

# Отримання міжтрибних соматичних гібридів дигеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Arabidopsis thaliana*) і тетрагеномного (*O. violaceus* + *Brassica juncea* + *A. thaliana*) походження та їхнє використання для вивчення поведінки гетерологічної системи транспозонів *Spm/dSpm*

О. О. Овчаренко, І. К. Комарницький, М. М. Череп, В. А. Рудас, М. В. Кучук

Інститут клітинної біології і генетичної інженерії НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

У результаті соматичної гібридизації отримано міжтрибні гібриди в комбінаціях *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz. + *A. thaliana* L. і *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz. + гібрид (*B. juncea* (L.) Czern. & Coss + *A. thaliana* L.). Гібридну природу одержаних рослин доведено за допомогою аналізу ізоферментів та ПЛР-ПДРФ. Арабідопсис був трансформований вектором, який містив гетерологічну систему транспозонів *Spm/dSpm*, гени *prtII*, *bar*, *gus*, що дало змогу дослідити поведінку трансгенних ознак у гібридах ди- та тетрагеномного походження. Гібридні рослини були подібними до одного з батьківських видів (*O. violaceus* + *A. thaliana*) або мали проміжну морфологію (*O. violaceus* + гібрид (*B. juncea* + *A. thaliana*)). Усі отримані рослини виявилися стійкими до канаміцин-сульфату і фосфінотрицину завдяки перенесенню від *A. thaliana* трансгенам. Активність  $\beta$ -глюкуронідази виявлено в гібриді *O. violaceus* + *A. thaliana* і не знайдено в рослинах *O. violaceus* + гібрид (*B. juncea* + *A. thaliana*). ПЛР-методом показано збереження усіх трансгенів у гібридах.

Ключові слова: міжтрибна соматична гібридизація, *Orychophragmus violaceus*, *Brassica juncea*, *Arabidopsis thaliana*, гетерологічна система транспозонів *Spm/dSpm*.

Вступ. Метод соматичної гібридизації дозволяє поєднувати види, несумісні при статевих схрещуваннях [1, 2]. Досить часто для дослідника важливим є перенесення обмеженої кількості генетичного матеріалу, а не поєднання двох повних геномів. Таким чином, бажанішим виглядає створення асиметричних гібридів. Для цього розроблено різноманітні методики: опромінення клітин ультрафіолетовими [3], рентгенівськими [4, 5] або  $\gamma$ -променями [6], застосування інгібіторів клітинного по-

ділу — біохімічних отрут [7]. Використання мобільних генетичних елементів може стати альтернативним підходом, який дозволить переносити від донора до реципієнта лише невелику кількість генів. При злитті протопластів може відбуватися стрибок транспозона між геномами. При цьому необхідні для дослідника гени можуть бути перенесені транспозоном, а хромосоми одного з батьків — поступово спонтанно втрачатися при віддаленій гібридизації [8—12]. *A. thaliana* належить до триби *Sisymbrieae*, а *O. violaceus* разом із *B. juncea* — до триби *Brassicaceae* родини *Brassicaceae*. Шляхом со-

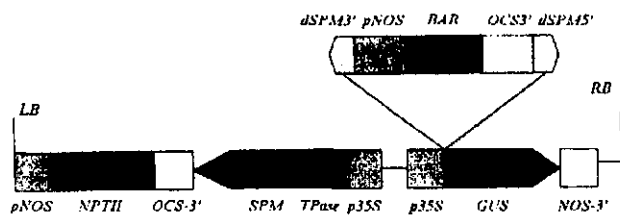


Рис. 1. Принципова схема плазмідного вектора, використаного для трансформації *A. thaliana*

матичної гібридації створено міжтрибні гібриди, які поєднували в собі: а) геноми арабідопсису і *O. violaceus*; б) геноми арабідопсису, *O. violaceus* і геном алотетраплоїдної гірчиці (*B. juncea*), який складається з геномів *B. campestris* і *B. nigra* [13]. Використання при гібридації трансгенних рослин *A. thaliana*, що містили гетерологічну систему транспозонів *Spm/dSpm*, гени *gus*, *nptII* і *bar*, дозволило прослідкувати поведінку трансгенних ознак у міжтрибних гібридів.

**Матеріали і методи. Рослинний матеріал.** У роботі використано асептичні рослини дикого типу *O. violaceus*, рослини *A. thaliana* L., трансформовані плазмідною *pIC411*, а також раніше отриманий у нашій лабораторії гібрид *j56* [14] між гірчицею сарептською *B. juncea* (L.) Czern. & Coss. сорту Green in Snow і трансгенним арабідопсисом, трансформованим плазмідною *pIC401* (рис. 1). Відмінність між плазмідами полягала в тому, що в *pIC411* *Spm*-транспозаза знаходиться під своїм власним промотором, а в *pIC401* — під 35S промотором. Насіння арабідопсису люб'язно надано фірмою «Icon Genetics GmbH» (ФРН).

**Виділення протопластів і соматична гібридація.** Протопласти виділяли з листків 21–28-денних рослин *O. violaceus*, арабідопсису і гібриду *j56*. Ферментацію тканин здійснювали протягом 16–18 год у суміші ферментів (0,3 % Onozuka R-10, 0,1 % Driselase, 0,3 % Macerage), розчинених у 0,4 М сахарозі. Протопласти очищували методом флотації в 0,4 М сахарозі з подальшим подвійним відмиванням у сольовому середовищі W5 [15]. Злиття протопластів проводили за модифікованою методикою Менцеля [16]. Протопласти культивували на середовищі SW1 [17] у темряві при температурі 25 °С протягом 7 діб. Після перших поділів до суспензії клітин додавали рівний об'єм середовища SR (B5 [18] + 0,3 М глюкоза + 0,1 М сахароза + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л НОК).

Для регенерації рослин отримані колонії переносили на тверде регенераційне середовище (B5 + 0,2 М манітол + 30 г/л сахарози + 4,5 мг/л БАП + 5,0 мг/л фосфінотрицину). Рослини-регенеранти переносили на середовище B5 з 10 мг/л фосфінотрицину.

**Гістохімічне виявлення активності гена *gus*.** Для виявлення активності гена *gus* експланти рослин, які регенерували, аналізували за методикою [19]. Наявність експресії продукту гена *gus* визначали під біокулярним мікроскопом при збільшенні в 32 рази.

**ПЛР-ПДРФ аналіз гібридних ліній.** Тотальну ДНК виділяли з рослинного матеріалу за методикою, наведеною в роботі [20].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили за методикою, прийнятою в нашій лабораторії [21], із застосуванням низки праймерів (таблиця). Ампліфікований фрагмент гена *ndh4* мітохондріальної NADH-дегідрогенази обробляли рестрикційними ендонуклеазами *HaeIII*, *MvaI*, *StyI*. Ампліфікований фрагмент спейсера між хлоропластними генами *atpB*—*rbcl* гідролізували рестрикційною ендонуклеазою *ClaI*. Внутрішній транскрибований спейсер (ITS) ядерної рибосомної ДНК гідролізували рестрикційною ендонуклеазою *MvaI*.

**Аналіз множинних молекулярних форм ферментів.** Для підтвердження гібридної природи отриманих рослин аналізували множинні молекулярні форми ферментів (амілази і естерази) за стандартною методикою [27].

**Результати і обговорення.** Протопласти *O. violaceus* та *A. thaliana* зливали за модифікованою методикою Менцеля, оптимізованою для мезофільних протопластів видів родини *Brassicaceae*. Отримана після обробки поліетиленгліколем суміш продуктів злиття, клітин *O. violaceus* та *A. thaliana* активно ділилася. Синтез клітинної стінки відбувався протягом першої доби, про що свідчила втрата клітинами кулястої форми. Перші поділи спостерігали на другій—третьій день після виділення та обробки протопластів. Через тиждень утворювалися мікроколонії з 10–16 клітин. На 18–20-й день культивування формувалися макроколонії з близько сотні клітин. Макроколонії переносили на регенераційне агаризоване середовище B5 з 4,5 мг/л БАП і 5 мг/л фосфінотрицину. Останній додавали для елімінації колоній, які походили від незлитих клітин *O. violaceus*. Клітини *A. thaliana* за цих умов не були здатні до поділу.

## Праймери, використані при проведенні ПЛР-аналізу

| Фрагмент, який синтезується | Праймер  | Посилання |
|-----------------------------|--|-----------|
| <i>ITS</i>                  | 5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3' і 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'       | [22]      |
| <i>atpB-rbcL</i>            | 5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3' і 5'-TACAGTTGTCCATGTACCAG-3'       | [23]      |
| <i>atpH-atpI</i>            | 5'-TTGACCAACTCCAGGTCCAA-3' і 5'-CCGCAGCTTATATATAGGGCAA-3'      | [24]      |
| <i>ndh4, 1f-2r</i>          | 5'-CAGTGGGTTGGTCTGGTATG-3' і 5'-TCATATGGGCTACTGAGGAG-3'        | [25]      |
| <i>gus</i>                  | 5'-TGGGTGGACGATATCACCGTGGTGA-3' і 5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3' | [21]      |
| <i>nptII</i>                | 5'-GAGGCTATTCCGGCTATGACTG-3' і 5'-CAAGCTCTTCAGCAATATCACG-3'    | [26]      |
| <i>bar</i>                  | 5'-CCGTACCGAGCCGACGGAAC-3' і 5'-AGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'      | [21]      |
| <i>SpmTPase</i>             | 5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3' і 5'-GCTTTTGGGTATGCAGCCTAGTTC-3'  | [21]      |

Таким чином, ми намагалися підібрати умови, які б дозволяли отримувати регенеранти лише з гібридних колоній. На тверде середовище було перенесено близько 2000 колоній, із яких регенерувала лише одна рослина (Oa1). Така низька частота регенерації може бути пов'язана з цілою низкою причин: малим відсотком гібридних клітин при злитті, низькою життєздатністю гібридних продуктів або швидкою елімінацією хромосом арабідопсису на ранніх стадіях розвитку гібридних колоній. Останнє могло призводити до втрати генів стійкості до гербіциду фосфінотрицину і відповідно до загибелі колоній гібридного походження за наявності селективного тиску. Ми припускаємо, що іншою вірогідною причиною складності отримання гібридів між *O. violaceus* та *A. thaliana* є нездатність гібридних колоній до регенерації через низьку сумісність геномів цих видів.

Для родини *Brassicaceae* форма трихом є однією з важливих таксономічних ознак, тому трихомний аналіз широко використовують у таксономії хрестоцвітих [28]. Арабідопсис має трихоми, трійчаторозгалужені на верхівці, тоді як у *O. violaceus* трихоми прості, нерозгалужені. На перших етапах росту рослина, яка регенерувала, не відрізнялася від *O. violaceus* за морфологією листків та формою трихом. Але згодом ми спостерігали в отриманій рослині такі морфологічні особливості, як густіше, ніж у *O. violaceus*, опушення та наявність стебла. Для арабідопсису і *O. violaceus* характерний розетковий тип росту на вегетативній стадії, видовження стебла пов'язане у них з переходом до цвітіння.

Трансгенні рослини арабідопсису у своєму геномі містили послідовності модифікованого (*dSpm*) елемента (системи транспозонів *En/Spm*), які фланкують ген стійкості до фосфінотрицину (*bar*).

*dSpm* знаходиться між 35S промотором з вірусу мозаїки цвітної капусти та ATG кодоном гена  $\beta$ -глюкуронідази (*gus*), який діє як ексцизійний маркер для оцінювання активності процесу транспозиції. При транспозиції, яка відбувається завдяки дії *Spm*-транспозази, стає можливою експресія гена *gus* [29, 21].

Гістохімічний аналіз активності  $\beta$ -глюкуронідази показав наявність цього ферменту в досліджуваному зразку (рис. 2). Зони активності ферменту були розташовані нерівномірно у вигляді плям по всій поверхні листка і вказували на зони ексцизії *dSpm* елемента разом з *bar* геном. Активність  $\beta$ -глюкуронідази в досліджуваній рослині була одним із доказів присутності генетичного матеріалу арабідопсису. Ген *gus* не здатний до транспозиції, тому в разі, якби хромосома арабідопсису, що несла сайт інтеграції плазмідної ДНК, втрачалася, а натомість мала місце транспозиція *dSpm* елемента в геном *O. violaceus*, активність  $\beta$ -глюкуронідази була б відсутньою.

Раніше в роботі по соматичній гібридизації *O. violaceus* з *B. napus* показано їхню високу сумісність при втраті деяких ядерних маркерів *Brassica*, що свідчило про можливу спонтанну елімінацію хромосом цього виду в отриманих гібридах [30]. Поєднання диплоїдних геномів *O. violaceus* і *A. thaliana* разом з алотетраплоїдним геномом *B. juncea* могло спричинити розбалансування геномів та втрату хромосом *A. thaliana*, що дозволило б прослідкувати транспозицію *dSpm* елемента на інший геном.

Для злиття мезофільні протопласти *O. violaceus* і гібриду j56 (*B. juncea* + *A. thaliana*) змішували у співвідношенні 6:1 в розрахунок на те, що більшість клітин гібриду j56 буде втягнена у процес гібридизації. Після синтезу клітинної стінки

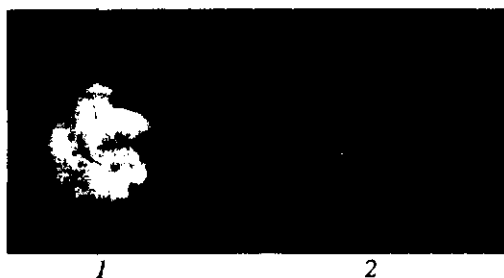


Рис. 2. Результат гістохімічного виявлення активності  $\beta$ -глюкуронідази у гібриді Oa1 (2). Для контролю використано рослину *O. violaceus* (1)

протопласти починали активно ділитися. На 6—7-й день після злиття формувалися мікроколонії, ріст яких надалі сповільнювався, тому від виділення протопластів до їхнього висіву на тверде регенераційне середовище проходило близько трьох місяців. Для регенерації використовували середовище, яке містило 4,5 мг/л БАП та 5 мг/л фосфіотрицину. Такий вміст фітогормонів сприяв швидкій регенерації *O. violaceus* [31] і, як ми й передбачали, триродових гібридів, оскільки для регенерації гібриду j56 (*B. juncea* + *A. thaliana*) оптимальною була комбінація фітогормонів у таких концентраціях: 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК, 2 мг/л зеатину. Регенерація рослин проходила досить повільно і тривала ще близько трьох місяців. Нам вдалося отримати чотири рослини (Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3, Oj56/4), стійкі до фосфіотрицину, які мали черешкові, округлі (як у *O. violaceus*) листки світло-зеленого кольору (як у гірчиці *B. juncea* і гібриду j56). Для рослин *O. violaceus* характерний яскраво-зелений колір листових пластинок. При подальшому розвитку рослин їхні листки набули форми, що відрізнялася як від *O. violaceus* (округлий із серцеподібним вирізом листок), так і від гібриду j56 і *B. juncea*, які мали городчастий край листка (морфологія їхніх листків збігалася). У гібридних рослин спостерігалися характерні вирости листової пластинки на черешку (рис. 3), які були відсутні у батьківських видів. Крім того, відмічено незначний хлороз листків у триродових гібридів.

Ген *bar* є фланкованим послідовностями неавтономного мобільного елемента *dSpm*, тому стійкість до фосфіотрицину, обумовлена цим геном, може зберігатися при втраті первинно трансформованої хромосоми *A. thaliana*, якщо встигла відбутися транспозиція на будь-яку хромосому того чи іншого геному. Для визначення присутності *nptII* гена, пов'язаного з генетичним матеріалом арабідопсису, гібриди Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3, Oj56/4 і

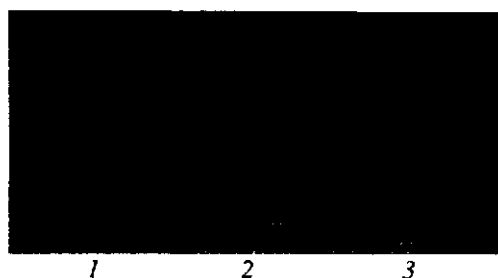


Рис. 3. Морфологія листків гібриду j56 (1), *O. violaceus* (3) та їхнього гібриду Oj56/1 (2)

Oa1 переносили на середовище з канаміцин-сульфатом. Усі рослини виявилися стійкими до дії селективного агента.

ПЛР аналіз для виявлення генів *nptII*, *bar*, *gus* (рис. 4) та *Spm*-транспозази підтвердив їхню присутність в отриманих гібридах.

У гібриду j56, використаного для гібридизації, активність  $\beta$ -глюкуронідази була низькою і детектувалася лише в частини коренів при обробці всієї рослини. Проведення гістохімічного аналізу для виявлення активності  $\beta$ -глюкуронідази у гібридах, отриманих за участі цієї лінії, показало відсутність експресії згаданого гена в Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3 та Oj56/4. Можливими причинами цього є метилювання *gus* гена, реінсерція *dSpm* елемента в сайт первинної локалізації (між *gus* геном і 35S промотором) або походження гібридів від клітин, де була відсутня транспозиція *dSpm* через низький рівень експресії *Spm*-транспозази.

Для остаточного підтвердження гібридної природи рослин були виконані біохімічні та молекулярно-біологічні дослідження. Ми здійснили ізоферментний аналіз множинних форм естерази (рис. 5) та амілази. Спектр ізоформ естерази підтвердив присутність генетичного матеріалу арабідопсису у гібриді Oa1. Наявність ізоформ естерази, характерних батьківським видам *B. juncea*, *A. thaliana* та *O. violaceus*, свідчить про гібридне походження отриманих ліній (Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3, Oj56/4). При аналізі активності амілази у гібридах Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3, Oj56/4 показано присутність ізоформ, характерних для *B. juncea* і *O. violaceus*. Активність ізоформи амілази арабідопсису з високою електрофоретичною рухливістю, яка була маркерною для гібридів між *B. juncea* і *A. thaliana*, значною мірою залежить від фізіологічного стану рослин. Так, у гібридів *B. juncea* + *A. thaliana* вона могла бути відсутньою або її присутність варіювала від ледь помітних зон активності до чітко визначе-

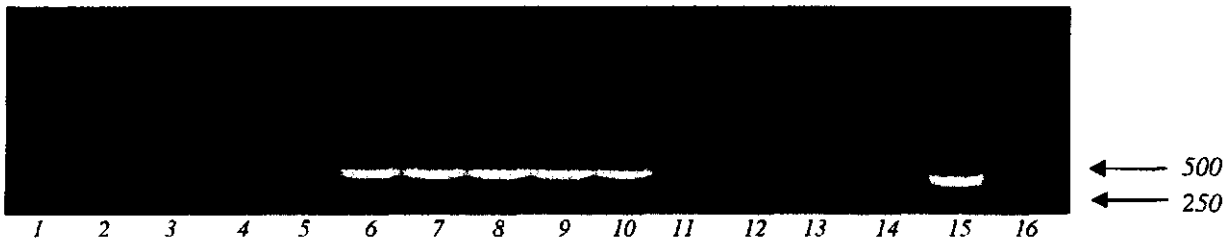


Рис. 4. Аналіз продуктів ампліфікації тотальної ДНК гібридних ліній Oj56/1—j56/4 (1—4, 6—10) та Oal (13, 15), що показує наявність генів *gus* і *bar* відповідно; негативний контроль з праймерами для гена *gus*, ДНК *O. violaceus* (11); негативний контроль з праймерами для гена *bar*, ДНК *O. violaceus* (12), позитивний контроль з праймерами для гена *gus*, ДНК j56 (5); позитивний контроль з праймерами для гена *bar*, ДНК j56 (10); 14 — негативний контроль (без ДНК); 16 — маркер

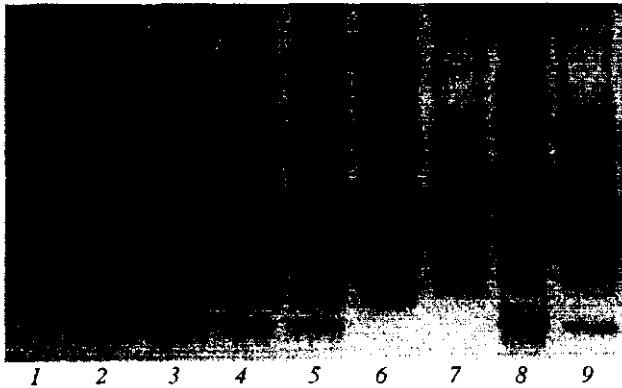


Рис. 5. Ізозимний спектр естерази гібридних ліній Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3, Oj56/4 (2—5), Oal (9), j56 (1), *B. juncea* (6), *A. thaliana* (7), *O. violaceus* (8)

них у зразках одних і тих же ліній. Така смуга завжди була відсутня у контрольній *B. juncea*. Це дає підставу припустити, що експресія генетичного матеріалу *A. thaliana* у гібридних рослинах *B. juncea* + *A. thaliana* була пригніченою. Тому відсутність зони активності амілази арабідопсису в отриманих триродових гібридах не є достовірним свідченням відсутності його генетичного матеріалу, оскільки для лінії j56 була характерна подібна варіабельність.

ITS аналіз показав присутність ядерного генетичного матеріалу всіх трьох батьківських видів у лініях Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3, Oj56/4 (рис. 6). Лінія Oal мала ITS послідовності, притаманні *O. violaceus*.

Для визначення походження хлоропластного геному здійснено *Clal* гідроліз спейсера між генами *atpB*—*rbcL*. Аналіз продемонстрував, що рестриктний спектр дослідженої ділянки ДНК триродових гібридів збігався з таким *B. juncea* та *O. violaceus*, але не *A. thaliana*. Аналіз спейсера між генами *atpH*—*atpI* виявив відмінності в розмірах амплі-

фікованого фрагмента у *O. violaceus* і *B. juncea*. Тому пластиди ліній Oj56/1, Oj56/2, Oj56/3 і Oj56/4 охарактеризовано як такі, що походять від *B. juncea*, а пластиди гібриду Oal — від *O. violaceus*.

Використання ендонуклеаз рестрикції *HaeIII*, *StyI* і *MvaI* для гідролізу *ndh4* показало наявність рестриктного спектра, характерного для *O. violaceus* в усіх гібридах, отриманих з його участю. При *MvaI* гідролізі *ndh4* рестриктні спектри у *O. violaceus* і *B. juncea* збігаються, але вони відмінні від *A. thaliana*. Враховуючи це, вдалося ідентифікувати фрагменти мтДНК *A. thaliana* в гібридах Oj56/3 і Oj56/4. Присутність у гібриді j56 спектра, характерного лише для *A. thaliana*, дозволила припустити, що мтДНК гібридів Oj56/1 і Oj56/2 походить від *O. violaceus*, а не гірчиці. Таким чином, завдяки використанню трьох різних рестриктаз показано, що гібриди Oj56/1 і Oj56/2 мають мтДНК *O. violaceus*; гібриди Oj56/3 і Oj56/4. — мтДНК *O. violaceus* і *A. thaliana*; гібрид Oal — мтДНК *O. violaceus*.

Під час наших експериментів отримано гібридні рослини в двох комбінаціях: а) *O. violaceus* + *A. thaliana*, б) *O. violaceus* + гібрид (*B. juncea* + *A. thaliana*). В усіх одержаних рослин відзначено нормальну морфологію, вони здатні до укорінення.

Гібрид між *O. violaceus* + *A. thaliana* був високоасиметричним, оскільки з усіх проведених молекулярно-біологічних та біохімічних дослідів для виявлення гібридності лише ізоферментний аналіз естерази показав присутність генетичного матеріалу *A. thaliana*. Однак отриманий гібрид, на відміну від вихідного *O. violaceus*, був стійким до канаміцину і фосфінотрицину, як арабідопсис, і забарвлювався при гістохімічному визначенні активності  $\beta$ -глюкуронідази. ПЛР аналізи на вияв-

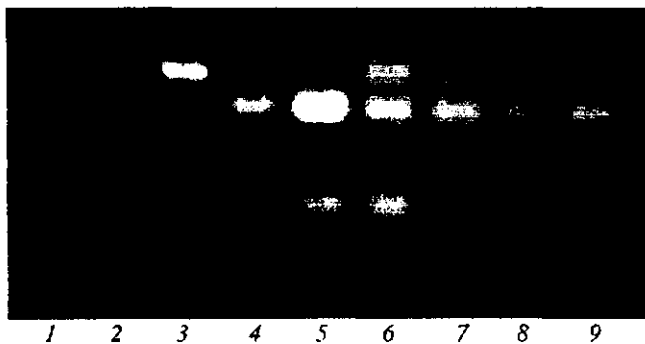


Рис. 6. Аналіз ядерного геному за допомогою *MvaI* гідролізу ITS послідовностей: *O. violaceus* (2), *A. thaliana* (3), *B. juncea* (4) та гібриди Oa1 (1), j56 (5), Oj56/1 (6), Oj56/2 (7), Oj56/3 (8), Oj56/4 (9)

лення генів *nptII*, *bar*, *gus* та *Spm*-транспозази підтвердили присутність цих генів.

У гібридній комбінації *O. violaceus* + гібрид (*B. juncea* + *A. thaliana*) отримано унікальне поєднання гібридного за трьома батьківськими видами ядра, хлоропластів *B. juncea* і мітохондрій *O. violaceus* або *O. violaceus* + *A. thaliana*. Гібриди несли гени *nptII*, *bar*, *gus* і *Spm*-транспозази (за результатами ПЛР) та були стійкими до канаміцину і фосфінотрицину, як j56 або *A. thaliana*, але не давали забарвлення при реакції на виявлення GUS. Таким чином, цілковитої втрати хромосоми(сом), де первинно були інтегровані трансгени, не відбувалося. Можливо, це пов'язано з тим, що явище транспозиції гена в незчлєні локуси є дуже рідкісним. Тому спосіб селекції гібридних рослин, який був спрямований на збереження стійкості до фосфінотрицину (ген *bar*), призводив до відбору лише тих рослин, які зберігали хромосоми арабідопсису із сайтом первинної інтеграції.

Отже, нами показано, що при гібридизації видів *O. violaceus* і *A. thaliana*, а також у такій складній гібридній комбінації, як *O. violaceus* + гібрид (*B. juncea* + *A. thaliana*), не відбувалося повної елімінації генетичного матеріалу *A. thaliana*, а трансгени стабільно зберігалися у геномі гібридів.

O. O. Ovcharenko, I. K. Komarnytskyy, M. M. Cherep, V. A. Rudas, M. V. Kuchuk

Intertribal somatic hybrids of di- and tetragenome origin: production and usage

Summary

Intertribal hybrids in the combinations of *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz + *Arabidopsis thaliana* L. and *O. violaceus* (L.)

O. E. Schulz. + hybrid (*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss + *A. thaliana* L.) were obtained as a result of somatic hybridization. Hybrid nature of the plants obtained was confirmed by the PCR-RFLP and analysis of isozymes. *A. thaliana* L. plants were transformed with a vector carrying heterologous transposable element *Spm/dSpm* and genes *nptII*, *bar*, *gus*, which allowed to examine the behavior of transgenic traits in digenomic and tetragenomic hybrids. The hybrid plants were similar to one of the parental species (*O. violaceus* + *A. thaliana*) or had intermediate morphology (*O. violaceus* + hybrid (*B. juncea* + *A. thaliana*)). All the plants obtained were resistant to kanamycin and phosphinotricin due to the transgenes transferred from *A. thaliana*. The activity of  $\beta$ -glucuronidase was detected in hybrid *O. violaceus* + *A. thaliana* while it was absent in the plants *O. violaceus* + hybrid (*B. juncea* + *A. thaliana*). PCR analysis revealed maintenance of all transgenes in the hybrids.

**Key words:** intertribal somatic hybridization, *Orychophragmus violaceus*, *Brassica juncea*, *Arabidopsis thaliana*, heterologous system of transposable element *Spm/dSpm*

O. A. Ovcharenko, I. K. Komarnytskyy, H. H. Cherep, V. A. Rudas, H. V. Kuchuk

Получение межтрибных соматических гибридов дигеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Arabidopsis thaliana*) и тетрагеномного (*O. violaceus* + *Brassica juncea* + *A. thaliana*) происхождения и их использование для изучения поведения гетерологической системы транспозонов *Spm/dSpm*

Резюме

В результате соматической гибридизации получены межтрибные гибриды в комбинациях *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz. + *A. thaliana* L. и *O. violaceus* (L.) O. E. Schulz. + гибриды (*B. juncea* (L.) Czern. & Coss + *A. thaliana* L.). Гибридная природа полученных растений доказана с помощью ПЦР-ПДРФ и изоферментного анализа. Арабидопсис был трансформирован вектором, содержащим гетерологичную систему транспозонов *Spm/dSpm*, гены *nptII*, *bar*, *gus*, что дало возможность исследовать поведение трансгенных признаков в гибридах ди- и тетрагеномного происхождения. Гибридные растения были похожи на один из родительских видов (*O. violaceus* + *A. thaliana*) либо имели промежуточную морфологию (*O. violaceus* + гибриды (*B. juncea* + *A. thaliana*)). Все полученные растения оказались устойчивыми к канамицин-сульфату и фосфинотрицину благодаря перенесенным от *A. thaliana* трансгенам. Активность  $\beta$ -глюкуронидазы обнаружена в гибриде *O. violaceus* + *A. thaliana* и отсутствовала в растениях *O. violaceus* + гибриды (*B. juncea* + *A. thaliana*). ПЦР методом выявлена сохранность всех трансгенов в гибридах.

**Ключевые слова:** межтрибная соматическая гибридизация, *Orychophragmus violaceus*, *Brassica juncea*, *Arabidopsis thaliana*, гетерологическая система транспозонов *Spm/dSpm*

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.—Киев: Наук. думка, 1984.—160 с.
2. Waara S., Glimelius K. The potential of somatic hybridization in crop breeding // Euphytica.—1995.—85.—P. 217—255.
3. Vlahova M., Hinnisdals S., Frulleux F., Claeys M., Atanasov A., Jacobs M. UV irradiation as a tool for obtaining asymmetric somatic hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Lycopersicon esculentum* // Theor. and Appl. Genet.—1997.—94—P. 184—191.
4. Bates G. W., Hasenkampf C. A., Contolini C. L., Piastuch W.

- C. Asymmetric hybridization in *Nicotiana* by fusion of irradiated protoplasts // *Theor. and Appl. Genet.*—1987.—74, N 6.—P. 718—726.
5. *Menczel L., Morgan A., Brown S., Maliga P.* Fusion-mediated combination of Ogura-type cytoplasmic male sterility with *Brassica napus* plastids using X-irradiated CMS-protoplasts // *Plant Cell Rep.*—1987.—6, N 1.—P. 98—101.
  6. *Dudits D., Fejer J., Hadlaczy G., Koncz C., Lazar G. D., Horvath G.* Intergenic gene transfer mediated by plant protoplast fusion // *Mol. and Gen. Genet.*—1980.—179, N 2.—P. 283—288.
  7. *Sidorov V. A., Menczel L., Nagy F., Maliga P.* Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts // *Planta.*—1981.—152, N 3.—P. 341—345.
  8. *Ananiev E. V., Riera-Lizarazu O., Rines H. W., Phillips R. L.* Oat-maize chromosome addition lines: a new system for mapping the maize genome // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 3524—3528.
  9. *Sundberg E., Glimelius K.* Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae* // *Theor. and Appl. Genet.*—1991.—83.—P. 81—88.
  10. *Babychuk E., Kushnir S., Gleba Y. Y.* Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna* L. // *Theor. and Appl. Genet.*—1992.—84.—P. 87—91.
  11. *Tabaeizadeh Z., Perennes C., Bergounioux C.* Increasing the variability of *Lycopersicon peruvianum* Mill. by protoplast fusion with *Petunia hybrida* L. // *Plant Cell Rep.*—1985.—4, N 1.—P. 7—11.
  12. *Turpin C.* Attempt of male cytoplasmic sterility introduction by intergeneric fusion in cultivated tomato // *Acta Hort.*—1986.—191.—P. 377—379.
  13. *U N.* Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization // *Jap. J. Bot.*—1935.—7.—P. 389—452.
  14. *Овчаренко О. О., Комарницький І. К., Череп М. М., Глеба Ю. Ю., Кучук М. В.* Отримання міжтрибних соматичних гібридів *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana* та дослідження поведінки трансгенних ознак // *Цитологія і генетика.*—2004.—38, № 3.—С. 3—8.
  15. *Medgyesy P., Menczel L., Maliga P.* The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris* and isolation of their somatic hybrids // *Mol. and Gen. Genet.*—1980.—179, N 3.—P. 693—698.
  16. *Menczel L., Nagy F., Kiss Z. R., Maliga P.* Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids // *Theor. and Appl. Genet.*—1981.—59.—P. 191—195.
  17. *Sidorov V. A., Zubko M. K., Kuchko A. A.* Somatic hybridization in potato: use of gamma-irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* in genetic reconstruction // *Theor. and Appl. Genet.*—1987.—74, N 3.—P. 364—368.
  18. *Gamborg O. L., Miller L. A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell Res.*—1968.—50, N 1.—P. 151—158.
  19. *Jefferson R. A.* Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system // *Plant Mol. and Biol. Report.*—1987.—5.—P. 387—405.
  20. *Cheung W. Y., Hubert N., Landry B. S.* A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // *PCR Meths Applics.*—1993.—3.—P. 69—70.
  21. *Сахно Л. А., Сытник Е. С., Череп Н. Н., Комарницький І. К., Кучук Н. В., Климюк В. И.* Активность системы *Spt* транспозонов кукурузы у трансгенных растений *Orychophragmus violaceus* (L.) О. Е. Shultz, полученных путем как прямого переноса ДНК в протопласты, так и агробактериальной трансформацией корневых эксплантов // *Цитология и генетика.*—2002.—36, № 6.—С. 3—8.
  22. *White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications* / Eds M. Innis et al.—San Diego: Acad. press, 1990.—P. 315—322.
  23. *Savolainen V., Corbar R., Moncousin C., Spricher R., Manen J.-F.* Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples // *Theor. and Appl. Genet.*—1995.—90.—P. 1138—1141.
  24. *Tsumura Y., Awanara T., Wickneswari R., Yushimura K.* Molecular phylogeny of *Dipterocarpaceae* in Southeast Asia using RFLP of PCR-amplified chloroplast genes // *Theor. and Appl. Genet.*—1996.—93.—P. 22—29.
  25. *Demesure B., Sodji N., Petit R. J.* A set universal primers for amplification of polymorphic non-coding region of mitochondrial and chloroplast DNA in plant // *Mol. Ecol.*—1995.—4.—P. 129—131.
  26. *Demeke T., Huel P., Baga M., Caswell K., Leung N., Chibbar R. N.* Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat // *Theor. and Appl. Genet.*—1999.—99, N 9.—P. 947—953.
  27. *Борисюк Н. В., Климюк В. И., Пароконный А. С., Самойлов А. М., Череп Н. Н., Шаховский А. М., Шлумуков Л. Р.* Биохимический анализ в клеточной инженерии растений.—Киев, 1988.—49 с. (Препринт / АН УССР, Институт ботаники; 88.1).
  28. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.* Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений.—Киев: Наук. думка, 1982.—103 с.
  29. *Tissier A. F., Marillonnet S., Klimyuk V., Patel K., Torres M. A., Murphy G., Jones J. D. G.* Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics // *Plant Cell.*—1999.—11, N 10.—P. 1841—1852.
  30. *Василенко М. Ю., Комарницький І. К., Сахно Л. А., Глеба Ю. Ю., Кучук Н. В.* Получение и анализ межродовых соматических гибридов между *Brassica napus* и линией типа «albino» *Orychophragmus violaceus* // *Цитология и генетика.*—2003.—37, № 1.—С. 3—10.
  31. *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.) О. Е. Schulz. // *Физиология и биохимия культур растений.*—2002.—34, № 1.—С. 75—79.

УДК 577.21:575.222.7

Надійшла до редакції 25.03.04