

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

На правах рукопису

Овчаренко Ольга Олександрівна

УДК 577.21+575.222.7+582.683.2

**ОТРИМАННЯ МІЖТРИБНИХ СОМАТИЧНИХ ГІБРИДІВ РОДИНИ BRASSICACEAE, ЩО
МІСТЯТЬ АКТИВНУ ГЕТЕРОЛОГІЧНУ СИСТЕМУ ТРАНСПОЗОНІВ КУКУРУДЗИ
*SPM/DSPM***

Спеціальність 03.00.20 - Біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2005

Дисертацією є рукопис.

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук **Кучук Микола Вікторович**,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН
України, заст. завідуючого відділу генетичної інженерії

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук **Парій Федір Микитович**,
Інститут цукрових буряків УААН, провідний науковий
співробітник лабораторії селекції цукрових буряків

кандидат біологічних наук

Спіридонова Катерина Василівна, Інститут молекулярної
біології та генетики НАН України, старший науковий
співробітник відділу генетики клітинних популяцій

Провідна установа: Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

Захист відбудеться 27.10.2005 р. о 14 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148

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

Автореферат розіслано 23.09. 2005 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О.А.Кравець

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Мобільні генетичні елементи рослин, або, як їх ще називають, транспозони, починаючи з класичних робіт лауреата Нобелівської премії Б. МакКлінток, являють собою унікальну генетичну систему для вивчення мінливості та нестабільності геному. Їх використовують для мічення та клонування генів (Aarts et al., 1993; Cardon et al., 1993; Majira et al., 2002), створення серій трансгенних ліній з різним геномним розташуванням трансгенів (Goldsborough et al., 1993), отримання безмаркерних трансгенних рослин, що не несуть генів стійкості до антибіотиків (Yoder, Goldsbrough, 1994; Ebinuma et al., 1997). Раніше було показано, що в межах одного геному є можливою транспозиція мобільного елемента з однієї хромосоми на іншу (Břiza et al., 2002). Однак, транспозиція мобільних елементів між різними геномами досі ще не виявлена. Встановлення та дослідження такого процесу має неабияке теоретичне значення, а також може бути застосоване в практичних дослідженнях для швидкого переносу гена, що цікавить, від рослини-донора до різних сортів сільськогосподарських видів без руйнування їх унікальних генетичних ознак. Але для дослідження цього процесу необхідно створити гібриди, які містили б хромосоми двох чи більше видів, один з яких буде донором транспозона. Для виду, який буде використаний як донор мобільного елемента, повинна існувати надійна система генетичної трансформації.

Представник родини Brassicaceae триби *Sisymbriae Arabidopsis thaliana* L. є модельним об'єктом для генетичних досліджень, одним з двох видів рослин, чий геном сиквеновано. Рослини цього виду легко трансформувати як *in vitro*, так і *in vivo*. Статева гібридизація між *A.thaliana* та представниками триби *Brassicae*, до якої належить більшість культивованих видів, не була успішною через значну філогенетичну віддаленість між ними. В той же час існує ряд повідомлень про успішну соматичну гібридизацію. Так, на сьогодні є повідомлення про отримання соматичних гібридів *A.thaliana* з *Brassica campestris* (Gleba, Hoffman, 1980), *B.nigra* (Siemens, Sacristan, 1995), *B.oleracea* (Нітовська, 1997), *B.napus* (Bauer-Weston et al., 1993; Forsberg et al., 1994; Yamagishi et al., 2002), *Raphanus sativus* (Yamagishi et al., 2003). У низці робіт (Gleba, Hoffman, 1980; Forsberg et al., 1994; Yamagishi et al., 2003) при соматичній гібридизації культурних видів триби *Brassicae* з *A.thaliana* спостерігали часткову елімінацію батьківських хромосом у ряду гібридних клонів. Тому, використання методів соматичної гібридизації може бути корисним при створенні систем, придатних для вивчення міжгеномних переміщень транспозонів. При віддаленій соматичній гібридизації можлива транспозиція мобільного елемента з одного генома на інший та подальша втрата хромосоми виду-донора з сайтом первинної інтеграції транспозона. Переміщення мобільного елемента можна буде простежити за збереженням в геномі реципієнта здатного до транспозиції трансгена, оточеного послідовностями мобільного елемента, та за відсутністю інших трансгенів, які будуть залишатися в геномі виду-донора.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводились в рамках бюджетних тем відділу цитофізіології та клітинної інженерії ІКБГІ НАНУ (з 2000 р. – відділ генетичної інженерії) “Вивчення молекулярно-біологічних та генетичних процесів у трансгенних та трансгеномних клітинних лініях та рослинах” (1999 р.), “Дослідження біологічних процесів у генетично модифікованих рослинах” № ДР 0101U000390 (2000 – 2004 рр.) та “Створення нових генетичних конструкцій та отримання на їх основі трансгенних рослин методами пластомної та генетичної інженерії за допомогою високоефективних методів трансформації” № ДР 0102U006018 (з 2002 р.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було отримання міжтрибних соматичних гібридів у представників родини Brassicaceae та вивчення у них активності гетерологічної системи транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm*.

Згідно з поставленою метою в завдання роботи входило:

1. Методом соматичної гібридизації отримати міжтрибні гібриди у таких комбінаціях: *Brassica juncea*+*Arabidopsis thaliana*, *B.napus*+*A.thaliana*, *Orychophragmus violaceus*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*).
2. Провести аналіз ядерного та цитоплазматичного геномів отриманих гібридів.
3. Дослідити активність системи мобільних генетичних елементів кукурудзи *Spm/dSpm* в отриманих гібридах.

Об'єкт дослідження – активність гетерологічних мобільних генетичних елементів у соматичних гібридах.

Предмет дослідження – отримання соматичних гібридів між лініями ядерних трансформантів *A.thaliana*, що містять *Spm/dSpm* систему мобільних елементів, і рядом культивованих та диких видів: *B.juncea* + *A.thaliana*, *B.napus* + *A.thaliana*, *O.violaceus* + *A.thaliana*, *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*); їх морфологічний, біохімічний і молекулярно-біологічний аналізи, дослідження присутності та експресії трансгенів у отриманих гібридів.

Методи дослідження – методи культивування рослин *in vitro* (методика виділення та культивування протопластів, методика соматичної гібридизації шляхом ПЕГ-опосередкованого злиття протопластів); методики морфологічного, біохімічного та молекулярно-біологічного аналізу отриманих соматичних гібридів (вивчення спектрів множинних форм естерази, амілази, аспартатамінотрансферази, малатдегідрогенази, пероксидази, ПЛР-ПДРФ, RAPD); методики аналізу присутності трансгенів та їх експресії (ПЛР, тест на гістохімічне виявлення активності β -глюкуронідази).

Наукова новизна.

●З використанням транспозону кукурудзи *Spm* вперше створено систему, придатну для дослідження міжгеномної транспозиції мобільних генетичних елементів рослин.

●Вперше отримано міжтрибні соматичні гібриди шляхом злиття ізольованих протопластів у таких комбінаціях: *B.juncea* + *A.thaliana*, *O.violaceus* + *A.thaliana*, *O.violaceus*+ (*B.juncea*+*A.thaliana*).

●Вперше у родині Brassicaceae були отримані рослини-регенеранти при поєднанні геномів 4 видів.

●Вперше показано активність гетерологічної системи мобільних елементів кукурудзи *Spm/dSpm* у міжтрибних соматичних гібридах *B.juncea* + *A.thaliana*, *B.napus* + *A.thaliana*, *O.violaceus* + *A.thaliana*.

Практична цінність роботи. Розроблено підходи, які дозволяють досить швидко і легко отримувати соматичні гібриди між філогенетично-віддаленими представниками родини Brassicaceae. Підходи можуть бути використані для отримання гібридних рослин методом соматичної гібридизації у інших міжвидових комбінаціях представників цієї родини.

На основі соматичних гібридів було створено систему, яка дозволить дослідити можливість міжгеномного переміщення гетерологічної системи транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm*.

Отримані гібридні рослини можна використати для мічення та клонування генів. Колекція рослин, які містять активний мобільний генетичний елемент кукурудзи *Spm/dSpm*, може бути використана для створення геномних бібліотек. Послідовності мобільного елемента відіграють при цьому роль міток, полегшуючи процес клонування генів.

Отримані в ході роботи результати використовуються у навчальному процесі на кафедрі клітинної біології у Національному університеті ім. Т.Г.Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Особистий внесок здобувача полягає в розробці завдань досліджень, проведенні всіх основних експериментів і дослідів, аналізі літератури, підготовці та написанні наукових статей. Спільно з науковим керівником проведено вибір об'єктів і напрямку досліджень, розробку структури дисертаційної роботи. Насіння трансгенного арабідопсису було люб'язно надано фірмою "Icon Genetics GmbH" (ФРН).

У проведенні досліджень та їх узагальненні частка автора складає 80%. Всі дослідження виконувались за безпосередньою участю здобувача, отримані результати обговорено та опубліковано в спільних публікаціях.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на міжнародній науковій конференції "Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources" (2002 р., Ялта, Україна), на міжнародній науковій конференції "Фактори експериментальної еволюції" (2004 р., Алушта, Україна), на міжнародній науковій конференції "Молекулярная генетика, геномика и биотехнология" (2004 р., Мінськ, Беларусь), на IX конференції молодих дослідників, присвяченій 100-річчю від дня народження академіка АН УРСР і ВАСГНІЛ П.А. Власюка "Актуальні проблеми фізіології, генетики та біотехнології рослин і ґрунтових мікроорганізмів" (2005 р., Київ,

Україна), а також на наукових семінарах відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Публікації. За результатами дисертації опубліковано 6 наукових робіт, з них три наукові фахові статті.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із списку умовних скорочень, вступної частини, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, висновків і списку літератури, що містить 260 посилань. Робота викладена на 161 сторінках, включає 15 таблиць та 52 рисунки.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Рослинний матеріал. В роботі було використано асептичні рослини таких видів родини Brassicaceae:

1) рослини дикого типу видів триби *Brassicae*: гірчиці сарептської *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. сорту Green in Snow, ярого ріпаку (*Brassica napus* L.) (сорти Westar і Калинівський) та *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Schulz;

2) рослини *Arabidopsis thaliana* L., (триба *Sisymbriae*) трансформовані конструкцією, яка містить гетерологічну систему мобільних генетичних елементів *Spm/dSpm* (рис. 1). Насіння арабідопсису було люб'язно надано фірмою “Icon Genetics GmbH” (ФРН).

Насіння *B.juncea*, *B.napus* та *O.violaceus* стерилізували 2 хв у 70% етанолі та 15 хв у комерційному розчині “Білизна”. Насіння *A. thaliana* витримували 1 хв в 70% етанолі і 5 хв у розчині “Білизна”. Після стерилізації матеріал тричі відмивали в стерильній дистильованій воді, підсушували на фільтрувальному папері та висівали на тверде живильне середовище B5 (Gamborg et al., 1968). Насіння пророщували при температурі 25°C, освітленості 3000 лк, фотоперіоді – 16 год. Надалі асептичні рослини підтримували в культурі *in vitro* живцюванням. Для експериментів використовували рослини віком 3 – 4 тижні.

Виділення протопластів та соматична гібридизація. Протопласти гірчиці, ріпаку, *O.violaceus* та арабідопсису виділяли за описаною раніше методикою (Овчаренко та інші, 2004). Співвідношення, у яких змішували протопласти, дещо відрізнялися в залежності від батьківських видів. Протопласти *B.juncea*, *B.napus* або *O.violaceus* змішували з протопластами *A.thaliana* у співвідношенні 3:1, тоді як протопласти *O.violaceus* з протопластами гібриду j56 – у співвідношенні 6:1.

Злиття протопластів проводили за модифікованою методикою Menczel et al. (1981). Протопласти культивували в темряві при 25°C протягом 7 діб на середовищі SW1 (Sidorov et al., 1987). Після перших поділів до суспензії протопластів додавали рівний об'єм середовища SR

(Овчаренко та інші, 2004), культивували при температурі 25°C, освітленості 3000 лк, фотоперіоді – 16 год.

У випадку, коли одним із партнерів при соматичній гібридизації були *B.juncea* чи *B.napus*, отримані на рідкому середовищі колонії переносили на агаризоване регенераційне середовище FH (Овчаренко та інші, 2004) з додаванням 5,0 мг/л фосфінотрицину). Для регенерації гібридів, отриманих за участю рослин *O.violaceus* макроколонії переносили на модифіковане агаризоване регенераційне середовище B5 (Gamborg et al., 1968) з додаванням 0,2 М маннітолу, 4,5 мг/л БАП та 5,0 мг/л фосфінотрицину. При отриманні гібридів *B.juncea*+*A.thaliana* застосовували також середовище K₂I₀₂ (модифіковане B5 з додаванням 2,0 мг/л Кін, 0,2мг/л ІОК та 10,0 мг/л фосфінотрицину). Регенеранти переносили на безгормональне середовище B5 з 10,0 мг/л фосфінотрицину.

Гістохімічне виявлення експресії гена β-улюкуронідази. Виявлення активності GUS проводили шляхом гістохімічної реакції за методикою Jefferson et al. (1987).

Молекулярно-біологічний і біохімічний аналіз гібридних ліній. За допомогою ПЛР, RAPD та ПЛР-ПДРФ аналізували ділянки ядерної ДНК гібридів. Хлоропластну та мітохондріальну ДНК аналізували за допомогою ПЛР-ПДРФ. Присутність трансгенів у отриманих рослинах доводили за допомогою ПЛР. Для аналізів використовували тотальну ДНК, яку виділяли з рослинного матеріалу за методикою Cheung et al. (1993). Плазмідну ДНК, яку використовували як позитивний контроль, виділяли з використанням набору для виділення ДНК Qiagen tip 100 (Qiagen, ФРН), відповідно до наданого протоколу.

Аналіз множинних молекулярних форм амілази, аспартатамінотрансферази, естерази, малатдегідрогенази та пероксидази проводили за стандартними методиками (Биохимический анализ в клеточной биологии растений. – Киев. – 1988. – Препринт /АН УССР, Институт ботаники, 88.1).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Схеми селекції соматичних гібридів. Нами був запропонований підхід до створення модельної системи, за допомогою якої можна буде виявити транспозицію мобільних генетичних елементів з генома одного виду на геном іншого. Для цього необхідно створити гібридні рослини, в геномі яких відбувалася б втрата генетичного матеріалу одного з батьків. Віддалена гібридизація є перспективним підходом для створення таких рослин, адже саме у віддалених гібридах досить часто спостерігали спонтанну втрату хромосом одного з батьківських видів (Tabaeizadeh et al., 1985; Turpin et al., 1986; Sundberg E., Glimelius, 1991; Babiychuk et al., 1992; Ananiev et al., 1997; Yamagishi et al., 2003). Однак статева гібридизація часто неможлива навіть між видами – представниками різних родів однієї родини. Метод

соматичної гібридизації спрощує процедуру отримання віддалених гібридів, оскільки дозволяє поєднувати геноми видів, несумісних при статевих схрещуваннях (Глеба Ю.Ю., Сытник К.М., 1984; Waara S., Glimelius K., 1995).

Для дослідження процесів транспозиції нами був використаний мобільний генетичний елемент кукурудзи *Spm*. Перевага системи *En/Spm* над представниками інших класів ДНК-транспозонів полягає в тому, що вони здатні переміщуватися у незчеплені локуси (Greco et al., 2004). Це збільшує вірогідність перестрибування мобільного елемента на інший геном. В нашій роботі ми застосували не нативний, а модифікований генно-інженерними методами *Spm* елемент. Як відомо, нативний мобільний генетичний елемент може бути представленим у двох формах: автономній (*Spm*) та неавтономній (*dSpm*). Модифікації використаної в нашій роботі системи *Spm* елементів полягали в тому, що автономний елемент був позбавлений одного з термінальних повторів. Внаслідок цього він втрачав здатність до транспозиції, але зберігав функції джерела транспозази. Послідовність ДНК неавтономного елемента була обмежена до термінальних повторів, між якими виявилось можливим вбудовування рекомбінантного гена (*bar*). Зміни мобільного генетичного елемента були зроблені для спрощення в подальшому процедури аналізів.

Крім транспозонів і гена *bar*, послідовність ДНК, якою був трансформований *A.thaliana*, містила гени *nptII* та *gusA* (рис. 1). Неавтономний (*dSpm*) елемент, що містить ген стійкості до фосфінотрицину (*bar*), був потрібний для відбору інтеграції Т-ДНК та реінсерції транспозону. *dSpm* знаходився між 35S промотором з вірусу мозаїки цвітної капусти та АТГ кодоном гена β -глюкуронідази (*gusA*). Останній є ексцизійним маркером для оцінки активності елемента. Транспозиція відбувається завдяки активності *Spm*-транспозази, яка є фрагментом природного *Spm* елемента, клонованим під контролем 35S (pIC401) або *Spm* (pIC411) промотору.

Згідно зі схемами, наведеними на рис. 2 та 3, були отримані соматичні гібриди на основі видів *B.juncea*, *B.napus* або *O.violaceus*, які несли транспозон, маркований геном стійкості до фосфінотрицину (*bar*).

Продукти злиття відбирали шляхом селекції стійких до фосфінотрицину клонів, оскільки рослини трансгенного *A.thaliana* несуть ген стійкості до нього. На поживному середовищі, яке ми застосували для культивування продуктів злиття, протопласти *A.thaliana* не здатні до поділу, тоді як у *B.juncea*, *B.napus* або *O.violaceus* вони діляться з високою частотою. Культивування вихідних форм дикого типу *B.juncea*, *B.napus* або *O.violaceus* на середовищах, які містили 10 мг/л фосфінотрицину, вело до загибелі рослин. Тому існувала велика ймовірність того, що рослини, які регенерували на поживному середовищі з 10 мг/л фосфінотрицину, були гібридними.

Соматична гібридизація *B.juncea*+*A.thaliana*. При отриманні соматичних гібридів досить важливим етапом є процес злиття протопластів. Нами була взята за основу методика, розроблена Menzel et al. (1981). Ми модифікували цю методику для можливості її застосування при злитті

мезофільних протопластів ряду видів родини Brassicaceae. Зроблені нами модифікації стосувалися часу обробки розчином ПЕГ та буферним розчином з високим рН. Крім того, ми змінили пропорції при додаванні цих розчинів. Важливим моментом для покращення виживання клітин виявилося також використання для відмивання протопластів розчину W5 замість культурального середовища.

Основні етапи отримання гібридних рослин наведено у таблиці 1. Ефективність поділів становила близько 80% від загальної кількості висіяних протопластів.

Таблиця 1.

Умови культивування та морфогенезу соматичних гібридів *B.juncea*+*A.thaliana*

Дні культивування	Освітленість, Лк	Середовище	Етапи розвитку продуктів злиття
0	0	SW1	Синтез клітинної стінки, перші поділи
7	2500	SR	Формування мікроколоній
28	3000	FH	Утворення і проростання ембріодів, формування органогенного калюсу
60	3000	B5	Нормалізація морфології рослин, отриманих з ембріодів
60	3000	K ₂ I ₀₂	Регенерація пагонів з калюсів, які не розвинулись в ембріоди

Селекцію гібридних рослин проводили на фосфінотрицині. Ген *bar* досить широко застосовують для селекції при створенні трансгенних рослин, оскільки для багатьох видів він є не тільки зручним селективним маркером, а й господарсько-цінним геном стійкості до гербіциду біалафосу (синонім BASTA, діюча речовина – фосфінотрицин або глюфозинат амонію) (De Block et al., 1989). При отриманні рослин-регенерантів з продуктів злиття нами була використана ступінчаста схема селекції. Концентрацію селективного агента (фосфінотрицину) підвищували в два етапи від 5 до 10 мг/л. Концентрація 5 мг/л фосфінотрицину в середовищі для регенерації була достатньою для первинного етапу селекції. Підвищення концентрації селективного агенту до 10 мг/л дозволяло повністю позбутись регенерації можливих нетрансгенних рослин. У проведених нами експериментах ключовими факторами для отримання рослин-регенерантів в умовах селективного тиску фосфінотрицину виявилися використання МЕС та культивування регенерантів на розсіяному світлі на початку селекції.

Для того, щоб виключити можливість отримання рослин-хімер, які б містили суміш клітин батьківських видів, з ряду отриманих нами гібридів були виділені протопласти та регенеровані рослини. Отримані рослини виявилися стійкими до фосфінотрицину та канаміцину. Морфологічно вони були ідентичні до вихідних гібридних ліній. Як показав подальший аналіз, їх біохімічні та молекулярно-біологічні показники відповідали таким у батьківських гібридних ліній. Рослин з показниками, характерними тільки для арабідопсису або гірчиці, серед них ми не виявили, що дозволяє стверджувати, що отримані нами шляхом соматичної гібридизації рослини були дійсними гібридами, а не химерами. Обрана схема селекції виявилася ефективною, оскільки подальші аналізи показали, що всі досліджені рослини-регенеранти були гібридними.

Регенеранти, стійкі до фосфінотрицину, морфологічно відрізнялися від арабідопсису, що дозволяло розглядати їх як гібридні. Всі отримані рослини були морфологічно подібними до гірчиці. Цей результат виявився досить несподіваним, оскільки при гібридизації *A.thaliana* та *B.juncea* не застосовували методів фізичної або хімічної інактивації протопластів арабідопсису (γ -опромінення, обробка іодацетамідом, тощо), які, згідно з літературними даними, сприяють елімінації генетичного матеріалу обробленого виду (Dudits et al., 1980; Sidorov et al., 1981; Bates et al., 1987; Menczel et al., 1987; Vlahova et al., 1997).

Стійкі до фосфінотрицину гібриди були проаналізовані за допомогою гістохімічної реакції для виявлення активності β -глюкуронідази. Нами було проаналізовано 290 гібридних рослин, з яких 127 забарвлення не давали, тоді як решта 163 дали позитивну реакцію. Розмір і розташування зон ферментативної активності змінювалися від наявності лише у кількох клітинах досліджуваного експланту до цілком забарвлених у синій колір листків та коренів. Для більшості ліній характерним було фарбування у вигляді чітко окреслених синіх плям на тлі білого кольору, які вказували на зони ферментативної активності (рис. 4). Таким чином, ми вперше виявили можливість транспозиції мобільних генетичних елементів у міжтрибних гібридах родини Brassicaceae.

Наявність специфічного синього забарвлення опосередковано вказувала на присутність генетичного матеріалу арабідопсису в отриманих рослинах. Для подальшої роботи серед регенерованих фосфінотрицинстійких рослин відбирали ті, у яких була відсутня активність β -глюкуронідази. Ми сподівалися виявити серед них такі, у яких, внаслідок процесів ексцизії та реінсерції, інтеграція d*Spm* елемента разом з *bar* геном відбулася в локуси, не зчеплені з сайтом первинної інтеграції трансгена, та були еліміновані хромосоми *A.thaliana*, які несуть стабільно інтегровані трансгени (*SpmTPase*, *gusA* та *nptII*).

В результаті проведення ПЛР аналізу 32 гібридних клонів, у яких не була виявлена активність фермента β -глюкуронідази, було показано присутність *gusA* гена у всіх досліджених рослинах. У гібридних лініях були проаналізовані продукти ампліфікації тотальної

ДНК з використанням праймерів до генів *bar* (рис. 5), *SpmTPase* та *npt II*. Аналіз підтвердив наявність цих генів у гібридних лініях.

Присутність трансгенів у рослинах, які були морфологічно подібними до гірчиці, є додатковим доказом, що підтверджує їх гібридність. Тотальної втрати генетичного матеріалу *A.thaliana* не відбувалося, на що вказувало збереження трансгенів, не здатних до транспозиції.

Для остаточного підтвердження гібридного походження рослин ряд ліній було відібрано для подальших молекулярно-біологічних досліджень. Аналіз ядерного геному проводили за допомогою RAPD з застосуванням ОРА-праймерів, а також ПЛР-ПДРФ, використовуючи праймери до мікросателітної ДНК та внутрішньої спейсерної ділянки ITS між 26S і 18S генами рДНК. Ампліфікація ITS послідовностей та RAPD аналіз показали наявність ядерного матеріалу як *B.juncea*, так і *A.thaliana*. Продукти ампліфікації при використанні 5'-(TCC)×5-3' праймерів показали наявність у гібридних рослинах послідовностей ДНК характерних лише *B.juncea*. При ампліфікації за допомогою праймерів 5'-(GACA)×4-3' електрофоретичний спектр ПЛР продуктів лише двох з досліджуваних гібридних ліній цілком відповідав спектру *B.juncea*. Інші досліджені зразки мали меншу, ніж *B.juncea*, кількість фрагментів ампліфікованої ДНК, але більшу, ніж у *A.thaliana*.

Аналіз хлоропластного геному проводили за допомогою рестрикції фрагмента хлоропластної ДНК спейсерної ділянки між генами *atpB* – *rbcL*, отриманого в результаті ампліфікації. *Clal* гідроліз показав, що хлоропластний геном гібридів походить від *B.juncea*. Для визначення походження мітохондріальної ДНК гібридних рослин був проведений ПЛР-ПДРФ аналіз послідовності ДНК гена мітохондріальної НАД-дегідрогенази (*ndh4*). Гідроліз проводили з використанням рестриктних ендонуклеаз *HaeIII*, *HpaII*, *HindIII* та *MvaI*. Гідроліз за допомогою *HaeIII*, *HpaII* та *HindIII* не виявив різниці між батьківськими видами. *MvaI* гідроліз фрагмента гена *ndh4* показав, що у п'яти проаналізованих гібридних ліній рестриктний спектр співпадав з *A.thaliana*. Три лінії при гідролізі давали основні фрагменти, характерні для *B.juncea*, та додатковий – від *A.thaliana*.

За допомогою ізоферментного аналізу нами було проаналізовано 38 гібридних ліній. Досліджували ізозимні спектри амілази, аспартатамінотрансферази, естерази, пероксидази та малатдегідрогенази. Ізоферментний аналіз також підтвердив, що отримані нами рослини несли ядерний генетичний матеріал обох вихідних видів. Слід відмітити переважання ізоформ *B.juncea* (рис.6).

Соматична гібридизація за участю *Orychophragmus violaceus*. Під час наших експериментів було отримано гібридні рослини в двох комбінаціях: а) *O.violaceus*+*A.thaliana*, б) *O.violaceus*+гібрид (*B.juncea*+*A.thaliana*). Всі отримані рослини мають нормальну морфологію, здатні до укорінення.

Гібрид між *O.violaceus*+*A.thaliana* був високоасиметричним, оскільки з усіх проведених молекулярно-біологічних та біохімічних аналізів лише ізоферментний аналіз естерази показав присутність генетичного матеріалу *A.thaliana* (табл. 2, 3). Однак отриманий гібрид, на відміну від вихідного *O.violaceus*, був стійким до канаміцину і фосфінотрицину, як арабідопсис, і фарбувався при гістохімічному виявленні активності β -глюкуронідази. Останнє вказувало на активність транспозонів. ПЛР аналізи на виявлення генів *npt II*, *bar*, *gus* та *Spm*-транспозази підтвердили присутність цих генів (табл. 4).

Таблиця 2.

Біохімічна та молекулярно-біологічна характеристика ядерного геному соматичних гібридів *O.violaceus*+*A.thaliana* та *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*)

Рослина	Естераза	Амілаза	ITS
<i>O. violaceus</i>	Ov	Ov	Ov
<i>A. thaliana</i>	Ath	Ath	Ath
<i>B. juncea</i>	Bj	Bj	Bj
Oa1	Ov + Ath	Ov	Ov
j56	Ath + Bj	Ath + Bj	Ath + Bj
Oj56/1	Ov + Ath + Bj	Ov + Bj	Ov + Ath + Bj
Oj56/2	Ov + Ath + Bj	Ov + Bj	Ov + Ath + Bj
Oj56/3	Ov + Ath + Bj	Ov + Bj	Ov + Ath + Bj
Oj56/4	Ov + Ath + Bj	Ov + Bj	Ov + Ath + Bj

Примітки: Ov - *O.violaceus*; Ath - *A.thaliana*; Bj - *B.juncea*, Oa1 – гібрид *O.violaceus*+*A.thaliana*, j56 – гібрид *B.juncea*+*A.thaliana*, Oj56/1 - Oj56/4 – гібриди *O.violaceus*+*(B.juncea+A.thaliana)*

Таблиця 3.

Молекулярно-біологічна характеристика пластоми та мітохондріону соматичних гібридів *O.violaceus*+*A.thaliana* та *O.violaceus*+гібрид (*B.juncea*+*A.thaliana*)

Рослина	Пластиди	Мітохондрії

	<i>Cla</i> I гідроліз <i>atpB – rbcL</i>	Спейсер <i>atpH – atpI</i>	<i>Hae</i> III гідроліз <i>ndh4</i>	<i>Spy</i> I гідроліз <i>ndh4</i>	<i>Mva</i> I гідроліз <i>ndh4</i>
<i>O. violaceus</i>	Ov*	Ov	Ov	Ov	Ov*
<i>A. thaliana</i>	Ath	Ath	Ath**	Ath**	Ath
<i>B. juncea</i>	Bj*	Bj	Bj**	Bj**	Bj*
Oa1	Ov	Ov	Ov	Ov	Ov
j56	Bj	Bj	Bj або Ath	Bj або Ath	Ath
Oj56/1	не Ath	Bj	Ov	Ov	Ov
Oj56/2	не Ath	Bj	Ov	Ov	Ov
Oj56/3	не Ath	Bj	Ov	Ov	Ath
Oj56/4	не Ath	Bj	Ov	Ov	Ath

Примітки: Ov - *O. violaceus*; Ath - *A.thaliana*; Bj - *B.juncea*; Oa1 – гібрид *O.violaceus*+*A.thaliana*, j56 – гібрид *B.juncea*+*A.thaliana*, Oj56/1 - Oj56/4 – гібриди *O.violaceus*+*(B.juncea+A.thaliana)*; * спектри *O. violaceus* та *B. juncea* співпадають; ** спектри *A. thaliana* та *B. juncea* співпадають

У гібридній комбінації *O.violaceus*+*(B.juncea+A.thaliana)* було отримано унікальне поєднання гібридного за трьома батьківськими видами ядра, хлоропластів *B.juncea* та мітохондрій *O.violaceus* або *O.violaceus*+*A.thaliana* (див. табл. 2, 3). Більш того, *B.juncea* є природним алотетраплоїдом, який містить геноми *B.nigra* та *B.campestris* (U N., 1935), тому отримані нами гібридні рослини, фактично, є результатом поєднання чотирьох ядерних геномів. Гібриди несли гени *npt II*, *bar*, *gus* та *Spm*-транспозази (показано ПЛР) та були стійкими до канаміцину і фосфінотрицину, але не демонстрували активності β-глюкуронідази (див. табл. 4). Таким чином, нами показано, що при соматичній гібридизації таких видів, як *O.violaceus* та *A.thaliana*, а також в такій складній гібридній комбінації, як *O.violaceus*+*(B.juncea+A.thaliana)*, не відбувалося повної елімінації генетичного матеріалу *A.thaliana*. Цілковитої втрати хромосоми(-сом), де первинно були інтегровані трансгени, не спостерігали.

Таблиця 4.

Характеристика присутності трансгенів та їх експресії в гібридних рослинах *O.violaceus*+*A.thaliana* та *O.violaceus*+*(B.juncea+A.thaliana)*

Рослина	ПЛР аналіз присутності трансгенів				Експресія трансгенів		
	<i>bar</i>	<i>nptII</i>	<i>SpmTPase</i>	<i>gusA</i>	<i>bar</i>	<i>nptII</i>	<i>gusA</i>
<i>O. violaceus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. thaliana</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. juncea</i>	-	-	-	-	-	-	-
j56	+	+	+	+	+	+	+

Oa1	+	+	+	+	+	+	+
Oj56/1	+	+	+	+	+	+	-
Oj56/2	+	+	+	+	+	+	-
Oj56/3	+	+	+	+	+	+	-
Oj56/4	+	+	+	+	+	+	-

Примітки: Ov - *O.violaceus*; Ath - *A.thaliana*; Bj - *B.juncea*, Oa1 – гібрид *O.violaceus*+
A.thaliana, j56 – гібрид *B.juncea*+*A.thaliana*, Oj56/1 - Oj56/4 – гібриди *O.violaceus*+
(*B.juncea*+*A.thaliana*)

Соматична гібридизація *Brassica napus*+*A.thaliana*. В результаті дослідів по соматичній гібридизації було відібрано 382 калюси при злитті *B.napus* cv. Westar+*A.thaliana* та 78 калюсів – *B.napus* cv. Калинівський+*A.thaliana*, стійких до 5 мг/л фосфінотрицину. З них вдалося регенерувати 34 пагони у гібридів з сортом Westar та 8 пагонів з сортом Калинівський. Ефективність регенерації гібридів була 8,9 та 10,2%, відповідно. При культивуванні отриманих пагонів на безгормональному середовищі вони були здатні спонтанно укорінюватись. Форма листків отриманих рослин цілком була подібною до ріпаку.

На основі морфології та за допомогою біохімічних і молекулярно-біологічних методів аналізу нами була доведена присутність генетичного матеріалу обох батьківських видів та трансгенів в отриманих рослинах (табл. 5). Повної елімінації ядерного генетичного матеріалу *A.thaliana* не відбувалося протягом трьох років. Збереження генетичного матеріалу *A.thaliana* та трансгенів при тривалому розмноженні отриманих пагонів шляхом живцювання виключає їх химерне походження. Пластом гібридних рослин був успадкованим виключно від *B.napus*, а мітохондріон – від будь-якого з батьківських видів.

Гени *bar*, *npt II*, *Spm*-транспозази і *gusA* зберігалися в рослинах та відбувався активний процес транспозиції d*Spm* елемента з *bar* геном. Присутність генетичного матеріалу *A.thaliana* з сайтом первинної інтеграції ускладнює виявлення реінсерції мобільного елемента в геном ріпаку.

Таблиця 5.

Біохімічна та молекулярно-біологічна характеристика соматичних гібридів *B.napus*+*A.thaliana*

Рослин а		Ізоферментний аналіз	ПЛР аналіз	ПЛР-ПДРФ аналіз

		Естераза	Амілаза	<i>bar</i>	<i>nptII</i>	<i>SpmTPase</i>	<i>gusA</i>	ITS	Мікросателітна ДНК ¹	Мікросателітна ДНК ²
<i>B.napus</i>	-	Bn	Bn	-	-	-	-	Bn	Bn	Bn
<i>A.thaliana</i>	+	Ath	Ath	+	+	+	+	Ath	Ath	Ath
R2	+	Bn+Ath	Bn	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Ath
R3	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Bn
R4	+	Bn+Ath	Bn	+	+	+	+	Не визн.	Не визн.	Не визн.
K4	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Ath
K6	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Ath
K8	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Не визн.	Не визн.	Не визн.
W2	+/-	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	-	+	Bn+Ath	Bn	Bn

Примітки: "+", "-" - позитивна або негативна реакція; Ath - походить від *A.thaliana*; Bn - походить від *B.napus*; ¹ - праймери 5'-(TTC)5-3'; ² - праймери 5'-(TTTAGGG)3-3'.

Отже, в роботі запропоновано новий підхід до дослідження можливості міжгеномної транспозиції мобільних генетичних елементів. У міжтрибних соматичних гібридах родини Brassicaceae була виявлена активність гетерологічної системи мобільних генетичних елементів *Spm/dSpm* кукурудзи, перенесеної шляхом агробактеріальної трансформації в рослини одного з батьківських видів.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу соматичної гібридизації створена система для вивчення переносу транспозонів між геномами різних видів.

2. Вперше отримано такі міжтрибні соматичні гібриди: *Brassica juncea*+*Arabidopsis thaliana*, *Orychophragmus violaceus*+*A.thaliana* та *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*).

3. Виявлено можливість регенерації рослин при поєднанні у соматичному гібриді *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*) чотирьох геномів: *O.violaceus*, *A.thaliana* та *B.nigra* з *B.campestris*, які складають геном *B.juncea*.

4. Показано активність гетерологічної системи мобільних генетичних елементів кукурудзи *Spm/dSpm* у міжтрибних соматичних гібридах *B.juncea*+*A.thaliana*, *B.napus*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+*A.thaliana*.

5. Експериментально доведено, що при міжтрибній соматичній гібридизації селективний ген (*bar*), який транспозується за рахунок *Spm*-транспозази виду-донора, зберігається у гібридах, які подібні за фенотипом до виду-реципієнта.

6. Ядерний матеріал *A.thaliana* в усіх отриманих соматичних гібридів зберігався протягом 3 років, що доведено шляхом дослідження ізоферментних спектрів та ПЛР-аналізів присутності послідовностей ДНК ряду ядерних маркерів і селективних генів.

7. Показано, що у проаналізованих соматичних гібридів (*B.juncea*+*A.thaliana*, *B.napus*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*)) зберігався пластом лише одного з батьків, тоді як успадкування мітохондріону відбувалося випадковим чином.

СПИСОК РОБІТ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.Н., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Отримання міжтрибних соматичних гібридів *Brassica juncea*+*Arabidopsis thaliana* та дослідження поведінки трансгенних ознак // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 3 – 8.

2. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.Н., Рудас В.А., Кучук М.В. Отримання міжтрибних соматичних гібридів дигеномного (*Orychophragmus violaceus*+*Arabidopsis thaliana*) та тетрагеномного (*Orychophragmus violaceus* +*Brassica juncea*+*Arabidopsis thaliana*) походження та їх використання для вивчення поведінки гетерологічної системи транспозонів *Spm/dSpm* // Біополімери та клітина. – 2005. – Т. 21, № 1. – С. 35 – 41.

3. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.Н., Кучук М.В. Отримання соматичних гібридів *Brassica napus*+*Arabidopsis thaliana* та їх використання для дослідження активності гетерологічної системи транспозонів *Spm/dSpm* // Фактори експериментальної еволюції. Збірник наукових праць. – Т. 2. – С. 166 – 171. / За ред. М.В. Поїка. – К.: КВІЦ, 2004. – 416 с.

4. Ovcharenko O.O., Komarnitski I.K., Kuchuk M.V. Production of intertribal somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cultivated species *Brassica juncea*. // Abstracts of international symposium “Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources”, Ukraine, Yalta, 26–31 May 2002. – P. 74.

5. Овчаренко О.А., Комарницький И.К., Череп Н.Н., Рудас В.А., Кучук Н.В. Получение межтрибных соматических гибридов дигеномного (*Orychophragmus violaceus*+*Arabidopsis thaliana*) и тетрагеномного (*Orychophragmus violaceus*+*Brassica juncea*+*Arabidopsis thaliana*) происхождения и их использование для изучения поведения гетерологической системы транспозонов *Spm/dSpm*. // Молекулярная генетика, геномика и биотехнология. Международная научная конференция, Минск, 24-26 ноября 2004 г.: Материалы конференции. – С. 171 – 172. / Ред. кол. Н.А. Картель и др. – Минск, 2004 г. – 356 с.

6. Овчаренко О.А. Анализ пластома и митохондрия соматических гибридов *Brassica napus*+*Arabidopsis thaliana* // Актуальні проблеми фізіології, генетики та біотехнології рослин і ґрунтових мікроорганізмів. Тези доповідей IX конференції молодих дослідників, присвяченої 100-річчю від дня народження академіка АН УРСР і ВАСГНІЛ П.А. Власюка. Київ, 24 – 25 лютого 2005. – С. 69.

АНОТАЦІЯ

Овчаренко О. О. Отримання міжтрибних соматичних гібридів родини Brassicaceae, що містять активну гетерологічну систему транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm*. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. - Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2005.

У дисертаційній роботі запропоновано новий підхід для створення системи, придатної для дослідження міжгеномної транспозиції мобільних генетичних елементів рослин з використанням транспозону кукурудзи *Spm/dSpm*. Підхід полягає у створенні міжтрибних соматичних гібридів між модельним об'єктом для генетичних досліджень з сиквенованим геномом *Arabidopsis thaliana* L., що містить гетерологічну систему транспозонів *Spm/dSpm*, та рядом культурних (*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss., *B.napus* L.) і дикорослих (*Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Schulz.) видів представників родини Brassicaceae, з подальшим вивченням активності *Spm/dSpm*. В ході роботи методом соматичної гібридизації були отримані міжтрибні гібриди у таких комбінаціях: *B.napus* + *A.thaliana*, *B.juncea* + *A.thaliana*, *O.violaceus* + *A.thaliana*, *O.violaceus* + (*B.juncea* + *A.thaliana*). З них три останні комбінації отримані вперше. У соматичних гібридах *O.violaceus*+ (*B.juncea*+*A.thaliana*) виявлено можливість регенерації рослин при поєднанні чотирьох геномів: *O.violaceus*, *A.thaliana* та *B.nigra* і *B.campestris*, які складають геном *B.juncea*. Гібридне походження отриманих рослин було підтверджено за допомогою морфологічного аналізу, ПЛР-ПДРФ, RAPD та аналізу множинних молекулярних форм ферментів. У гібридах не відбувалося повної елімінації генетичного матеріалу арабідопсису, а трансгени стабільно підтримувалися. Було доведено, що при міжтрибній соматичній гібридизації селективний ген (*bar*), який транспозується за рахунок *Spm*-транспозази виду-донора, зберігався у гібридах, подібних за фенотипом до виду-реципієнта. Показано, що в усіх проаналізованих гібридних комбінаціях зберігався пластом лише одного з батьків, тоді як успадкування митохондріону відбувалося випадковим чином. Вперше показано активність гетерологічної системи мобільних генетичних елементів кукурудзи *Spm/dSpm* у міжтрибних соматичних гібридах *B.juncea*+*A.thaliana*, *B.napus*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+*A.thaliana*.

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

АННОТАЦИЯ

Овчаренко О. А. Получение межтрибных соматических гибридов семейства Brassicaceae, содержащих активную гетерологическую систему транспозонов кукурузы *Spm/dSpm*. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. - Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2005.

В диссертационной работе предложен новый подход к созданию системы, пригодной для исследования межгеномной транспозиции мобильных генетических элементов растений с использованием транспозона кукурузы *Spm/dSpm*. Суть подхода состоит в создании межтрибных соматических гибридов между *Arabidopsis thaliana* L. – модельным объектом генетических исследований, чей геном сиквенирован на сегодняшний день, и рядом культурных (*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss., *B.napus* L.) и дикорастущих (*Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Schulz.) видов семейства Brassicaceae. Использование *Arabidopsis thaliana*, трансформированного вектором, содержащим гетерологическую систему транспозонов *Spm/dSpm*, а также гены *npt II*, *bar*, *gusA* даст возможность исследовать активность мобильных генетических элементов в таких гибридах. При отдаленной соматической гибридизации возможна транспозиция мобильного генетического элемента с одного генома на другой и последующая утрата хромосом вида-донора с сайтом первичной интеграции транспозона, содержащего источник транспозазы. Перемещение мобильного элемента можно проследить по сохранению в геноме реципиента трансгена (*bar*), окруженного последовательностями транспозона, и отсутствию других трансгенов (*npt II*, *gusA*, *SpmTPase*), элиминируемых вместе с геномом вида-донора.

В ходе нашей работы с помощью метода соматической гибридизации были получены межтрибные гибриды в следующих видовых комбинациях: *B.napus*+*A.thaliana*, *B.juncea*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*). Три последние гибридные комбинации получены впервые. На примере соматических гибридов *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*) нами была обнаружена возможность регенерации растений при объединении четырех геномов: *O.violaceus*, *A.thaliana* и *B.nigra* с *B.campestris*, составляющих геном *B.juncea*. Гибридное происхождение полученных растений было доказано с помощью морфологического, ПЦР-ПДРФ, RAPD и изоферментного анализов. Хотя при создании гибридов нами не были использованы специальные методы способствующие элиминации генетического материала *A.thaliana*, полученные растения *B.napus*+*A.thaliana*, *B.juncea*+*A.thaliana* и *O.violaceus*+*A.thaliana* были морфологически подобны *B.napus*, *B.juncea* и *O.violaceus*, соответственно. Гибриды *O.violaceus*+(*B.juncea*+*A.thaliana*) имели промежуточные морфологические признаки *B.juncea* и

O.violaceus. Молекулярно-биологический и изоферментный анализы показали, что, несмотря на схожесть с видом-реципиентом, у гибридов не происходило полной элиминации генетического материала арабидопсиса. Для исключения возможной химерности растений было проведено длительное расхимирование путем культуры протопластов, либо черенкования, которое показало, что полученные растения были истинными гибридами.

Для более полной характеристики полученных гибридов был проведен анализ ДНК органелл. Показано, что во всех проанализированных гибридных комбинациях сохранялся пластом только одного из родителей: пластом *A.thaliana* не был унаследован ни одним из гибридов. Наследование митохондрия происходило случайным образом, как от одного, так и от другого родительского вида.

Нами было показано, что при межтрибной соматической гибридизации селективный ген (*bar*), транспозирующийся за счет транспозазы вида-донора, сохранялся в гибридах, фенотипически схожих с видом-реципиентом. Хотя селекцию гибридных растений проводили только с использованием фосфинотрицина, все полученные растения были устойчивыми как к фосфинотрицину, так и к канамицин-сульфату благодаря перенесенным от *A.thaliana* трансгенам. Активность β -глюкуронидазы, являющаяся маркером активности мобильного генетического элемента была обнаружена в гибридах *B.napus+A.thaliana*, *B.juncea+A.thaliana* и *O.violaceus+A.thaliana* и отсутствовала в растениях *O.violaceus+(B.juncea+A.thaliana)*. Однако, ПЦР анализ показал сохранение всех трансгенов и в этих гибридах.

С помощью гистохимического определения активности *gusA* гена нами впервые была показана активность гетерологической системы мобильных генетических элементов кукурузы *Spm/dSpm* в межтрибных соматических гибридах *B.juncea+A.thaliana*, *B.napus+A.thaliana*, *O.violaceus+A.thaliana*.

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

SUMMARY

Ovcharenko O.O. Production of intertribal somatic hybrids with active heterologous maize transposable element *Spm/dSpm* within the Brassicaceae family. – Manuscript.

Thesis for PhD degree (Biology) by speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Science, Kyiv, 2005.

The thesis is devoted to production of a system for investigation of intergenomic transposition using maize transposable element *Spm/dSpm*. Approach is based on production of intertribal somatic hybrids between a model object of genetic studies *Arabidopsis thaliana* L., transformed with heterologous maize

transposable element *Spm/dSpm* and some cultivated (*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss., *B.napus* L.) or wild species (*Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Schulz.) from Brassicaceae, for further investigation of *Spm/dSpm* activity. We have produced such combinations of intertribal somatic hybrids: *B.napus* + *A.thaliana*, *B.juncea* + *A.thaliana*, *O.violaceus* + *A.thaliana*, *O.violaceus* + (*B.juncea* + *A.thaliana*). The last three of them were produced for the first time. In somatic hybrids *O.violaceus*+ (*B.juncea*+*A.thaliana*) we found opportunity to regenerate plants when four genomes are combined: *O.violaceus*, *A.thaliana* and *B.nigra* with *B.campestris*, which form genome of *B.juncea*. Hybrid nature of obtained plants was confirmed by morphology, PCR-RFLP, RAPD and analysis of isozymes. There was no complete elimination of *A. thaliana* genetic material in hybrids and transgenes were stably maintained. It was demonstrated that selective gene (*bar*), transposed by *Spm*-transposase of donor species have been maintained in hybrids similar phenotypic to recipient species. In all analyzed hybrid combinations plastome was inherited only from one of the parents while origin of mitochondrion was casual. Activity of heterologous maize transposable element *Spm/dSpm* in intertribal somatic hybrids *B.juncea*+*A.thaliana*, *B.napus*+*A.thaliana*, *O.violaceus*+*A.thaliana* have been shown for the first time.

Key words: intertribal somatic hybridization, Brassicaceae, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, *B.napus*, *Orychophragmus violaceus*, heterologous maize transposable element *Spm/dSpm*.

Автор висловлює глибоку вдячність своєму керівнику д.б.н. Кучуку М.В. за підтримку і увагу, проявлені при виконанні дисертаційної роботи. Висловлюю щирю подяку к.б.н. Комарницькому І.К. та Черепу М.Н. за допомогу у проведенні аналізів. Висловлюю величезну вдячність всім співробітникам відділу генетичної інженерії ІКБГІ НАНУ за розуміння, підтримку та цінні поради при обговоренні результатів роботи та її написанні. Особливу вдячність висловлюю своєму чоловіку і колезі к.б.н. Рудасу В.А.