

## Оригинальные работы

УДК 577.21: 575.222.7

Л.О. САХНО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ,  
М.Н. ЧЕРЕП, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України  
03143, Київ-143, вул. Заболотного, 148  
E-mail: iicb@iicb.kiev.ua

### СОМАТИЧНІ ГІБРИДИ *BRASSICA NAPUS* + + *ORYCHOPHRAGMUS VIOLACEUS*, СТІЙКІ ДО ФОСФІНОТРИЦИНУ



В результаті експериментів з соматичної гібридизації між ріпаком *Brassica napus* L. сорту Калинівський і *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shulz. отримано гібридні рослини, стійкі до фосфінотрицину (PPT). Стійкість до PPT гібриди успадкували від *O. violaceus*, який був попередньо трансформований вектором, що містив *Spm/dSpm* систему транспозонів кукурудзи з геном *bar* в межах неавтономного транспозона. Морфологічно отримані рослини займали проміжне положення між вихідними формами, що узгоджується з результатами ізоферментного (аналіз множинних форм амілази і естерази) та ПЛР (наявність генів *bar*, *gus*, *SpmTPase*) аналізів. Успадкування пластоми відбувалось від ріпака, мітохондріону — від *O. violaceus*, що доведено за допомогою ПЛР—ПДРФ-аналізу. Гібридні рослини можуть залучатися в подальшу селекційну роботу з ріпаком після перевірки харчової якості їх олії, а також в експерименти з хлоропластної трансформації, що для ріпака залишається актуальним.

© Л.О. САХНО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ, М.Н. ЧЕРЕП,  
М.В. КУЧУК, 2006

**Вступ.** Гібридизація, в тому числі соматична, використовується для розширення генетичної бази селекції за рахунок привнесення в геном культурних видів цінних генів дикорослих родичів. Ефективна селекційна робота з ріпаком *Brassica napus* L. (геном AC,  $2n = 38$ ), що належить до роду *Brassica* родини хрестоцвітих і на сьогодні посідає друге місце серед олійних культур за валовим збором рослинної олії в світі [1], вже не може обійтися без використання досягнень в галузі клітинної біології та генетичної інженерії [2, 3]. Основними напрямками роботи з цією культурою є покращання харчової і технічної якості олії та отримання рослин, стійких до гербіцидів.

Олія з насіння *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shulz. (геном O,  $2n = 24$ ), дикого виду з родини хрестоцвітих, що належить до триби *Brassicaceae*, містить велику кількість олеїнової (20,32 %), лінолевої (53,17 %) та пальмітинової (14,31 %) кислот і малу кількість ліноленої (4,76 %) та ерукової (0,94 %) кислот. Крім того, цей вид характеризується високою врожайністю насіння [4]. Саме тому його бажано залучити до селекційних програм з ріпаком.

Гібриди між *B. napus* і *O. violaceus* можна отримати шляхом класичної гібридизації, але, по-перше, цей процес дуже трудомісткий — один гібридний зародок приблизно на 400 опилень [5]. По-друге, їх збереження потребує використання культури зародків в умовах *in vitro*. Соматичні гібриди між даними видами морфологічно і фізіологічно нормальні [6, 7]. Тому ми вирішили отримати соматичні гібриди між цими культурами. Це дасть можливість збільшити кількість матеріалу за менший проміжок часу. Крім того, використання в роботі попередньо трансформованих рослин — представників дикого виду, що набули стійкості до гербіциду BASTA, дозволить отримати гібридні рослини ще з однією цінною ознакою.

**Матеріали і методи. Вихідний матеріал.** Як вихідний матеріал для досліджень використовували насіння ярого ріпака (*Brassica napus* L. var. *oleifera* DC.) промислового сорту Калинівський селекції Національного аграрного університету, люб'язно надане проф. В.Ф. Пересипкіним, та трансформовані рослини *O. violaceus*, отримані нами раніше [8], які характеризувались наявністю в своєму геномі неавтономного транспозону, в межах якого містився ген *bar* (рис. 1).

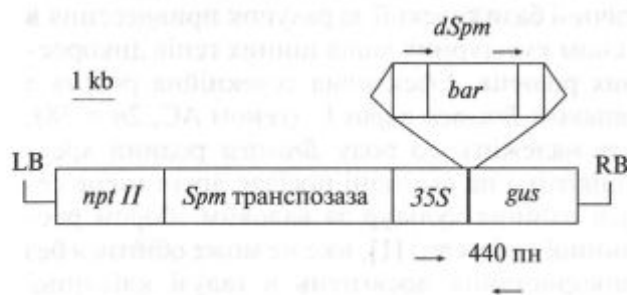


Рис. 1. Схема конструкції рС401, яка була використана для трансформації *O. violaceus*: LB і RB — граничні послідовності Т-ДНК, *nptII* — селективний ген; *dSpm* — неавтономний елемент, в межах якого знаходиться ген *bar*; ген *gus* — маркер процесу транспозиції

**Соматична гібридизація.** Протопласти виділяли з 5–7-добових етиольованих гіпокотилів ріпака та з листя 3–4-тижневих рослин *O. violaceus*, що культивувались в умовах *in vitro*. Мезофільні протопласти *O. violaceus* перед злиттям обробляли 5 мМ розчином іодацетаміду (ІАА) протягом 20 хв при 8 °С, що запобігало їх самостійному діленню в разі невходження до складу гібридної клітини.

Злиття протопластів проводили за методикою Menczel et al. [9]. Етапи культивування були подібні до таких в експериментах з отримання трансформантів *O. violaceus* [8] за винятком регенерації: агаризоване середовище MS було доповнене БАП (1 мг/л), НОК (1 мг/л) та ГК (1 мг/л). Селекцію гібридів розпочинали на стадії переносу клітинних колоній на середовище для регенерації (5 мг/л фосфінотрицину (РРТ), діючої речовини гербіциду BASTA). Зелені калуси, що розвивались за цих умов, пасували на середовище з удвічі більшою концентрацією селективного агента. Отримані стійкі рослини пересаджували на свіже безгормональне середовище кожні чотири тижні.

#### Праймери, які використовувались при проведенні ПЛР-аналізів

Ген	Праймери	Розмір фрагмента, п.н.	Автор
<i>gus</i>	5'-TGGGTGGACGATATCACCGTGGTGA-3' і 5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3'	423	[8]
<i>Spm TPase</i>	5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3' і 5'-GCTTTTGGGTATGCAGCCTAGTTC-3'	600	[8]
<i>bar</i>	5'-ATGAGCCCAGAACGACGCCCGGCC-3' і 5'-GCATGCGCACGCTCGGGTCGTTGG-3'	413	
<i>atpB-rbcL</i>	5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3' і 5'-TACAGTTGTCCATAGTACCAG-3'	1047	[13]
<i>ndh7</i>	5'-GCTTTACSTTATTCTGATCG-3' і 5'-TGTTCTTGGGCCATCATAGA-3'	1500	[14]

**Ізоферментний аналіз.** Аналіз ізозимних спектрів амілаз і естераз проводили за стандартними методиками [10].

**ПЛР–ПДРФ-аналіз** використовували для підтвердження гібридної природи отриманих рослин (наявність генів *bar*, *gus*, *Spm TPase*) та вивчення хлоропластного і мітохондріального геномів. З листової тканини досліджуваних рослин виділяли ДНК згідно з методикою, запропонованою Cheung et al. [11]. Використовували низку праймерів, розроблених раніше (таблиця), для гена *bar* праймери були підібрані нами на основі його первинної структури [12].

Ампліфікований фрагмент гена мітохондріальної НАД-дегідрогенази *ndh4* гідролізували рестрикційною ендонуклеазою *HaeIII*. Ампліфікований спейсерний фрагмент між хлоропластними генами *atpB-rbcL* гідролізували рестрикційною ендонуклеазою *MnII*.

Для ПЛР використовували 40 нг ДНК зразка, по 0,5 мкМ відповідних праймерів (таблиця), по 200 мкМ кожного з трифосфатів, 1 од. *Taq* ДНК-полімерази, ПЛР реакційний буфер, що містив 50 мМ КСl, 10 мМ Tris-HCl (рН 9 при 25 °С), 0,1 % Triton X-100 і 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Загальний об'єм суміші становив 20 мкл. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5 %-ному агарозному гелі в трис-ацетатній буферній системі.

**β-глюкуронідазна проба.** *Gus*-активність визначали, проводячи гістохімічну реакцію за Jefferson [15]. Листя інкубували при 37 °С в розчині, що містив 5 мг/мл 5-бромо-4-хлоро-3-індоліл-β-D-глюкуроніда (X-gluc) в 50 мМ Na-фосфатному буфері (рН 7,0) і 20 % (v/v) метанолу. Після завершення реакції (3–8 год) листя занурювали в 70%-ний етанол для екстракції хлорофілу. Про активність β-глюкуронідази свідчило блакитне забарвлення листя.

**Результати досліджень та їх обговорення.** В ході проведених експериментів було отримано 560 зелених калусів, з яких регенерувало і потім росло на середовищі в присутності фосфінотрицину (10 мг/л) 28 пагонів. Сформовані рослини мали нормальну морфологію та спонтанно утворювали коріння при пасуванні на безгормональному середовищі. Гібридні рослини між *B. napus* і *O. violaceus*, отримані в результаті експериментів з соматичної гібридизації, мали морфологічні ознаки обох вихідних видів. За формою листової пластинки вони більш подібні до ріпака (рис. 2); вкорочені міжвузля та зменшені за рахунок цього розміри рослин гібриди успадкували від *O. violaceus*. Корені у отриманих рослин в умовах асептичної культури нагадували корені у *O. violaceus*: більш короткі та розгалужені в порівнянні з ріпаком. Здатність формувати квіти під час культивування *in vitro* гібриди також набули від дикого виду, що залучався в дослідження.

Гібридна природа отриманих рослин була підтверджена при вивченні ізоферментних спектрів амілаз і естераз (рис. 3, а, б). З десяти проаналізованих клонів для дев'яти показано наявність ізозимів, характерних для обох вихідних форм. Крім того, присутність у ядрі генів *bar* (рис. 4), *gus*, *SpmTPase* (результати не представлені) показано за допомогою ПЛР.

Наші результати збігаються з такими, що отримано в роботі Nu et al. [7], і деякою мірою не узгоджуються з результатами Василенко та ін. [6]. В останній роботі більшість регенерованих рослин виявились цибридами, тобто мали ядерний матеріал *O. violaceus* та пластом ріпака. Можливо, це відбулось за рахунок різних систем відбору продуктів соматичної гібридизації. В наших дослідах регенерація проходила за наявності в середовищі селективного агента — фосфінотрицину, а стійкість до нього була притаманна попередньо трансформованим рослинам *O. violaceus*. За умови інактивації протопластів *O. violaceus* перед злиттям розчином іодацетаміду лише гібридні лінії можуть бути стійкими до PPT. В експериментах Василенко та ін. [6] проводився відбір тих колоній, які розвивалися більш активно і швидко, що характерно для *O. violaceus*.

Ядерний геном отриманих рослин містив елементи генетичної конструкції, використаної для трансформації *O. violaceus*: репортер-

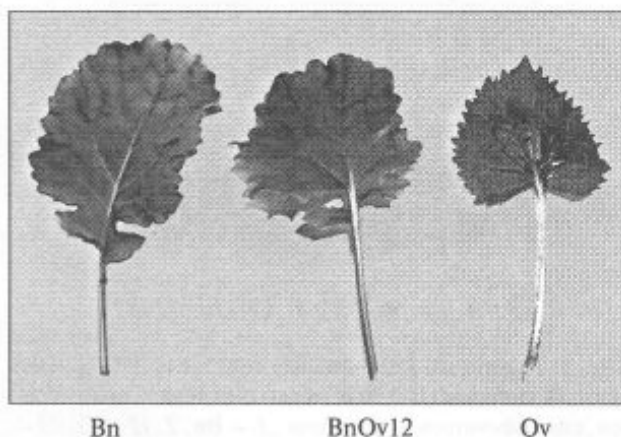


Рис. 2. Форма листової пластинки ріпака (Bn), *O. violaceus* (Ov) та гібридної лінії 12 (BnOv12)

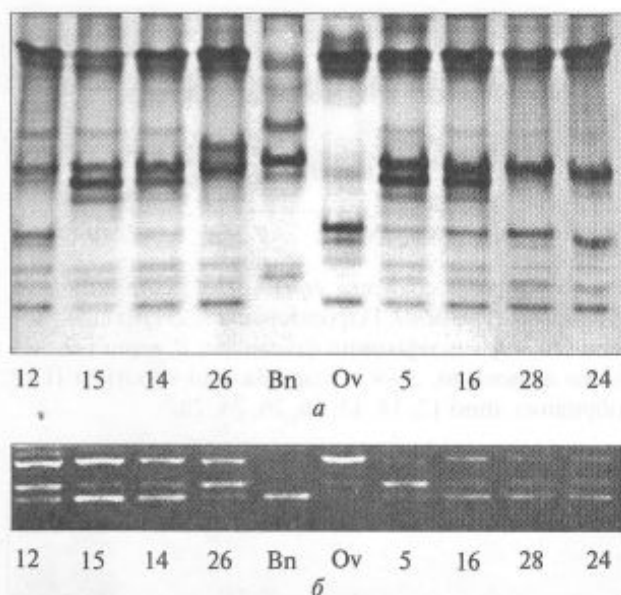


Рис. 3. Ізозимні спектри естераз (а) і амілаз (б) ріпака (Bn), *O. violaceus* (Ov) та їх гібридних ліній 12, 15, 14, 26, 16, 28, 24

ний *gus*-ген, структурний *bar*-ген, який знаходився в межах неавтономного транспозону *dSpm*, і *Spm* транспозазу (*SpmTPase*) [8]. Для соматичної гібридизації була взята лінія, що містила всі компоненти вектора (рис. 1), окрім гена *nptII*. Утворення її відбулось за рахунок неповного переносу генів під час прямої трансформації протопластів *O. violaceus* плазмідною ДНК [8]. Таким чином, гібридні рослини не мають додаткового небажаного селективного гена.

Гістохімічний аналіз отриманих рослин не виявив у них характерного синього забарвлен-

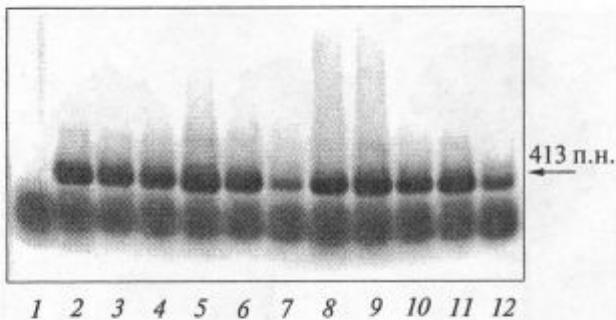


Рис. 4. Результати ПЛР-аналізу тотальної ДНК ріпака (Bn), *O. violaceus* (Ov) та їх гібридних ліній з праймерами, специфічними до *bar*-гена: 1 — Bn, 2, 12 — Ov; 3 — 11 — гібридні лінії 9, 12, 15, 14, 26, 16, 28, 24, 13

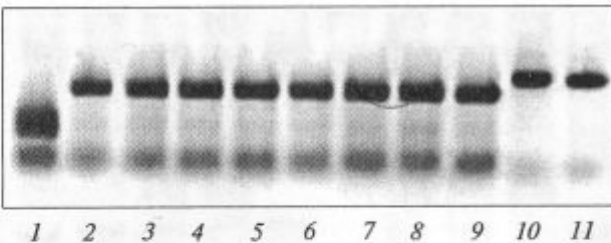


Рис. 5. Гідроліз спейсера *atpB* — *rbcL* рестрикційною ендонуклеазою *MnlI*. Гідролізовані (1, 2) і негідролізовані (10, 11) ампліфіковані фрагменти *B. napus* і *O. violaceus* відповідно, 3—9 — гідролізовані продукти ПЛР гібридних ліній 12, 14, 15, 16, 26, 24, 28

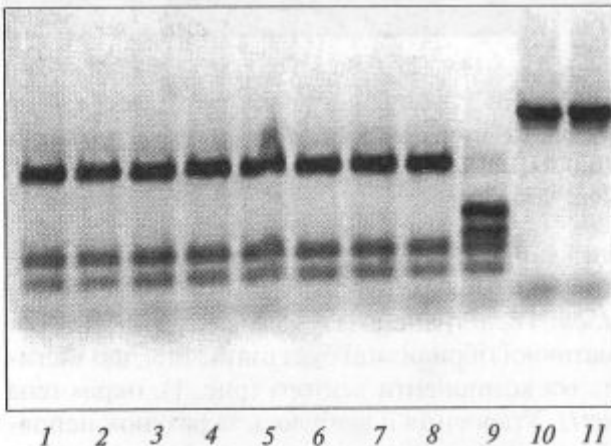


Рис. 6. *HaeIII* гідроліз ампліфікованого фрагмента гена *ndh4*. Гідролізовані (8, 9) і негідролізовані (10, 11) ампліфіковані фрагменти *O. violaceus* і *B. napus* відповідно, 1—7 — гідролізовані продукти ПЛР гібридних ліній 12, 14, 15, 16, 24, 26, 28

ня листя при інкубації з розчином X-gluc. Це свідчить про те, що *gus*-ген не є активним у гібридних рослинах. В плазміді він відокремлений від 35S промотора інсерцією *dSpm* елемента і міг ставати функціональним тільки після *dSpm* ексцизії та наступної транспозиції (рис. 1). Оскільки транспозон був активним у лінії, взятої для гібридизації, можна припустити, що відбулась його інактивація в гібридах, ймовірно, за рахунок метилювання [16, 17]. Соматичні гібриди, в яких згадана система транспозонів є активною, отримані між ріпаком і арабідопсисом, гірчицею і арабідопсисом в роботах Овчаренко та ін. [18, 19]. Розбіжність в наших результатах викликана, можливо, різною сумісністю обраних геномів або ступенем активності транспозону в лініях, використаних у гібридизації.

Хлоропластний геном гібриди отримали від ріпака, підтвердженням цього є гідроліз ампліфікованого спейсерного фрагмента між хлоропластними генами *atpB-rbcL* рестрикційною ендонуклеазою *MnlI* (рис. 5, таблиця). При соматичній гібридизації хрестоцвітих таке явище спостерігається найчастіше: успадкування пластоми відбувається від того виду, ядерний матеріал якого переважає [20, 21].

ПДРФ-аналіз ампліфікованого фрагмента мітохондріального гена *ndh4* показав, що мітохондріон гібридів походить від *O. violaceus* (рис. 6). Відомо, що для генів мітохондрій характерним є випадкове успадкування [6, 18—23], це справдилось і в даних експериментах.

Таким чином, отримані соматичні гібриди між *B. napus* і *O. violaceus* мають ядерний геном обох вихідних форм, пластом ріпака і мітохондріон *O. violaceus*. Їх особливістю є стійкість до гербіциду BASTA і відсутність генів стійкості до антибіотиків. Ці рослини можна залучати в подальшу селекційну роботу з ріпаком після перевірки харчової якості їх олії, а також в експерименти з хлоропластної трансформації, що для ріпака залишається актуальним.

**SUMMARY.** Phosphinothricin (PPT) resistant hybrid plants between *Brassica napus* L. cv. Kalinovsky and *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shulz. were obtained as a result of somatic hybridization experiments. The hybrids inherited PPT resistance from *O. violaceus* plants which were previously transformed by the vector containing *Spm/dSpm* *Zea mays* transposon system with *bar* gene

located within the nonautonomous transposon. The obtained plants had intermediate morphology. Their hybrid nature has been confirmed by isozyme (esterase and amylase activity) and PCR (*bar*, *gus*, *Spm/dSpm* integration) analyses. The hybrids combined *B. napus* plastom and *O. violaceus* mitochondrion that was revealed by PCR-RFLP. The hybrid plants might be included to rapeseed breeding programme after examination of their oil quality as well as to chloroplast transformation experiments that is still urgent for *B. napus*.

**РЕЗЮМЕ.** В результате экспериментов по соматической гибридизации между рапсом *Brassica napus* L. сорта Калиновский и *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shulz. получены гибридные растения, устойчивые к фосфінотрицину (PPT). Устойчивость к PPT гибриды унаследовали от *O. violaceus*, который был предварительно трансформирован вектором, содержащим *Spm/dSpm* систему транспозонов кукурузы с геном *bar* в пределах неавтономного транспозона. Морфологически полученные растения занимали промежуточное положение между исходными формами. Это согласуется с результатами изоферментного (анализ множественных форм амилаз и эстераз) и ПЦР (наличие генов *bar*, *gus*, *SpmTPase*) анализов. Наследование пластома происходит от рапса, митохондрия — от *O. violaceus*, что доказано с помощью ПЦР—ПДРФ-анализа. Гибридные растения могут быть вовлечены в последующую селекционную работу с рапсом после проверки пищевой ценности их масла, а также в эксперименты по хлоропластной трансформации, что остается для рапса актуальным.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Murphy D.J. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops // *Tibthec.* — 1996. — 14. — P. 206—213.
2. Pudderphat I.J., Riggs T.J., Fenning T.M. Transformation of *Brassica oleracea* L.: a critical review // *Mol. Breed.* — 1996. — 2. — P. 185—210.
3. Радчук В.В., Блюм Я.Б. Успехи и проблемы генетической трансформации растений семейства крестоцветных // *Цитология и генетика.* — 2005. — 39, № 3. — С. 13—30.
4. Luo P., Lan Z.Q., Li Z.Y. *Orychophragmus violaceus*, a potential edible-oil crop // *Plant Breed.* — 1994. — 113. — P. 83—85.
5. Li Z., Liu H.L., Luo P. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* // *Theor. Appl. Genet.* — 1995. — 91, № 1. — P. 131—136.
6. Василенко М.Ю., Комарницкий И.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.
7. Hu Q., Hansen L.N., Lausen J., Dixelius C., Andersen S.B. Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — 105. — P. 834—840.
8. Сахно Л.А., Сытник Е.С., Череп Н.Н., Комарницкий И.К., Кучук Н.В., Климяк В.И. Активность системы *Spm* транспозонов кукурузы у трансгенных растений *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Shultz, полученных путем как прямого переноса ДНК в протопласты, так и агробактериальной трансформацией корневых эксплантов // *Цитология и генетика.* — 2002. — 36, № 6. — С. 3—8.
9. Menczel L., Nagy F., Kiss Z., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *N. tabacum* + *N. knightiana*: correlation and resistance to *N. tabacum* plastids // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — 59. — P. 191—198.
10. Борисюк Н.В., Климяк В.И., Пароконный А.С., Самойлов А.М., Череп Н.Н., Шаховский А.М., Шлумуков Л.Р. Биохимический анализ в клеточной инженерии растений // *Препринт 88.1* Института ботаники АН УССР, 1988. — 48 с.
11. 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 Appl.* — 1993. — 3. — P. 69—70.
12. Thompson C.J., Rao Movva N., Tizard R., Cramer R., Davies J.E., Lauwereys M., Botterman J. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hydroscopicus* // *EMBO J.* — 1987. — 6. — P. 2519—2523.
13. Savolainen V., Corbar R., Moncousin C., Spricher R., Manen J.-F. Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples // *Theor. Appl. Genet.* — 1995. — 90. — P. 1138—1141.
14. Demesure B., Sodzi 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.
15. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // *Plant Mol. Biol. Rep.* — 1987. — 5. — P. 387—405.
16. Тищенко Е.Н., Кунцевич В.И. Метилирование ДНК и экспрессия генов растений // *Физиология и биохимия культур. растений.* — 2002. — 34, № 3. — С. 213—226.
17. Chareonpornwattana S., Thara K.V., Wang L. Datta S.K., Panbangred W., Muthukrishnan S. Inheritance, expression, and silencing of a chitinase transgene in rice // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — 98. — P. 371—378.
18. Овчаренко О.О., Комарницкий И.К., Череп М.М., Кучук М.В. Отримання і аналіз соматичних гібридів *Brassica napus* + *Arabidopsis thaliana*, що містять ге-

- терологічну систему транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm* // Цитология и генетика. — 2005. — 39, № 3. — С. 50—57.
19. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.М., Рудас В.А., Кучук М.В. 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* // Біополімери і клітина. — 2005. — 21, № 1. — С. 35—41.
20. Skarzhinskaya M., Landgren M., Glimelius K. Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats // Theor. Appl. Genet. — 1996. — 93, № 8. — P. 1242—1250.
21. Sundberg E., Lagercrantz U., Glimelius K. Effects of cell type used for fusion on chromosome elimination and chloroplast segregation in *Brassica oleracea* (+) *Brassica napus* hybrids // Plant Sci. — 1991. — 78, № 1. — P. 89—98.
22. Yamagishi H., Landgren M., Forsberg J., Glimelius K. Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system // Theor. Appl. Genet. — 2002. — 104. — P. 959—964.
23. Yamagishi H., Glimelius K. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*) // Plant Cell Rep. — 2003. — 22. — P. 52—58.

Надійшла 10.03.06