електропорація протопластів гороху в присутності плазмиди pSK3 (Рис. 2). Ця конструкція була люб'язно надана Dr. J. Hille (Вільний університет, м. Амстердам). Спочатку на селективному середовищі, що містить 50 мг/л канаміцинсульфату, було відібрано 42 колонії, які зеленіли при освітленні. При подальшому вирощуванні на поживному середовищі, що містить селективний агент, було відібрано 7 стабільно стійких до канаміцинсульфату клонів.

Стійкі до канаміцинсульфату клони перевіряли на наявність неоміцинофосфотрансферази за допомогою антитіл, специфічних до цього білку, використовуючи стандартний набір для ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay), отриманий від компанії '3'-5'" (США). Отримані дані показали наявність білку NPTII у клонів гороху, відібраних після електропорації протопластів.

Подальший аналіз трансформантів проводили за допомогою аналізу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР - PCR). Всі вивчені трансгенні клони давали в результаті ампліфікації фрагменти ДНК необхідного розміру (189 п.н.), при використанні праймерів, специфічних до 35S промотору.

Для подальшого доказу інтеграції ДНК плазмиди pSK3 в геном гороху проводили блотинг-гібридизацію за Саузерном. Дані, отримані нами, служать доказом інтеграції в геном гороху гена NPTII, що входить до складу плазмиди pSK3. До того у всіх семи відібраних

клонів ген входить до складу фрагменту розміром приблизно 7 тис. п.н. Жодних смуг гібридизації не було виявлено у ДНК контрольної нетрансформованої рослини (Рачек и др., 1994).

Проте одночасно аналіз активності GUS гена у відібраних клонах не виявив присутності активності -глюкуронідази. Для перевірки можливого інгібування активності цього гену за рахунок метилювання залишків цитозину в ДНК трансформованих клітин, відселектовані калуси вирощувалися протягом 2 тижнів на поживному середовищі, що містить 5'-азацитидін. Після цього калус, який формувався на середовищі з 5'-азацитидіном, мав GUS позитивну реакцію. Таким чином було встановлено, що додавання в поживне середовище деметилюючого агента, яким є 5'-азацитидін, відновлює активність перенесених генів. Цей факт свідчить про можливість інгібування активності перенесених генів за рахунок метилювання залишків цитозину в ДНК ядра.

Отримані результати по відборі трансгенних ліній гороху вперше показали можливість використання канаміцинсульфату як селективного агента для відбору трансформантів у цього виду.

Трансгенні пагони гороху, які мали вбудований Ds-елемент кукурудзи, були отримані шляхом генетичної трансформації за допомогою *A. tumefaciens*. Плазмідна рSK3 була іммобілізована в *A. tumefaciens*, що несе плазмідну рMP 90 з Vir - областю. Отриманим агробактеріальним штамом було трансформовано лінію гороху 1288-2206-12 з високим регенераційним потенціалом, яка була ізольована нами раніше після генетичної трансформації "shooty"-мутантом *A. tumefaciens* рGV 2206 (Зубко та інш., 1990). Після трансформації було відібрано 23 клітинних лінії, стійких до канаміцину. Згодом на безгормональному поживному середовищі було отримано 5 регенерантів.

Проведений молекулярно-біологічний аналіз з використанням полі-меразної ланцюгової реакції, Саузерн-блот гібридизації та імуно-ферментного аналізу накопичення білку NPTII повністю довели трансгенну природу отриманих канаміцинстійких регенерантів гороху. Також була показана присутність мобільного Ds-елементу в геномі відібраних рослин шляхом Саузерн-блот гібридизації з використанням послідовності ДНК самого Ds-елементу як зонду (Рачек та інш., 1995).

Підсумовуючи викладене вище, можна стверджувати, що вперше доведена можливість отримання трансгенних пагонів гороху з Ds-елементом кукурудзи. Також, була показана можливість використання канаміцинсульфату як селективного агента для відбору трансгенних рослин гороху.

Здійснені експерименти відкривають нові перспективи в генетиці такого об'єкту як горох та дозволяють клонувати унікальні гени за рахунок використання методу "gene tagging".

Отримання трансгенних рослин гороху, стійких до фосфінотріцину. Метою експериментів було отримання трансгенних сортів гороху, що несуть ген стійкості до фосфінотріцину - нового гербіциду відомого також під назвою BASTA або глюфозінат амонію. Для цієї роботи були використані здатні до регенерації лінії 912097-2206, 912074-2206 і 911136-2206, отримані раніше у сортів голландської селекції шляхом трансформації штамом *A. tumefaciens* pGV 2206. На основі вектору pGA472 була сконструйована плазміда pK3, яка несе як ген стійкості до канаміцинсульфату, так і ген стійкості до фосфінотріцину. Крім того, надалі, ми також використовували конструкції *A. tumefaciens* pНое 106/pЕНА 101 і *A. tumefaciens* pНое200/pЕНА101, які несуть лише ген стійкості до фосфінотріцину. Всі ці конструкції були перенесені в штам *A. tumefaciens* C58C1, яка містила плазмиду pMP 90. Отриманими бінарними векторами були проведені експерименти по трансформації вищенаведених ліній гороху.

Після генетичної трансформації з використанням цих конструкцій у ліній гороху 912074-2206 і 912097-2206 були відібрані трансформанти гороху, які ростуть та зеленіють в присутності 10мг/л фосфінотріцину. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), де як праймери використовувались як послідовності, які специфічно впізнають 35S промотор, який входить до складу химерного гену стійкості до фосфінотріцину, так і праймери, специфічні власне до синтетичного гену стійкості до фосфінотріцину, була показана присутність послідовності ДНК перенесеного гена у відібраних клітинних лініях. З цих ліній були отримані регенеранти, але процес утворення коренів у них був ускладнений, що не давало можливості отримати насіння шляхом висадки в ґрунт відібраних рослин.

Проблему отримання нащадків з насіння у трансгенних пагонів гороху ми вирішили шляхом, відмінним від описаного будь-де. Виявилося, що при вирощуванні їх на безгормональному поживному середовищі в культуральних банках об'ємом 250 мл за умов газообміну з навколишнім повітрям, вони починають цвісти безпосередньо в культурі *in vitro* без утворення коренів. У подальшому з цих квіток зав'язується невелике, але цілком повноцінне насіння, яке можна як переносити в ґрунт, так і висаджувати знов в асептичній культурі на поживних середовищах, які містять селективний агент для перевірки стійкості до фосфінотріцину. За допомогою цього методу ми отримали нащадків у трансформованих ліній гороху. Аналіз успадкування ознаки стійкості до фосфінотріцину показав, що частина насіння, яке було отримано у однієї з трансформованих ліній 912074-2206, стабільно зберігала його до другої генерації включно (Табл. 1). Ці результати переконливо доводять можливість отримання трансгенного насіння у гороху, яке несе ознаку стійкості до гербіциду. Таким чином були отримані генетично змінені рослини гороху та їхні нащадки з використанням оригінальної системи переносу генів, що була названа нами "подвійна трансформація".

Таблиця 1. Успадкування ознаки стійкості до фосфінотріцину у трансгенних рослин гороху.

Лінія гороху	T ₁ генерація, кількість насіння	T ₂ генерація, перевірено насіння			
		Висаджено насіння з кожної T ₁ рослини	Проросло на середо-вищі з BASTA	Зберігало здатність рости на середовищі з BASTA*	Кількість ПЛР- позитивних
912074- 2206	4 (1 не проросло)	12	10	3	2
		23	19	6	6
		12	7	5	3
		Всього:	47	36	14

*ПЛР аналіз всіх рослин, які втратили здатність рости в присутності фосфінотрицину, не дав позитивного сигналу у жодній з них.

Запропонований метод “подвійної трансформації” дозволяє з високим ступенем ефективності отримувати генетично змінені рослини гороху. Крім того, відібрані трансгенні рослини зберігають високу регенераційну здатність, що дозволяє використовувати їх в подальших генно-інженерних експериментах. Таким чином, оригінальні розробки по генетичній трансформації гороху з достатньо великим ступенем надійності дозволяють проводити генетичну трансформацію гороху, а отримані стійкі до гербіциду рослини можуть бути використані в практиці сільського господарства.

Отримання трансгенних ліній коренів у гороху і люцерни хмелевидної з використанням Ri плазмиди з *A. rhizogenes*. З метою вивчення впливу генів плазмиди Ri, виділеної з *A. rhizogenes*, на органогенез у видів з родини бобових був проведений ряд експериментів по трансформації гороху і люцерни хмелевидної штамом *A. tumefaciens* C58C1, які містять плазмиду pRiA4, а також плазмиду pGA 472, що забезпечує стійкість до канаміцинусульфату у отриманих трансгенних рослинних ліній.

Люцерна хмелевидна (*Medicago lupulina*) - один з дикорослих видів люцерн - представляє особливий інтерес як можливий донор ознаки самозапилення, яка відсутня у культурних видів люцерн. В той же час цей вид не схрещується звичайним статевим шляхом з культурними видами люцерни. Створення трансгенних ліній у цього виду - люцерни хмелевидної, що несуть селективні ознаки в культурі *in vitro*, є безперечно цікавим для експериментів по соматичній гібридизації з іншими видами люцерни, що використовуються в сільському господарстві.

Таблиця 2. Трансгенні клітинні лінії і рослини видів з родини бобових, отримані в ІКБГІ

Рослинний вид- лінія	Вектор	Селективна ознака	Спосіб трансформації	Форма трансгенної лінії
<i>Medicago sativa</i>	pGV2206	Здатність до	<i>Agrobacterium</i>	Фертильні рослини

Весело- Подільська Pisum sativum -1288	pGV2206	регенерації Здатність до регенерації	tumefaciens Agrobacterium tumefaciens	Фертильні рослини Фертильні рослини Фертильні рослини
-911136	pGV2206	до регенерації Здатність до	Agrobacterium tumefaciens	Фертильні рослини Пагони
-912074	pGV2206	регенерації Здатність до регенерації	Agrobacterium tumefaciens	
-912097	pGV2206	Стійкість до канаміцину	Agrobacterium tumefaciens	Фертильні рослини Фертильні рослини
Pisum sativum -1288-2206-12	pSK3 Ds-element	Стійкість до BASTA Стійкість до BASTA	Agrobacterium tumefaciens	Культура коренів Рослини
Pisum sativum -912074-2206	pK3	Стійкість до канаміцину	Agrobacterium tumefaciens	Калус
-912097-2206	pK3	Стійкість до канаміцину Стійкість	Agrobacterium tumefaciens	Калус
Medicago lupulina	pRiA4#	до канаміцину	Agrobacterium	
Medicago borealis - 94	pGA472 pGA472	Стійкість до канаміцину	tumefaciens Електропорація протопластів	
Glycine max	pGA472		Електропорація протопластів	
Pisum sativum -1288-2206-12	pSK3 Ds-element		Електропорація протопластів	

В результаті проведених експериментів по кокультивуванню експлантів гороху і люцерни хмелевидної з *A. tumefaciens* pRiA4 pGA 472 на безгормональному поживному середовищі, що містить 50 мг/л канаміцинсульфату були відібрані клітинні лінії, які активно росли. При подальших пересадках на поживні середовища того ж складу частина цих ліній активно утворювала корені, характерні по морфології для захворювання “бородавчасті корені”, що звичайно викликається *A. rhizogenes*. Частина отриманих канаміцинстійких клонів люцерни і гороху росли у вигляді неорганізованої клітинної маси. Відібрані культури коренів у обох видів не утворювали ембріодів або пагонів як на безгормональних поживних

середовищах, так і при додаванні цитокінінів. Аналіз активності неоміцинфосфотрансферази показав присутність активності цього ферменту в отриманих клітинних лініях.

Ці експерименти дозволили нам встановити, що види з родини бобових такі як горох і люцерна хмелевидна після трансформації плазмідом RiA4 утворюють корені, що активно ростуть і є типовими для трансформантів, отриманих з використанням *A. rhizogenes*. Відібрані лінії культури коренів у обох видів мали неоміцинфосфотрансферазну активність, що підтверджує їх транс-генну природу. Жодної ознаки органогенезу або ембріогенезу у отриманих ліній виявлено не було.

КУЛЬТИВУВАННЯ ПРОТОПЛАСТІВ, КЛІТИННИХ ЛІНІЙ І РЕГЕНЕРАЦІЯ РОСЛИН У ДЕЯКИХ РОСЛИННИХ ВИДІВ.

Культивування протопластів рослин. Виділення і культивування протопластів найважливіших сільськогосподарських видів, що належать до родини бобових, завжди було в центрі уваги дослідників, які працюють в галузі клітинної біології рослин.

В експериментах, що розпочалися в 1985 році, основну увагу було приділено розробці способів культивування протопластів, ізольованих з тканин інтактних рослин сої. Отримання достатньо великої кількості протопластів з рослинних тканин є однією з основних проблем, з якими стикалися дослідники під час розробки способів культивування протопластів у сої. Використання листків рослин, що виростили в асептичних умовах, як джерела для виділення протопластів, не дозволяло вирішити цю проблему. Проте така можливість має місце у багатьох видів з різноманітних родин, серед яких є і види з родини бобових. Незалежно від аналогічних повідомлень, що з'явилися згодом, був розроблений метод культивування протопластів сої, який полягає в використанні незрілих зародків як експлантів. В експериментах були використані незрілі зародки сої розміром від 2 до 10 мм.

Після очищення протопласти з незрілих зародків сої культивували в модифікованому поживному середовищі KM8P. Перше ділення протопластів відбувалося на 2-3 добу культивування. На п'яту добу культивування суспензію протопластів розбавляли рівним об'ємом поживного середовища B5 з 0.35 М манітолом як осмотика і фітогормонами: 0.2 мг/л 2.4 Д і 0.5 мг/л кінетину або БАПу. В цій суміші протопласти продовжували ділитися і утворювали мікроколонії з 5-10 клітин. Через 2-3 тижні після першого розведення мікроколонії сої розводили рівним об'ємом того ж середовища C з 0.25 М манітолом і такими ж самими фітогормонами. В цих умовах мікроколонії продовжували розвиватися, утворюючи 50-100 клітинні колонії. Ці колонії за допомогою пастерівської піпетки нашаровували на щільне поживне середовище C, що містить 1 мг/л БАПа або кінетин, і переносили на світло

(4000лк) з 16 годинним світловим періодом. В таких умовах клітинні колонії сої продовжували розвиватися і набували темно-зеленого забарвлення. Отриманий препарат протопластів сої відрізнявся високою здатністю до поділу, що дозволило використати ці протопласти для індивідуального культивування в мікрокаплях об'ємом 100 нл, з найвищою в порівнянні з іншими видами, що досліджувалися, ефективністю поділу яка досягала 46% (Кириченко та інш., 1990)

Для виділення протопластів у деяких інших видів з родини бобових як експланти брали листки рослин, що росли в асептичних умовах. Для ферментації як осмотик використовували суміш рівних об'ємів розчину W5 і модифікованого поживного середовища КМ 8р з тим же складом пекто- і целюлітичних ферментів, яка добре себе зарекомендувала для виділення протопластів сої.

Культивування проводили на тому ж поживному середовищі, що використовували і для протопластів сої. Перше ділення протопластів гороху, люцерни і конюшини відзначали на 2-3 добу культивування. У протопластів люпину і "голубиноного" гороху *Sajanus sajan* перші ділення спостерігали на 5-6 добу культивування.

Ефективність висіву протопластів у різних видів з родини бобових була неоднаковою. Найбільш активно ділилися протопласти сої, і з досить низькою ефективністю протопласти люпину. При культивуванні на поживних середовищах з підвищеним вмістом цитокінінів клітинні культури "голубиноного" гороху і люпину утворювали зелені колонії, з яких не розвивалися пагони, а у люпину спонтанно виникали структури, схожі на корені. У калусних ліній гороху, отриманих з протопластів з дуже низькою ефективністю, вдавалося індукувати утворення пагонів (Кучук, 1989; Sarangi et al., 1992).

У видів з родини бобових, що належать до групи фуражних або пасовищних, вдалося отримати стабільну регенерацію рослин з протопластів. Так, у люцерни на поживному середовищі С з 0.5 мг/л кінетину у 20% висаджених колоній було індуковано утворення ембріодів, що в подальшому формували нормальні рослини на безгормональних поживних середовищах.

Таким чином, нам вдалося розробити методи виділення і культивування протопластів для видів з родини бобових. Повністю була вирішена проблема отримання достатньої кількості клітинних колоній. Разом з тим питання індукції високої ефективності регенерації рослин у отриманих клонів вимагає додаткових зусиль.

В співробітництві з Ботанічним Інститутом Університету м. Мюнхена був розроблений метод культивування протопластів і регенерації рослин для *Oenothera hookeri* (Kuchuk et al., 1998). Види цього роду мають ряд унікальних генетичних ознак, серед яких двубатьківське успадкування цитоплазматичних генів, можливість отримання міжвидових

гібридів, феномен комплексної гетерозиготності. Система культивування протопластів *Oenothera* ґрунтується на швидкому зниженні концентрації осмотика в поживному середовищі, де культивувалися 4-5 - денні мікроколонії. Ці експерименти відкрили можливість для дослідження ядерно-цитоплазматичних взаємодій з використанням методів соматичної гібридизації і трансформації хлоропластної ДНК у такого модельного об'єкта як *Oenothera*.

Соматичний ембріогенез у конюшини лугової. Для вивчення процесів регенерації рослин в культурі *in vitro* у такої широко розповсюдженої кормової рослини з родини бобових як конюшина лугова було проведене гістологічне вивчення утворених регенерантів.

В роботі були використані мезофільні протопласти конюшини як первинні одноклітинні структури, що дозволило моделювати систему регенерації рослини з однієї клітини. В процесі культивування мезофільних протопластів, виділених за розробленою нами методикою, було виявлено, що при ефективності утворення клітинних колоній, що досягає 30% від кількості виділених протопластів, лише 1,5% від їх кількості були здатні до подальшого розвитку з утворенням соматичних ембріоїдів. Ці структури не утворювали жодного проміжного калуса, і ембріоїди безпосередньо розвивалися в пагони. Отримані результати стали свідомством можливості індукції прямого ембріогенезу з протопластів конюшини, що підтверджує гіпотезу про можливість існування проембріональних клітин в соматичних тканинах листа конюшини. Надалі, пряме отримання повноцінних рослин з проростків стикнулося з ускладненнями, і цей процес здійснювався шляхом індукції вторинного соматичного ембріогенезу.

Процес утворення вторинних ембріоїдів у конюшини був також вивчений за допомогою гістологічного аналізу. Проведені спостереження показали, що утворенню ембріоїдів передують виникнення проембріогенних груп клітин, які розвивалися з однієї або багатьох сусідських великих, дуже вакуолізованих клітин. Проембріональні групи клітин являли собою дрібноклітинні структури з щільною цитоплазмою і досить великими ядрами і ядришками. Соматичні ембріоїди виникали з однієї або декількох клітин цих структур. Ініціальні клітини ембріоїдів відрізнялися від навколишніх клітин потовщеною оболонкою, що простежувалося у подальшому на дуже ранній стадії їхнього розвитку. Стадії розвитку соматичних ембріоїдів конюшини схожі з класичними, описаними як для зиготичного ембріогенезу, так і для соматичного ембріогенезу моркви. Цілком чітко виділяються глобулярна, серцевидна, торпедовидна стадії, а також стадія проростання. В результаті утворюються біполярні структури зі стебловим і корневими апексами.

Разом з тим в розвитку соматичних ембріоїдів конюшини спостерігався ряд відмінностей від процесу утворення зиготичних ембріоїдів. Так, ембріоїди, що сформувалися

з однієї клітини, мали більш витягнуту базальну частину, що закріплює їх в материнській тканині ембріонального комплексу. Можливо, ця структура виконує роль підвіска, і її багатоклітинна структура виникла вже під час найперших стадій соматичного ембріогенезу конюшини. У зиготичних ембріодів конюшини підвісок також багатоклітинний, але формується він на пізнішій глобулярній стадії. В той же час в формуванні соматичних ембріодів спостерігалася повна диференціація за часом утворення підвіска. Частина з них, так як і зиготичні, формувала багатоклітинний підвісок на пізній глобулярній стадії, і він простежувався в торпедовидній стадії і далі в період проростання. По мірі розвитку ембріода клітини підвіска залишалися дрібними і щільноплазменними, в той час як клітини власне ембріода ставали більшими і дедалі сильніше вакуолізованими, що характерно для соматичних ембріодів, які розвиваються в умовах *in vitro*. Між зоною багатоклітинного підвіска і власне ембріодом виникала невелика інвагінація, характерна і для зиготичних зародків.

Деякі соматичні ембріоди мали широку зону приєднання до ембріогенного комплексу, що підтверджує їхнє багатоклітинне походження. Такі зародки виникали спочатку у вигляді так званих випинань, що склалися з дрібних клітин на поверхні ембріонального комплексу, згодом вони диференціювалися в біполярні структури.

Проростання (органогенез) у соматичних ембріодів конюшини відбува-лося не так чітко, як у зиготичних. Найчастіше запізнювалося утворення кореня, тоді як сім'ядолі розвивалися нормально, і в них закладалася провідна система. Інколи розвиток кореневого апексу пригнічувався майже повністю, про що свідчив досить вузький базальний кінець ембріода. Але в ряді випадків, більш розвиненою виявлялася коренева частина ембріода і менш розвиненими сім'ядолі. Спостерігалася також нерівномірне утворення обох сім'ядолей. Досить часто виникали фасційовані ембріоди, певно завдяки щільному розташуванню їхніх ініціалей. Нерідкісними були випадки вторинного ембріогенезу, коли закладка нових ембріодів відбувалася в тканинах попередніх, що знаходилися на пізніших стадіях розвитку, але за якимось причинами зупинивших свій ріст. Вторинні ембріоди також мали як одно-, так і багатоклітинне походження. В багатьох випадках ембріоди зупиняли свій розвиток на глобулярній або торпедовидній стадіях. Їх клітини збільшувалися, вакуолізувалися і давали початок новому ембріогенному калусу.

Наші дослідження свідчать про значну аналогію в стадіях розвитку зиготичного і соматичного ембріогенезу конюшини. Отримані з соматичних ембріодів рослини конюшини успішно вирощували як в умовах теплиці, так і їхні нащадки - в умовах відкритого ґрунту без помітних відмін від рослин вихідного генотипу (Радионенко та інш., 1994; Radionenko et al., 1994).

Гістологічне вивчення регенераційних ліній гороху. Для подальшого вивчення засобів регенерації у видів з родини бобових була використана клітинна лінія гороху, що стабільно утворює регенераційноздатний калус. При гістологічному вивченні процесу регенерації у отриманих ліній гороху не було виявлено чітких фаз розвитку, як це має місце у випадку соматичного ембріогенезу. В той же час відзначено розвиток проембріогенних ділянок, що склалися з дрібних клітин з щільною цитоплазмою, що оточені калусними клітинами значно більшого розміру. Ці проембріональні групи клітин при культивуванні їх на безгормональних поживних середовищах давали початок утворенню бруньок, і подальший розвиток відбувався по шляху органогенезу з утворенням пагонів. Однак, якщо ці клітинні лінії на протязі короткого часу (3-5 доби) культивувати в присутності 2.4 Д, а після цього перенести на безгормональне поживне середовище, то інколи відмічалось утворення структур, схожих з глобулярними.

Гістологічне вивчення процесів регенерації у цукрового буряку. Цукровий буряк - одна з найважливіших сільськогосподарських культур. Вивчення процесів регенерації у цієї культури має велике значення для розробки біотехнологічних методів і застосування їх для поліпшення районованих в Україні сортів. Як експланти використовували черешки листків, що культивували на поживному середовищі MS, яке містить 1мг/л БАП. Після перебування у цих умовах з клітин паренхіми зникали включення. Клітини розпочинали ділення, в яких спочатку брали участь тільки декілька шарів клітин паренхіми. Ділення відбувалося по типу дроблення, в результаті чого утворюється зона дрібних клітин, з більш щільною цитоплазмою і більшими ядрами. Утворюються зони, подібні до раніше описаних нами для конюшини і гороху. Надалі процес відбувається по типу органогенезу. В окремих ділянках меристематичних зон, що утворюються, починають випинатися бугорки. Центральна частина бугорка згодом диференціюється в апекс пагона, а в периферійній зоні апекса в результаті периклинальних поділів клітин і деякого їхнього розтягу утворюються листові бугорки. Таким чином формуються бруньки. По довжині черешка водночас закладається декілька бруньок (Банникова та інш., 1995)

З проведених експериментів можна зробити висновок, що процес регенерації як шляхом органогенезу у гороху і цукрового буряка, так і шляхом соматичного ембріогенезу у конюшини бере свій початок на стадії утворення дрібноклітинних структур, що визначаються як проембріональний комплекс, де очевидно і відбувається активізація певних генів, що відповідають за механізми морфогенезу. Саме на цій фазі повинно відбуватися накопичення специфічних матричних РНК, які можуть бути ключем для пошуку генів, залучених до процесу регенерації. Тобто процеси, що приводять у подальшому до утворення нормальної рослини з соматичних клітин, відбуваються головним чином на стадії утворення

проембріональних груп клітин. Надалі, розвиток цих клітин може йти як по шляху соматичного ембріогенезу, так і по шляху органогенезу в залежності від генетичних і фізіологічних чинників.

АСИМЕТРИЧНА СОМАТИЧНА ГІБРИДИЗАЦІЯ ЯК ОДИН ІЗ СПОСОБІВ ПЕРЕНОСУ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ МІЖ РОСЛИНАМИ.

Отримання соматичних гібридів між видами з родини бобових з вико-ристанням гамма-опромінення. Незважаючи на успіхи, яких досягнула в останній час генетична інженерія як підхід, заснований на методах введення в рослинну клітину спеціально створених векторних молекул ДНК, не можна недооцінювати можливостей клітинної інженерії рослин. Разом з тим необхідно відзначити, що поділ на генетичну і клітинну інженерію рослин є досить умовним, і в світовій науковій практиці вони розглядаються як цілісна система нових підходів під загальною назвою генетична інженерія рослин.

В наших експериментах по асиметричній соматичній гібридизації між видами з родини бобових, що розпочалися в 1987 році, були розроблені методи соматичної гібридизації з використанням гамма-опромінення одного з партнерів, і як результат були відібрані гібридні клони і регенеровані гібридні рослини.

Для індукції злиття протопластів між різноманітними видами з роду *Medicago*, а також між конюшиною (*Trifolium pratense* L.) і люцерною мінливою (*M. varia* L.) за основу було взято метод, розроблений для злиття мезофільних протопластів у *N. plumbaginifolia* згідно якому суміш протопластів обробляється на протязі 20 хв розчином 40% ПЕГа 4000, що містить високу концентрацію іонів Ca^{2+} і рН рівний 9.5-10. Застосування цього методу сприяло як отриманню в достатній кількості продуктів злиття так і достатнього відсотку виживання гетерокаріонів і батьківських протопластів.

В результаті проведених експериментів, після злиття мезофільних протопластів *M. sativa*, сорт "Веселоподолянська" з опроміненими дозою 300Гр мезофільними протопластами *M. varia*, що несуть ген стійкості до канаміцинусульфату, були відібрані гібридні клітинні клони. У деяких з цих клонів вдалося індукувати утворення ембріоподібних структур, а в одному випадку були отримані рослини-регенеранти (Кучук та інш., 1991). Можна припустити, що отримані гібридні клони містять в своєму геномі гени *M. varia*, що обумовлюють регенераційну здатність, адже для колоній, отриманих з протопластів люцерни сорту "Веселоподолянська", жодної регенераційної події отримати не вдалося. Проведений хромосомний аналіз показав, що відібраний гібрид несе октоплоїдний набір хромосом з 3-4 додатковими хромосомами.

Нажаль у люцерни важко диференціювати хромосоми батьків, однак результати, опубліковані стосовно асиметричної соматичної гібридизації у видів роду *Nicotiana*, а також між *Nicotiana* і *Atropa*, свідчать, що в таких комбінаціях здебільшого відбираються гібриди з подвоєним набором хромосом реципієнта і деяким числом хромосом донора. В наших експериментах ми використали батьківські види з тетраплоїдним числом хромосом $2n=32$, що призвело до отримання гібриду з октоплоїдним набором з додатковою кількістю хромосом донора.

Морфологія отриманих рослин істотно відрізнялася від обох батьків. Так, більшість листків була ненормальної редукованої форми. Рослини мали сильно укорочені міжвузля, і у них спостерігалось ускладнення коренеутворення в культурі *in vitro*. Такий фенотип міг бути результатом як певної несумісності геномів реципієнта і опроміненого донора, так, можливо, і слідством тривалого вирощування гібридних клітинних культур перш ніж вдалося індукувати регенерацію у отриманого гібридного клітинного клону.

З практичної точки зору більш цікавою була друга гібридна комбінація між іншими видами з роду *Medicago*. Один з представників цього роду - люцерна хмелевидна (*M. lupulina*) здатна до самозапилення, що є дуже корисною ознакою з точки зору селекції люцерни за підвищеною продуктивністю насіння. В той же час люцерна хмелевидна взагалі не здатна до статевого схрещування з окультуреними видами люцерни, що не дозволяє залучати її до звичайних селекційних програм.

В проведених експериментах після злиття мезофільних протопластів *M. borealis* лінія 94 з опроміненими протопластами *M. lupulina* RiA4, ізольованими з отриманої раніше трансгенної канаміцинстійкої клітинної лінії, вдалося відібрати клітинні лінії в даній гібридній комбінації. Необхідно відзначити, що морфологія одержаних клонів була схожа скоріше на морфологію клітинних ліній *M. borealis*. Отримані асиметричні соматичні гібриди розвивалися у вигляді зелених клітинних ліній без будь-яких ознак коренеутворення. Регенерація рослин у гібридних колоніях була сильно ускладнена і нам не вдалося отримати у них нормальні пагони.

Вивчення за допомогою блотинг гібридизації за Саузерном успадкування рибосомальних генів у отриманих гібридних клітинних ліній між *M. borealis* і *M. lupulina* показало, що у асиметричних соматичних гібридів ці гени присутні від обох партнерів.

Аналогічний аналіз був проведений для комбінації *M. sativa*+ *M. varia*. У випадку використання ендонуклеази рестрикції *EcoRV* не було визначено жодних відмінностей в спектрах гібридизації у цих двох видів. Проте у гібридних клонів відмічалось виникнення нових смуг гібридизації. Це явище може бути пояснене виникненням нових класів

рибосомальних повторів у соматичних гібридів, що вже відзначалося раніше у соматичних гібридів між *N. plumbaginifolia* і *Atropa belladonna*.

Припущення про можливість перенесення генів, що регулюють здатність до регенерації в культурі *in vitro*, шляхом соматичної гібридизації між різно-манітними видами з роду *Medicago* підтверджується також результатами, отриманими при гібридизації протопластів конюшини лугової, ізольованих з тривало культивованих клітинних культур, що втратили як здатність до регенерації, так і до синтезу хлорофілу, з опроміненими мезофільними протопластами *M. varia*, які мають ознаку стійкості до канаміцинсульфату, або без цієї ознаки. У гібридних ліній, позначених номерами 3 і 4, що були отримані після злиття протопластів конюшини з опроміненими мезофільними протопластами люцерни, які не несуть селективних ознак, було індуковано утворення ембріоноподібних структур, а після цього і пагонів.

Певно гени, що визначають здатність до регенерації у люцерни, не зчеплені з генами стійкості до канаміцинсульфату, тому що після гібридизації протопластів конюшини з мезофільними канаміцинстійкими протопластами люцерни були отримані як зелені, так і хлорофілдефектні клони, стійкі до канаміцинсульфату. В той же час немає даних про вплив дози опромінення на сегрегацію цих ознак. Як при дозі опромінення протопластів люцерни в 1000 Гр, так і при дозі в 25 Гр були отримані канаміцинстійкі гібридні клони між конюшиною і люцерною, здатні до позеленіння.

Таблиця 3. Асиметричні соматичні гібриди, отримані в ІКБГІ між видами родів *Medicago* і *Trifolium*.

Рослина-реципієнт	Опромінений донор	Селективна ознака	Тип гібридних ліній
<i>Medicago sativa</i> (мезофіл)	<i>M. varia</i> (мезофіл)	Стійкість до канаміцину	Пагони з коренями
<i>Medicago borealis</i> (мезофіл)	<i>M. lupulina</i> (калус)	Стійкість до канаміцину	Зелений калус
<i>Medicago borealis</i> (мезофіл)	<i>M. varia</i> (мезофіл)	Стійкість до канаміцину	Зелений калус
<i>Trifolium pratense</i> (білий калус)	<i>M. varia</i> (мезофіл)	Здатність до позеленіння	Пагони і ембріо-подібні структури

Trifolium pratense (білий калус)	M. varia (мезофіл)	Стійкість до канаміцину	Зелений і білий калус
-------------------------------------	-----------------------	----------------------------	--------------------------

Необхідно відзначити, що здатність до регенерації у асиметричних соматичних гібридів в значній мірі була знижена у порівнянні з клітинами донора або реципієнта. Так, в експериментах після злиття мезофільних протопластів *M. borealis*, лінія 94, з опроміненими мезофільними протопластами *M. varia*, що несуть ген стійкості до канаміцинсульфату, відібрані гібридні клони не утворювали ембріоподібних структур. В той же час отримані з протопластів батьків клітинні лінії з достатньо високою ефективністю формували такі структури і утворювали нормальні рослини.

В результаті проведених експериментів були розроблені методи злиття протопластів у видів *Medicago* і *Trifolium* з застосуванням інактивації одного з партнерів за допомогою гамма-опромінення. Також була показана можливість переносу при асиметричній соматичній гібридизації у видів *Medicago* і *Trifolium* ознаки стійкості до канаміцинсульфату, вбудованого в геном донора шляхом генетичної інженерії. Крім того, була показана можливість переносу ознаки регенераційної здатності при асиметричній соматичній гібридизації у цих видів.

Отримані результати по асиметричній соматичній гібридизації у видів з родів *Medicago* і *Trifolium* відкривають нові перспективи в селекції цих важливих сільськогосподарських культур. Вони дозволяють одержувати новий вихідний селекційний матеріал з корисними генами, перенесеними з родів і видів, у яких звичайне схрещування обмежене або взагалі неможливо. Крім того, відкривається можливість використати дані підходи для отримання цибридів у цих видів.

ВИСНОВКИ

1. Апробовано систему генетичної трансформації шляхом електропорації протопластів. Отримано канаміцинстійкі рослини люцерни і клітинні лінії сої та гороху. Молекулярно-біологічний аналіз і аналіз активності ферменту неоміцинофосфотрансферази підтвердив трансгенну природу отриманих ліній.
1. Запропоновано і апробовано метод, що підвищує регенераційну здатність у люцерни і гороху шляхом генетичної трансформації мутантом “shooty” *Agrobacterium tumefaciens* pGV 2206. Отримано регенераційні лінії люцерни і гороху, що дозволяє використовувати їх для генетичної трансформації іншими генами.
1. Лінія трансгенного гороху з підвищеною здатністю до регенерації була використана для наступної трансформації векторними конструкціями, що несуть селективний ген стійкості

до канаміцинсульфату. Отримано трансгенні пагони гороху, що несуть мобільний Ds-елемент кукурудзи. Показано можливість використання “подвійної трансформації” для отримання трансгенних ліній гороху з генами, що цікавлять.

1. Запропоновано і апробовано метод генетичної трансформації гороху за допомогою неонкогенних штамів *Agrobacterium tumefaciens*. Отримано трансгенні лінії, що несуть ген стійкості до фосфінотріцину.
1. Розроблено спосіб утворення насіння у гороху в асептичній культурі. Запропоновано методику мікроклонального розмноження гороху, що дозволить клонувати до 500 000 генетично однорідних особин в рік.
1. У трансгенних ліній гороху шляхом індукції утворення насіння в культурі *in vitro* отримано потомство. Молекулярно-біологічний аналіз підтвердив присутність послідовностей ДНК перенесеного гена в поколіннях генетично модифікованого гороху.
1. Протопласти видів рослин з родини бобових, таких як конюшина, люцерна, соя, горох, люпин, голубиний горох, при використанні розроблених методів культивування здатні до утворення клітинних колоній з високим ступенем ефективності.
1. Запропоновано і апробовано протоколи регенерації рослин з клітинних ліній, отриманих з протопластів, що були виділені з комерційних сортів люцерни і конюшини. Регенерація рослин у конюшини може бути отримана як шляхом прямого, так і непрямого ембріогенезу, що підтверджено результатами гістологічного аналізу.
1. Розроблено методику культивування протопластів і регенерації рослин у *Oenothera hookeri* - модельного об'єкту для молекулярно-генетичних досліджень.
1. Отримано асиметричні соматичні гібриди між видами з родини бобових. Показано можливість використання перенесеного гена неоміцинофосфо-трансферази як генетичного маркера для відбору соматичних гібридів у видів з родини бобових.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ

1. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений.// Київ “Наукова думка”.-1997.-152с.
1. Банникова М.А., Головкин А.Э. Хведынич О.А., Кучук Н.В. Регенерация растений у сахарной свеклы (*Beta vulgaris*) в культуре *in vitro*, гистологическое изучение процессов регенерации.// Цитология и генетика.-1995.-29, N 6.-С. 14-22.
1. Зубко Е.И., Кучук Н.В., Туманова Л.Г., Виконская Н.А, Глеба Ю.Ю. Генетическая трансформация гороха, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens*// Биополимеры и клетка.-1990.-6, N 3.-Р.77-80.

1. Кириченко И.В., Кучук Н.В., Сахно Л.А., Глеба Ю.Ю. Индивидуальное культивирование растительных протопластов и клеток.// Докл. АН Украины.-1990.- N 3.-С. 63-65.
1. Кучук Н.В., Каневский И.Ф. Методы генетической трансформации растений.// Биотехнология.- 1987.- 3, N 3. - С. 365-369.
1. Кучук Н.В. Выделение и культивирование протопластов пяти видов семейства бобовых// Физиология растений.-1989.-3, N 4. -С.821-824.
1. Кучук Н.В., Шаховский А.М., Комарницкий И.К., Глеба Ю.Ю. Получение генетически трансформированных клеточных клонов сои путем электропорации протопластов.// Биотехнология.- 1990.- N 5.- С. 30-31.
1. Кучук Н.В., Шаховский А.М., Воронин В.К., Глеба Ю.Ю. Получение асимметричных соматических гибридов в роде *Medicago*.// Биополимеры и клетка.-1991.-7, N 4.- С. 54-60.
1. Кучук М.В., Глеба Ю.Ю. Цитофізіологія та клітинна інженерія рослин.// Укр. бот. журнал.- 1992.-49, N 2.- С. 89-92.
1. Кучук Н.В. Генетическая трансформация высших растений, опосредованная бактериями из рода *Agrobacterium*. //Усп. совр. биол.-1997. - 117, N 6-С. 645-658.
1. Кучук Н.В., Глеба Ю.Ю. Применение трансгенных растений для целей практической селекции.// Цитология и генетика.-1997.- 31, N 4.-С. 102-114.
1. Кучук М. Генетична інженерія - входження в біологічну еру.// Вісн. НАН України.-1998.-N 3-4.- С. 28-34.
1. Сорочинский Б.В., Прохневский А.И, Гродзинский Д.М., Кучук Н.В. Иммунофлюоресцентная микроскопия компонентов цитоскелета в клетках растений.// Цитология и генетика.-1990.-24, N 3. -С. 64-65.
1. Радионенко М.А., Хведынич О.А., Гудзь В.Н., Банникова В.П., Кучук Н.В. Развитие соматических зародышей в каллусной культуре клевера лугового (*Trifolium pratense* L.)// Цитология и генетика.-1994.- 28, N 5.- С. 15-20.
1. Рачек Л.И., Стороженко С.В., Кучук Н.В. Генетическая трансформация гороха конструкцией, содержащей Ds-элемент кукурузы, методом электропорации.// Цитология и генетика.-1994.-28, N 6.- С. 49-54.
1. Рачек Л.И., Стороженко С.В., Кучук Н.В. Получение и молекулярно-биологический анализ трансгенных растений гороха (*Pisum sativum* L.), содержащих Ds-элемент кукурузы.// Биополимеры и клетка.-1995.-11, N 3-4.- С. 82-87.
1. Kuchuk N., Komarnitski I., Shakhovsky A., Gleba Y. Genetic transformation of *Medicago* species by *Agrobacterium tumefaciens* and electroporation of protoplasts.// Plant Cell Rep.- 1990.- 8.-P. 660-663.

1. Kuchuk N.V., Gleba Y.Y. The development of biotechnological approaches for improvement of grain legume species.// In: Proc. of 1 Eur. Conference on Grain Legumes.- France, Anger, 1-3 June 1992.- P. 121-122.
1. Kuchuk N., Herrmann R.G., Koop H.U. Plant regeneration from leaf protoplasts of evening primrose (*Oenothera hookeri*).//Plant Cell Rep. - 1998.- 17, No. 8. - P. 601-604.
1. Radionenko M. A., Kuchuk N.V., Khvedynich O.A., Gleba Y.Y. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from protoplasts of red clover (*Trifolium pratense* L.)// Plant Sci.-1994.- 97. - P. 75-81.
1. Sarangi B.K., Kuchuk N.V., Gleba Y.Y. Isolation and culture of protoplasts of pigeonpea (*Cajanus cajan* L.)// Plant Cell Rep. -1992.-11.-P. 462-465.
1. А.с. 1549995 СССР от 15.11.89. Кучук Н.В., Глеба Ю.Ю. Способ выделения и культивирования протопластов из растительных тканей сои.
1. Момот В.П., Кучук Н.В., Пастернак Т.П. Методы клеточной инженерии растений. - Препринт 88.2, г. Киев "Комиссия УССР по делам ЮНЕСКО", 1988, 23с.

Кучук М.В. Використання прийомів генетичної інженерії і клітинної біології для отримання нових форм у видів з родини бобових і деяких інших рослин.

Дисертація у вигляді рукопису на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальностями 03.00.22 “Клітинна біологія”, 03.00.15 “Генетика”. Інститут клітинної біології та генетичної інженерії, Київ 1998.

Розроблено методику культивування протопластів і регенерації рослин у люцерни, конюшини, гороху і у *Oenothera hookeri*. Протопласти сої, люпину, голу-біного гороху при використанні розроблених методів культивування здатні до утворення клітинних колоній з високим ступенем ефективності. Отримано канаміцинстійкі рослини люцерни і клітинні лінії сої та гороху шляхом електро-порації протопластів. Запропоновано метод, що підвищує ефективність транс-формації у гороху та люцерни - “подвійна трансформація”, що включає 1) отримання лінії рослин, які здатні до регенерації в культурі *in vitro*, за рахунок транс-формації мутантом “shooty” *A. tumefaciens* pGV2206; 2) - трансформація ліній, які здатні до регенерації, селективним геном. Таким шляхом було отримано регенераційні лінії люцерни і гороху і далі трансгенні рослини гороху з *Ds* транспозоном кукурудзи та з геном стійкості до фосфінотрицину. Присутність генів в геномі рослин було доказано за допомогою методів полімеразної ланцюгової реакції, блот-гібридизації за Саузерном, NPT II аналізу, аналізу GUS активності, імуноферментного аналізу (ELISA). Міжвидові соматичні гібриди *Medicago sativa*+*M.varia* і *M.borealis*+*M.lupulina* були отримані за допомогою асиметричної гібридизації. Хромосомний аналіз та блот-гібридизація рибосомальної ДНК підтвердили

гібридну природу отриманих ліній. Було проведено гістологічний аналіз процесу регенерації у конюшини, гороху та цукрового буряка.

Ключові слова: бобові, цукровий буряк, *Oenothera*, протопласт, регенерація рослин, генетична трансформація, соматична гібридизація.

Кучук Н.В. Использование приемов генетической инженерии и клеточной биологии для получения новых форм у видов из семейства бобовых и у некоторых других растений.

Диссертация в виде рукописи на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.00.22 “Клеточная биология” и 03.00.15 “Генетика”, Институт клеточной биологии и генетической инженерии, Киев 1998.

Разработаны методы культивирования протопластов и регенерации растений у люцерны, клевера, гороха и у *Oenothera hookeri*. Протопласты сои, люпина, голубиногороха способны с высокой эффективностью образовывать клеточные колонии при использовании разработанных методов культивирования. Путем электропорации протопластов получены канамицин-устойчивые растения люцерны и клеточные линии сои и гороха. Предложен метод, повышающий эффективность трансформации у гороха и люцерны - двойная трансформация. Суть метода заключается в следующем 1) получение регенерационноспособных линий путем трансформации мутантом “shooty” *A. tumefaciens*; 2) трансформация регенерационных линий селективным геном. Таким образом были получены регенерационные линии люцерны и гороха и в дальнейшем трансгенные растения гороха, как с *Ds* транспозоном кукурузы, так и с геном устойчивости к фосфинотрицину. Присутствие генов в геноме растений было доказано с использованием методов полимеразной цепной реакции, блот-гибридизации по Саузерну, анализа активности NPTII, анализа GUS активности, иммуноферментного анализа (ELISA). Межвидовые соматические гибриды *Medicago sativa*+*M. varia* и *M. borealis*+*M. lupulina* были получены с помощью асимметричной гибридизации. Хромосомный анализ и блот-гибридизация рибосомальной ДНК подтвердили гибридную природу полученных линий. Был проведен гистологический анализ процесса регенерации у клевера, гороха и сахарной свеклы.

Ключевые слова: бобовые, сахарная свекла, *Oenothera*, протопласт, регенерация растений, генетическая трансформация, соматическая гибридизация.

Kuchuk N.V. “Application of genetic engineering and cell biology approaches to produce new forms of species from *Leguminosae* family as well as of some other plants.”

Dissertation thesis as manuscript is presented for academic degree the doctor of biological sciences in fields 03.00.22 “Cell biology” and 03.00.15 “Genetics”.

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kiev, 1998.

Methods of protoplast cultivation and plant regeneration have been developed for alfalfa, clover and pea and for *Oenothera hookeri*. Protoplasts isolated from soybean, lupine and “pigeonpea” have been cultivated with high efficiency. But, only callus has been obtained. Protoplast electroporation has been successfully applied to produce transgenic alfalfa plants as well as soybean and pea calli by using kanamycine as selectable agent. To produce transgenic alfalfa and pea plants double transformation system has been developed. The adopted approach involves two transformation steps: 1) production of regenerable legume lines through transformation with "shooty" mutant of *A.tumefaciens* pGV2206; 2) transformation of these regenerable legume lines with the gene construct containing selectable genes. Regenerable transgenic alfalfa and pea lines have been obtained using the developed approach. Transgenic pea plants carried of maize *Ds* trasposon as well as phosphinotricine resistant plants have been produced. The presence of transferred genes in the genomes of produced plants has been confirmed by PCR, Southern blot hybridization, NPTII activity analysis, ELISA analysis, GUS activity analysis. Interspecific hybrid *Medicago sativa*+*M.varia* plants and *M.borealis*+ *M.lupulina* calli have been developed using the asymmetric somatic hybridization. Chromosome number analysis and Southern blot hybridization of ribosomal DNA have confirmed the hybrid nature of lines developed. Processes of plant regeneration of clover, pea and sugar beet have been studied with histological analysis.

Key words: legumes, sugarbeet, *Oenothera*, protoplast, plant regeneration, genetic transformation, somatic hybridization,