

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

На правах рукопису
УДК 575.222.75+573.6+582.63.2

Нітовська Ірина Олександрівна

**ГЕНЕТИЧНА РЕКОНСТРУКЦІЯ ЯДРА ТА ЦИТОПЛАЗМИ
BRASSICA OLERACEA L. ЗА ДОПОМОГОЮ ЗЛИТТЯ ПРОТОПЛАСТІВ.**

03.00.25 - "клітинна біологія"

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ 1997

Роботу виконано у відділі клітинної селекції Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Науковий керівник - член-кореспондент НАН України та
УААН, доктор біологічних наук
В.А. Сидоров

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук
В.О. Левенко

кандидат біологічних наук
С.І. Копнова

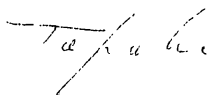
Провідна організація - Інститут молекулярної біології та
генетики НАН України, Київ

Захист відбудеться 28 серпня 1997 р. о ____ год.
на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.01.19.01 Інституту
клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за
адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

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

Автореферат розіслано 28 січня 1997 р.

Виконуючий обов'язки вченого секретаря
спеціалізованої ради,
доктор біологічних наук

 Л.Ф.Горовий

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Впровадження в сільське господарство нетрадиційних технологій, які дозволили б підняти на новий рівень виробництво необхідних для людини продуктів харчування, є нагальною проблемою. Селекційний процес - це використання існуючої генетичної мінливості у культурних видів рослин з метою покращення їх характеристик. В результаті зменшення генетичної різноманітності, стає малоефективним подальше якісне покращення сортів рослин методами традиційної селекції. Використання біотехнологічних методів, таких як соматична гібридизація, генетична трансформація, могло б привести до збагачення генофонду культурних рослин і, як наслідок, значного розширення можливостей традиційної селекції.

Соматична гібридизація дозволяє долати бар'єри статевої не-сумісності при міжвидових схрещуваннях та залучати до селекційного процесу філогенетично віддалені види. Як правило, для покращення існуючих сортів, важливим є перенесення від одного виду до іншого тільки небагатьох корисних для селекційного процесу генів (ознак). Тому, найбільш привабливим є отримання асиметричних гібридів, які мають тільки частину генів іншого виду.

За допомогою соматичної гібридизації, на відміну від статевої, можливе поєднання не тільки ядерних, але й цитоплазматичних геномів. Відомо, що геном органел може кодувати ряд важливих в практичному відношенні ознак, таких як стійкість до патотоксинів та гербіцидів, температурна толерантність, чоловіча стерильність та ін. (Medgyesy, 1990). Також встановлено, що цитоплазматичний геном впливає на широкий спектр морфологічних ознак рослини

(Давиденко, 1989, Medgyesy, 1990, Зиноватная и др., 1996), в тому числі на господарсько цінні. Отже, розширення плазмofонду культурних рослин може мати значення для практичної селекції. Створення цитоплазматичних гібридів (цибридів), які поєднують геном культурного виду та цитоплазму інших видів, дозволяє не тільки перенести плазмогени інших видів, але і зберігти в таких рослинах пов'язані з ядерним геномом сортоспецифічні ознаки культурного виду.

Капуста білокачанна (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) є однією із головних овочевих культур в Україні. Сорти ранньостиглої капусти білокачанної, які використовували в дослідженнях, мають високу продуктивність, але характеризуються слабкою холодостійкістю та схильністю до різних захворювань (кила капусти, судинний бактеріоз, фузаріоз). Розробка нових нетрадиційних технологій капусти дозволить, розширюючи генофонд *B.oleracea* L., отримати принципово новий рослинний матеріал, який можна буде використати при створенні сортів капусти з високою продуктивністю та стійкістю до несприятливих факторів навколишнього середовища.

Мета та завдання роботи. Метою роботи було отримати асиметричні соматичні гібриди і цибриди між капустою та спорідненими і віддаленими видами родини *Brassicaceae* та дослідити їх генетичну конституцію.

Згідно з поставленою метою, в завдання дослідження входило:

1. Підібрати умови виділення, культивування протопластів та регенерації з них рослин *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.
2. Отримати пластомні хлорофілдефектні мутанти капусти для подальшого використання в експериментах по соматичній гібридизації.
3. Створити асиметричні соматичні гібриди та цибриди капусти

з різними представниками родини *Brassicaceae*.

4. Провести аналіз ядерного та цитоплазматичного геномів отриманих гібридів.

Наукова новизна. Вперше отримано хлорофілдефектні мутанти капусти.

Вперше для селекції соматичних гібридів в родині *Brassicaceae* застосовано ефективну клітинну технологію, яка базується на використанні хлорофілдефектних мутантів; використання цієї технології дозволило спрямовано отримувати гібридні рослини капусти з пластомом *Brassica napus* L., *Arabidopsis thaliana* L., *Capsella bursa-pastoris* L.

Запропоновано систему селекції соматичних гібридів між видами родини *Brassicaceae*, яка не потребує присутності селективних генетичних маркерів у вихідному рослинному матеріалі та базується на подвійній інактивації протопластів донора перед злиттям.

Вперше отримано міжвидові соматичні гібриди *Brassica oleracea* L. + *Arabidopsis thaliana* та *Brassica oleracea* L. + *Capsella bursa-pastoris* L., а також цибриди, що містять ядерний геном *B. oleracea* та хлоропласти *A. thaliana*.

За допомогою рестриктивного аналізу мітохондріальної ДНК показано, що всі отримані гібриди мали перебудований мітохондріальний геном. Зміни хондріому всіх гібридів *B. oleracea* + *A. thaliana* мали однаковий характер.

Практична цінність роботи. Запропонована схема селекції соматичних гібридів з використанням хлорофілдефектних мутантів дозволяє отримувати гібриди капусти з цитоплазматичними генами інших видів, що робить можливим залучення до селекційного процесу плазмодів споріднених і віддалених видів родини *Brassicaceae*. Розроблені підходи отримання гібридів за допомогою злиття прото-

пластів дозволяють значно збагачувати генофонд капусти білокачанної та створювати унікальний в генетичному відношенні рослинний матеріал.

Одержані асиметричні соматичні гібриди капусти з *Brassica napus* L., *Arabidopsis thaliana* L. та *Capsella bursa-pastoris* L. можуть бути використані в клітинній технології для отримання нових форм рослин. Фертильні гібриди *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. + *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC. можуть бути безпосередньо використані в селекційно-генетичних дослідженнях по капусті та ріпаку.

Гібридні рослини передані в Інститут овочівництва та баштанництва УААН і Український державний аграрний університет для вивчення можливості їх включення у селекційно-генетичні дослідження.

На захист виносяться положення.

1. Запропоновано клітинні технології в родині *Brassicaceae* для отримання унікального рослинного матеріалу, що може бути корисним в селекції капусти.

2. Експериментально доказано, що використання розроблених технологій дозволяє поєднувати генетичний матеріал споріднених і віддалених видів рослин родини *Brassicaceae* та отримувати гібридні рослини з реконструйованими ядерним і цитоплазматичним геномами.

3. Створено асиметричні соматичні гібриди капусти: *Brassica oleracea* L. + *Brassica napus* L., *Brassica oleracea* L. + *Arabidopsis thaliana* L., *Brassica oleracea* L. + *Capsella bursa-pastoris* L.

Апробація роботи. Матеріали дисертаційної роботи доповідались та обговорювались на 7-й Міжнародній школі по вивченню онтогенезу рослин природних та культурних флор у ботанічних закладах Європи (Львів, 1994), Міжнародному симпозіумі по біотехнології

та генетичній інженерії рослин (Київ, 1994), III Російському сим-
позіумі "Новые методы биотехнологии растений" (Пушино, 1995),
8-й Міжнародній конференції по вивченню онтогенезу рослин при-
родних та культурних флор у ботанічних закладах Євразії (Ки-
їв, 1995), Міжнародній конференції Plant Genome IV (San Diego,
1996), 10 Міжнародному конгресі Федерації Європейських Товариств
Фізіологів Рослин (Florence, 1996), а також на наукових семінарах
відділів клітинної селекції та цитофізіології і клітинної інжене-
рії Інституту клітинної біології і генетичної інженерії НАН Укра-
їни.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 робіт,
список яких наведено в кінці автореферату.

Структура та обсяг роботи. Дисертація складається із вступу,
огляду літератури, матеріалів та методів, результатів досліджень
та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку цитованої
літератури, який містить 255 бібліографічних посилань. Робота
викладена на 181 сторінках машинопису, включає 5 таблиць, 44 ма-
люнка.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідях використовували види родини *Brassicaceae*.

1. Капуста білокачанна, *Brassica oleracea* L. var. *capitata*
L. ($2n=18$), ранньостиглі культурні сорти Димерська, Зорінка та
сорт німецької селекції Dithmarscher Fruher (Каталог мировой кол-
лекции, вып. 221, 1978). Насіння отримане на Сквирській се-
лекційній станції Інституту овочівництва та баштанництва УААН.

2. Пластомний хлорофілдефектний мутант *Brassica oleracea* L.
var. *capitata* L., отриманий на основі сорту Dithmarscher Fruher.

3. Пінак, *Brassica napus* L. var. *oleifera* DC. ($2n=38$), сорти Клітинний 1 та Forte. Насіння люб'язно надане академіком УААН В.Ф. Пересипкіним (Український державний аграрний університет).

4. Дикий вид арабідопсис, *Arabidopsis thaliana* L. cv. Columbia ($2n=10$).

5. Дикий вид гришкики, *Capsella bursa-pastoris* L. ($2n=16$).

Рослини вирощували в асептичних умовах на модифікованому безгормональному середовищі MS (Murashige and Skoog, 1962) при 16-годинному світловому фотоперіоді, освітленні 3000-4000 лк та температурі 23-25°C. Розмножували живцюванням.

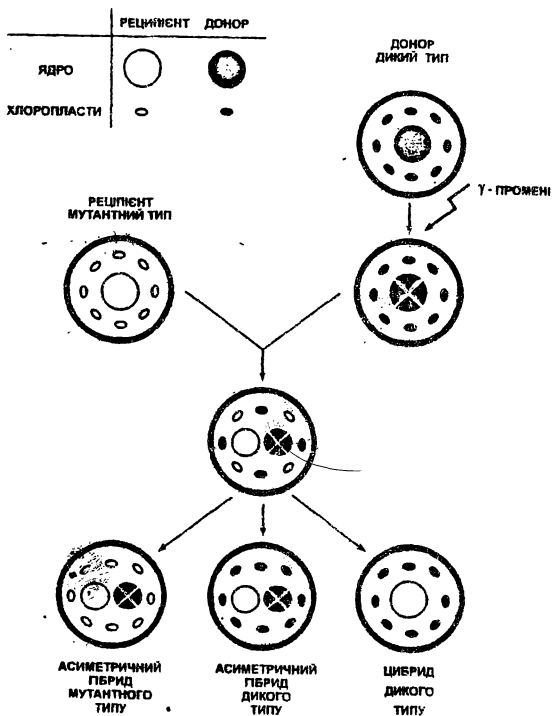
В дослідях по мутагенезу використовували насіння трьох сортів капусти, яке обробляли водним розчином N-нітrogeno-N-метилсечовини (НМС) протягом 18 годин. Строкаті форми рослин розхимерювали живцюванням або через культуру протопластів.

Мезофільні протопласти виділяли за вдосконаленою методикою (Сидоров и др., 1985). Перед злиттям протопласти донора (*B.napus*, *A.thaliana*, чи *C.bursa-pastoris*) γ -опромінювали дозою 1000 Гр (Co^{60} , 83 Гр/хв).

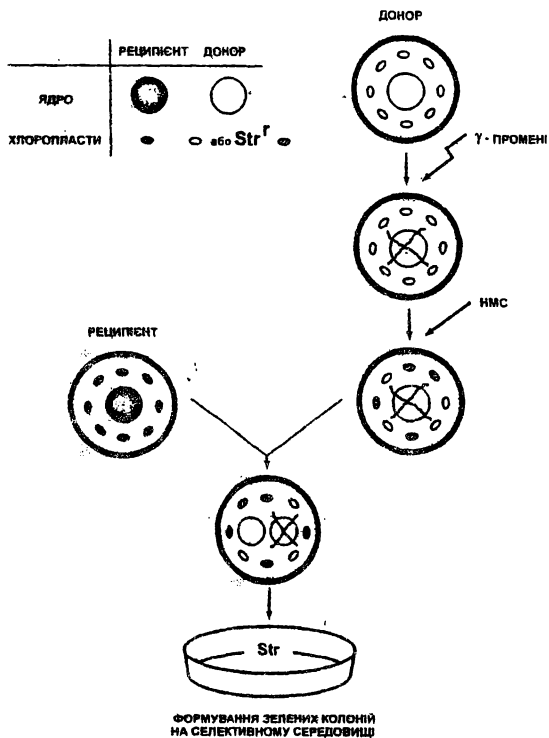
Злиття протопластів проводили за методикою Менцеля (Menczel et al., 1981), модифікованою стосовно умов експерименту.

Протопласти культивували у рідкому поживному середовищі SW (Sidorov et al., 1987) з використанням методу імобілізації клітин у алгінат кальцію. Для регенерації рослин із клітинних колоній використовували тверде поживне середовище MS зі зниженим рівнем цукрози (1%), яке містило 0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК.

Селекцію гібридних колоній проводили за двома схемами (мал. 1, 2). Згідно з першою схемою, як реципієнт чужинних генів використовували мезофільні протопласти отриманих пластомних хлорофіл-дефектних мутантів капусти (мал. 1). Селекція гібридних колоній



МАЛ. 1. СХЕМА СЕЛЕКЦІЇ АСИМЕТРИЧНИХ ГІБРИДІВ ТА ЦИБРИДІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ПЛАСТОМНИХ ХЛОРОФІЛДЕФЕКТНИХ МУТАНТІВ РОСЛИН.



МАЛ. 2. СХЕМА СЕЛЕКЦІЇ ЦИБРИДІВ ПРИ ВИКОРИСТАННІ ПОДВІЙНОЇ ІНАКТИВАЦІЇ ПРОТОПЛАСТІВ ДОНОРА.

базувалась на відновленні у них фотосинтетичної здатності, за рахунок перенесення хлоропластів донора.

Згідно з другою схемою (мал. 2), використовували подвійну інактивацію протопластів донора Sidorov et al. (1994). Як реципієнт було взято вихідні зелені рослини капусти сорту Dithmarscher Früher. Для підвищення частоти пластомних мутацій, протопласти донора після γ -опромінення обробляли летальними дозами мутагену НМС (5мМ водний розчин, 1 година). Селекцію гібридних протоклонів проводили за здатністю зеленіти та/чи рости на регенераційному середовищі, що містило 1 г/л стрептоміцинсульфату.

Рослини-регенеранти укорінювали на безгормональному середовищі MS, висаджували у ґрунт.

Цитогенетичний та біохімічний аналізи гібридних рослин проводили за загально прийнятими методиками (Биохимический анализ в клеточной биологии растений - Киев. - 1988. - Препринт/АН УССР, Институт ботаники; 88:1).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

1. Культивування протопластів *Brassica oleracea* var. *capitata*.

Для успішного проведення експериментів по соматичній гібридації, необхідною умовою є наявність ефективної методики культивування протопластів та регенерації рослин із протоклонів.

У представників роду *Brassica* регенерація рослин із протопластів залежить від генотипу та умов культивування (Bidney et al. 1983, Glimelius 1984, Barsby et al. 1986, Choung et al. 1987b, Pelletier 1990). Таким чином, першочерговим завданням було

розробити умови культивування протопластів для конкретних сортів капусти білокачанної.

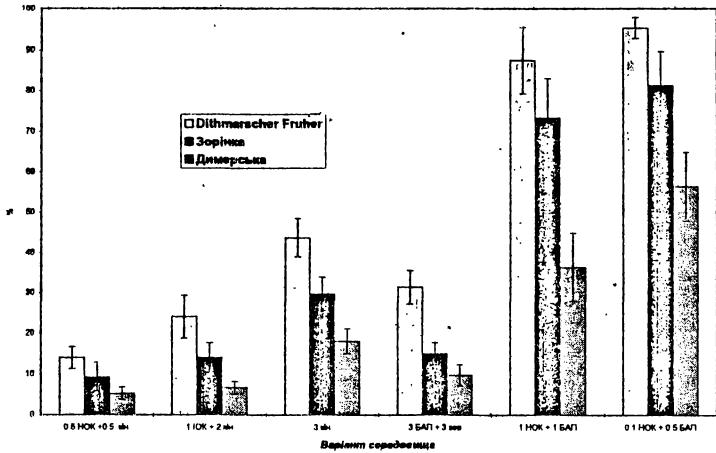
Для виділення протопластів використовували листя 3-4-тижневих рослин. Використання рідкого середовища SW, що містило 2 мг/л НОК, 0,5 мг/л БАП та 0,2 мг/л 2,4-Д виявилось найбільш оптимальним для поділу протопластів та утворення клітинних колоній.

Застосування фіксації протопластів в алгіатну плівку підвищувало ефективність їх висіву приблизно у три рази порівняно з культивуванням протопластів безпосередньо у рідкому поживному середовищі. Ефективність висіву протопластів капусти була найбільш високою для сорту Dithmarscher Früher (35-40%), 25-30% для сорту Димерська та близько 10% для сорту Зорінка.

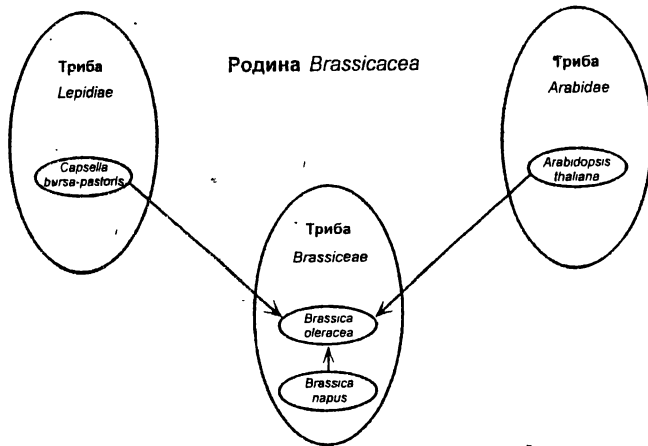
Приблизно через 30 днів після початку культивування, колонії, які до цього часу досягали близько 0,5-1,5 мм у діаметрі, звільняли від алгіатної плівки та переносили на тверді поживні середовища з різними вмістом та концентрацією фітогормонів для індукції органогенезу. Серед близько 50 середовищ, що використовували, регенерацію рослин спостерігали на 6 (мал. 3). Найбільша частота регенерації для всіх сортів капусти була на середовищі МЗ, що вміщувало 0,5 мг/л БАП та 0,1 мг/л НОК. На цьому середовищі калус не втрачав регенераційної здатності протягом року і довше.

Рослини-регенеранти мали морфологію та набір хромосом, характерні для вихідних рослин капусти.

Таким чином, розроблена ефективна методика культивування протопластів, яка дозволила отримувати нормальні рослини капусти.



Мал.3. Частота регенерації рослин капусти із протоклонів на середовищі MS із різними концентраціями фітогормонів (мг/л)



МАЛ.4. ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ЗВ'ЯЗКИ МІЖ ВИДАМИ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУВАЛИСЬ В ДОСЛІДЖЕННІ. СТІЛКИ ВКАЗУЮТЬ НА НАПРЯМОК, В ЯКОМУ БУЛО ЗДІЙСНЕНО ПЕРЕНЕСЕННЯ ЧАСТИНИ ГЕНЕТИЧНОЇ ІНФОРМАЦІЇ.

2. Отримання хлорофілдефектних мутантів капусти та їх характеристика.

Використання пластомних хлорофілдефектних мутантів як реципієнтів в експериментах по злиттю протопластів полегшує селекцію гібридів, які мають хлоропласти донора.

Для отримання пластомних хлорофілдефектних мутантів капусти проводили експерименти по мутагенезу насіння. НМС є ефективним індуктором пластомних мутацій (Hagemann et al., 1982). Обробка насіння 5ММ розчином НМС практично не впливала на його схожість і життєздатність та індукувала появу мутантних рослин з досить високою частотою (18% для сорту Dithmarscher Fruher та 12% для сорту Димерська).

Рослини, які мали переважно мутантне листя з чіткими зонами хлорофілдефектності, розхимерювали живцюванням або через культуру протопластів. Було отримано 4 гомопластидні хлорофілдефектні лінії капусти сорту Dithmarscher Fruher. Цитогенетичний аналіз показав, що мутантні рослини мали 18 хромосом, що відповідає диплоїдному набору хромосом капусти.

Проведення генетичного аналізу мутантів було неможливим через їх нежиттєздатність. Характер дії мутагену (Hagemann, 1982, Hostiska and Hanson, 1984, Fluhr et al., 1985, Сидоров и др., 1990), що використовували, а також поява в першому мутантному поколінні строкатих рослин (фенотип, характерний для пластидних мутацій) вказують на пластомну локалізацію мутації хлорофілдефектності. Крім того, в експериментах по соматичній гібридизації між *B. oleracea* та *A. thaliana* були регенеровані із зеленого калусу строкаті рослини, які в результаті живцювання дали початок білим

та зеленим рослинам. Рестрикційний аналіз хлДНК з використанням рестриктази *Bal* HI показав, що білі рослини мали хлоропласти капусти, а зелені - арабідопсиса. Це також свідчить про пластомну локалізацію мутації хлорофілдефектності та сегрегацію хлоропластів двох видів після злиття протопластів (Medgyesy, 1990).

Таким чином, використовуючи обробку насіння мутагеном; було вперше отримано та охарактеризовано хлорофілдефектні мутанти капусти.

3. Отримання соматичних гібридів з використанням хлорофілдефектних мутантів капусти.

Хлорофілдефектні мутанти були вперше застосовані нами для селекції соматичних гібридів між видами родини *Brassicaceae*.

Використовуючи хлорофілдефектні мутанти капусти, було отримано соматичні асиметричні гібриди в трьох комбінаціях видів, що відрізняються рівнем філогенетичної віддаленості: *Brassica oleracea* L. + *B. napus* L., *B. oleracea* L. + *Arabidopsis thaliana* L., *B. oleracea* L. + *Capsella bursa-pastoris* L. (мал. 4). Вибір видів-донорів зумовлювався в першу чергу їх стійкістю до захворювань та несприятливих факторів навколишнього середовища. По-друге, ми вважали важливим оцінити ефективність використання хлорофілдефектних мутантів капусти для перенесення генетичного матеріалу від споріднених і віддалених видів шляхом злиття протопластів та отримання надалі гібридних рослин капусти.

З метою інактивації та перенесення лише частини ядерного геному, протопласти донора опромінювали γ -променями. Гібридні колонії з ядром капусти та пластомом донорних видів (*B.napus*, *A.thaliana*, *C.bursa-pastoris*) відбирали за здатністю зеленіти в

умовах освітлення.

Ефективність висіву протопластів після злиття складала 25-40%. Частота утворення зелених колоній була 2-8 %. Проте, в кожному експерименті кількість зелених колоній зменшувалась при подальшому культивуванні протягом місяця. Це може бути пов'язано із загибеллю зелених колоній через незбалансованість геному гібридних клітин або з впливом опромінення на хлоропластний геном донора, що узгоджується з попередніми результатами (Menczel et al., 1987, Bonnema et al., 1992, Bauer-Weston et al., 1993, Skarzhinskaya et al., 1997). Зменшення кількості фотосинтезуючих колоній протягом культивування *in vitro* можна пояснити спрямованою сегрегацією пластид на користь хлорофілдефектних хлоропластів *B. oleracea*. Спрямовану сегрегацію хлоропластів після злиття протопластів часто спостерігали в гібридах *Brassicaceae* (Morgan and Maliga, 1987, Landgren and Glimelius, 1990, Sundberg and Glimelius, 1991a, Walters and Earle, 1993, Fahleson et al., 1994a, Bauer-Weston et al., 1994, Forsberg et al. 1994). Спрямованість сегрегації хлоропластів може відображати ядерно-пластидну несумісність (Thanh et al., 1988, Perl et al., 1991, Walters and Earle, 1993). Інші дослідники зазначають, що в клітинах зберігаються хлоропласти того виду, геном якого переважає у гібридному ядрі (Sundberg and Glimelius, 1991a, Wolters et al., 1991, 1993), або виду, для якого розроблялись умови культивування протопластів (Forsberg et al. 1994).

В кожній комбінації видів було відібрано від 17 до 89 фотосинтезуючих колоній. Рослини-регенеранти були отримані протягом 2-11 місяців культивування калусів на регенераційному середовищі.

Для біохімічного аналізу використовували: 1) 2 лінії рослин *B. oleracea* + *B. napus* (одна лінія отримана на основі ріпака сор-

ту Клітинний 1 - ГКЗ, а друга - при використанні ріпака сорту Forte - GF1); 2) 25 ліній рослин *B. oleracea* + *A. thaliana*; 3) рослини однієї лінії *B. oleracea* + *C. bursa-pastoris*.

Аналіз регенованих рослин було в першу чергу зосереджено на характеристиці генетичного матеріалу органел, що пов'язано із застосованою схемою селекції гібридів. Геном органел вивчали за допомогою аналізу поліморфізму довжин фрагментів рестрикції, використовуючи головним чином рестриктази *Bam* HI і *Hind* III, а також *Eco* RI, *Eco* RV, *Sma* I, *Xba* I.

Було показано, що рестриктні спектри хлДНК регенованих рослин відповідали рестриктному спектру виду-донора, тобто, отримані рослини мали хлоропласти донора. Виключенням був гібрид ГКЗ, у якого було виявлено змінений *Eco* RI-рестриктний спектр хлДНК.

Таким чином, використання отриманих хлорофілдефектних мутантів капусти виявилось надовичайно ефективним для спрямованого відбору гібридів з пластомом донора. Особливо це актуально при отриманні гібридів у родині *Brassicaceae*, оскільки в багатьох опублікованих працях повідомляється про спрямовану сегрегацію хлоропластів на користь хлоропластів *Brassica* (Landgren and Glimelius, 1990, Walters and Earle, 1993).

Рестриктний аналіз мтДНК показав, що всі проаналізовані рослини мали змінену мтДНК, не характерну для батьківських форм. В рестриктних спектрах мтДНК гібридів було виявлено більшу частину фрагментів, специфічних для *B. oleracea*, частину фрагментів виду-донора, а також гібрид-специфічні фрагменти. Малоімовірно, що перебудована мтДНК отриманих рослин могла виникнути в результаті культивування *in vitro*, оскільки в змінених рестриктних спектрах мтДНК були присутні фрагменти, характерні для обох батьківських видів. До того ж, жодного разу не було виявлено змін мтДНК у рос-

лин капусти після тривалого культивування *in vitro*, а також у хлорофілдефектних мутантів, отриманих при використанні НМС - сильного індуктора цитоплазматичних мутацій. Ймовірним поясненням появи у регенерованих рослин перебудованої мтДНК є міжгеномна рекомбінація після утворення гетероплазматичної гібридної клітини (Medgyesy, 1990). Відомо також, що віддалені соматичні гібриди *Brassicaceae* характеризуються високою частотою рекомбінаційних процесів мтДНК (Landgren and Glimelius, 1990, Lelivelt and Krens, 1992, Walters and Earle, 1993, Landgren and Glimelius, 1994).

Всі проаналізовані рослини *B. oleracea* + *A. thaliana* мали однотипні зміни мтДНК. Рестриктивний аналіз мтДНК за допомогою рестриктази *Bam* HI виявив однакові гібрид-специфічні фрагменти у рослин 24 проаналізованих ліній, отриманих в результаті різних експериментів по злиттю протопластів. Гібриди, які мали однакові зміни мтДНК, були виявлені в деяких інших дослідженнях (Kemble et al., 1986, Primard et al., 1988, Landgren and Glimelius, 1994). Поява гібридних рослин з однотипними перебудовами хондріому говорить на користь сайт-специфічної міжгеномної рекомбінації мтДНК (Landgren and Glimelius, 1994).

Ядерний геном рослин-регенерантів досліджували за допомогою аналізу множинних молекулярних форм ферментів (ММФ) естерази та пероксидази. Було показано, що всі проаналізовані рослини, окрім двох (*B. oleracea* + *A. thaliana*, лінії 1А та 1С), мали ізозими естерази та/або пероксидази виду-донора поряд з основними ізозимами *B. oleracea*. У рослин ліній 1А та 1С були виявлені тільки ізозими *B. oleracea*. Аналіз ММФ гібридів *B. oleracea* + *A. thaliana* показав присутність різної кількості ізозимів *Arabidopsis* в електрофоретичних спектрах естерази різних гібридних ліній. Таким чином, нами були отримані гібридні рослини ка-

пусти з генетичним матеріалом *Brassica napus* L., *Arabidopsis thaliana* L., *Capsella bursa-pastoris* L. з різним ступенем асиметрії гібридного ядерного геному.

Цитогенетичний аналіз отриманих рослин показав, що більшість гібридів мали кількість хромосом, яка перевищувала диплоїдний набір хромосом капусти ($2n=18$) та була менша за суму диплоїдних наборів хромосом батьків. Гібриди з *C. bursa-pastoris* не вивчалися, оскільки отримані рослини не укорінювались. Серед різноманіття гібридів *B. oleracea* + *A. thaliana* були виявлені рослини, які мали 36 хромосом (лінії 1A, 4A) та 32 хромосоми (лінії 1C, 5C), що більше за суму диплоїдних наборів хромосом капусти ($2n=18$) та арабідопсиса ($2n=10$). Морфологічно хромосоми рослин лінії 1A відповідали хромосомам капусти. Рослини 1A, ймовірно, є цитоплазматичними гібридами (цибридами) з хлоропластами *Arabidopsis*, перебудованим хондріомом та геномом капусти, що має тетраплоїдний набір хромосом. У міжтрибній комбінації видів родини *Brassicaceae* цибриди отримані вперше.

Гібридні рослини *B. oleracea* + *A. thaliana* ліній 1C, 2C, 4C і 5C та *B. oleracea* + *C. bursa-pastoris* були аномальної морфології, погано укорінювались. Гібриди, що добре укорінювались, висажували у ґрунт. В теплиці всі гібриди росли набагато повільніше, ніж вихідні батьківські форми. Більшість гібридів морфологічно були проміжними між батьками. Гібриди з ріпаком (лінія ГКЗ) та з арабідопсисом (лінії 1A та 4A) були більше схожі на капусту. У отриманих гібридів спостерігали фенотипічне різноманіття за формою та розміром листків. Деякі гібриди *B. oleracea* + *A. thaliana* мали на поверхні листка прості, нерозгалужені трихоми (ознака арабідопсиса). Після висадки в поле гібриди з ріпаком ГКЗ утворили фертильні квітки, морфологічно подібні до капустяних. В

результаті самозапилення було отримане насіння. Решта гібридів не дійшли до стадії цвітіння, що, можливо, пов'язано з тим, що капуста є дворічною рослиною.

При проведенні експериментів по соматичній гібридизації в комбінації видів *B. oleracea* + *A. thaliana* було отримано набагато більше гібридних рослин, ніж в комбінаціях видів *B. oleracea* + *B. napus* та *B. oleracea* + *C. bursa-pastoris*. Це може бути пов'язано, по-перше, з філогенетичною віддаленістю видів, а по-друге, з розміром ядерного геному виду-донора. Наші спостереження узгоджуються з гіпотезою, яку висунули Samoylov and Sink (1996), відносно впливу відношення кількості ДНК донор:реципієнт на рівень елімінації хромосом донора у гібридах. Чим більше це відношення, тим менш ефективно відбувається елімінація хромосом. В результаті злиття протопластів між *B. oleracea* та *A. thaliana* було отримано багато гібридних колоній, з яких спостерігали регенерацію пагонів з високою частотою. Тобто поєднання геномів цих видів проходило значно легше порівняно з іншими, незважаючи на те, що ці види належать до різних триб родини *Brassicaceae*. Теж ж саме спостерігали Forsberg et al (1994) у комбінації видів *B. napus* + *A. thaliana*. Більш високий рівень гомології в унікальних послідовностях ядерної ДНК *Brassica* та *Arabidopsis* (Lagercrantz et al., 1994) може бути причиною більш високого рівня сумісності між двома геномами. Крім того, висока частота регенерації гібридних рослин у цій комбінації може бути пов'язана з малими розмірами геному *A. thaliana*, що полегшує його об'єднання з геномом *B. oleracea*.

Таким чином, при використанні методу "гамма-злиття" протопластів нами був отриманий різноманітний в генетичному відношенні матеріал. Використання отриманих хлорофілдефектних мутантів виявилось надзвичайно ефективним для селекції гібридів капусти з ци-

топлазматичним геномом інших видів *Brassicaceae*. За допомогою розробленої технології можливе залучення до генофонду капусти корисних для селекційного процесу генів від споріднених та віддалених видів родини *Brassicaceae*.

4. Отримання гібридів "*Brassicapsella*" з використанням подвійної інактивації протопластів донора.

Для селекції цитоплазматичних гібридів (цибридів) між партнерами, що не несуть генетичних селективних маркерів, був запропонований метод (Sidorov et al. 1994) з використанням подвійної інактивації протопластів донора (γ -променів для інактивації ядра та НМС для індукції пластомних мутацій). Суть процедури полягає в індукції пластомних мутацій стійкості до стрептоміцину кожний раз безпосередньо перед злиттям протопластів та подальшій селекції мутантних пластид в продуктах злиття.

В результаті проведених експериментів по злиттю протопластів *Brassica oleracea* var. *capitata* та *Capsella bursa-pastoris* було ізольовано 11 стійких до стрептоміцину колоній, серед них 3 колонії були здатні до фотосинтезу, а решта були знебарвлені, але активно росли на середовищі із стрептоміцином. Через два місяці після перенесення стійких до стрептоміцину колоній на регенераційне середовище без антибіотика, спостерігали морфогенез пагонів із двох зелених протоклонів (C1, C2) та одного знебарвленого (C6). Рослини отримані із клонів C1 та C2 мали морфологічні ознаки проміжні між капустою та грициками. Рослини, які регенерували із протоклону C6, були морфологічно подібні до капусти. Гібридні рослини C1 та C2 зберігали стійкість до антибіотику та утворювали корені на середовищі із стрептоміцином (0,2 мг/мл), в той час як

рослини клону С6, як і вихідні рослини капусти, знебарвлювались.

Ядерну конституцію отриманих рослин вивчали за допомогою цитогенетичного аналізу та аналізу ММФ естерази. Цитогенетичний аналіз рослин-регенерантів показав, що рослини клону С1 мали 30 хромосом, а рослини клону С2 - 28, що менше суми диплоїдних наборів хромосом батьків. Рослини С1 та С2 мали хромосоми, морфологічно відмінні від капустяних, які, ймовірно, належать *C. bursa-pastoris*. Рослини С6 мали 54 хромосоми, що відповідає гексаплоїдному набору хромосом капусти.

Аналіз ММФ виявив в естеразних спектрах рослин-регенерантів С1 та С2 всі ізоформи, характерні для *B. oleracea*, та частину ізоформів, специфічних для *C. bursa-pastoris*. Отже, аналіз ММФ естерази показав, що рослини С1 та С2 є асиметричними гібридами. В зимогамі естерази регенеранта С6 були присутні тільки характерні для *Brassica* ізоформи.

Цитоплазматичний геном отриманих гібридів вивчали за допомогою рестриктного аналізу хлДНК та мтДНК, використовуючи рестриктази *Bam* H1 та *Hind* III. Рестриктні спектри хлДНК отриманих рослин були повністю ідентичні рестриктному спектру капусти, тобто регенеранти мали хлоропласти *B. oleracea*.

Рестриктні спектри мтДНК гібридів С1 та С2 були відмінні від батьківських: було виявлено більшість видоспецифічних фрагментів капусти і частину видоспецифічних фрагментів *C. bursa-pastoris*, а також нові фрагменти, не характерні для рестриктних спектрів батьків, що може свідчити про рекомбінацію мтДНК у гібридних рослин (Landgren and Glimelius, 1994). Рестриктний аналіз мтДНК регенерантів, отриманих із протоклону С6, виявив, що рослини мали мітохондрії капусти.

Таким чином, за результатами морфологічного, цитогенетичного

та біохімічного аналізів, регенеранти, отримані із протоклону С6 є рослинами капусти з гексаплоїдним набором хромосом. Калус С6 на середовищі із стрептоміцином ріс краще порівняно з іншими калусами, можливо, завдяки поліплоїдії. Рослини клонів С1 та С2 є асиметричними гібридами *B. oleracea* + *C. bursa-pastoris* з хлоропластами капусти та реконструйованою мтДНК.

Таким чином, схема селекції з використанням подвійної інактивації протопластів донора при відсутності селективних маркерів у вихідних форм рослин може бути застосована для отримання соматичних гібридів між видами рослин родини *Brassicaceae* при наявності ефективної методики культивування протопластів.

Проведене дослідження очевидно показало можливість поєднання геномів капусти та грициків шляхом злиття протопластів. Вперше нами були отримані асиметричні міжтрибні соматичні гібриди "Brassicapsella" між *B. oleracea* L. var. *capitata* L. (триба *Brassiceae*) та *C. bursa-pastoris* L. (триба *Lepidieae*), які мали гібридне ядро, хлоропласти капусти та перебудовану мтДНК. Віддалена гібридизація в родині *Brassicaceae* - це можливість розширення генетичного різноманіття видів *Brassica*, перенесення багатьох господарсько цінних ознак, в тому числі і тих, що не зустрічаються у представників роду. Отримані гібриди є унікальними за своєю ядерною та цитоплазматичною генетичною конституцією.

ВИСНОВКИ.

1. Запропонована ефективна методика культивування протопластів *Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. з використанням їх імобілізації в алгінатну плівку та розроблені умови регенерації рослин.

2. Вперше для *Brassicaceae* застосована ефективна система селекції гібридів капусти з цитоплазматичними генами іншого виду, яка базується на використанні отриманих хлорофілдефектних мутантів капусти.

3. Показано можливість отримання гібридів між віддаленими видами родини *Brassicaceae* без наявності селективних генетичних маркерів у вихідному матеріалі за допомогою клітинної технології, яка базується на використанні подвійної інактивації протопластів донора.

4. Показано, що метод "гамма-злиття" протопластів є ефективним для перенесення частини ядерного та цитоплазматичного генетичного матеріалу та створення асиметричних гібридів між спорідненими і філогенетично віддаленими видами рослин родини *Brassicaceae*.

5. Отримано міжвидові (*Brassica oleracea* L. + *Brassica napus* L.) та мікрийбні (*Brassica oleracea* L. + *Arabidopsis thaliana* L., *Brassica oleracea* L. + *Capsella bursa-pastoris* L.) асиметричні соматичні гібриди капусти, а також цибриди з ядерним геномом капусти та цитоплазматичними генами *A. thaliana*.

6. Показано, що отримані асиметричні гібриди капусти були різними за ядерною генетичною конституцією, мали хлДНК донорного виду або капусти та реконструйовану мтДНК.

Список робіт, опублікованих по темі дисертації.

1. Нитовская И.А., Сидоров В.А. Соматический эмбриогенез как один из путей органогенеза растений *in vitro* на примере *Brassica oleracea* var. *capitata*. / Матеріали 7-ї міжнародної школи по вив-

ченню онтогенезу рослин природних та культурних флор у ботанічних закладах Європи., Львів, 1994.

2. Нитовская И.А., Сидоров В.А. Получение генетически маркированных растений для использования в клеточной инженерии *Brassica oleracea* var. *capitata*. / Материалы симпозиума по биотехнологии и генетической инженерии растений, Киев, 1994.

3. Нитовская И.А., Околот А.Н., Сидоров В.А. Регенерация растений из мезофильных протопластов *Brassica oleracea* var. *capitata*. // Цитология и генетика. - 1994. - том 28, N 6. - С. 3-6.

4. Нитовская И.А. Органогенез *in vitro* у некоторых видов *Brassica*. / Матеріали 8-ї Міжнародної конференції по вивченню онтогенезу рослин природних та культурних флор у ботанічних закладах Європи, Київ, 1995.

5. Нитовская И.А., Околот А.Н., Сидоров В.А. Получение *in vitro* хлорофиллдефектных растений капусты. // Цитология и генетика. - 1996. - том 30, N 1. - С. 72-76.

6. Nitovskaya I., Sidorov V. Isolation of chlorophyll-deficient mutants of *Brassica oleracea* var. *capitata* and their capability for cybrid production within *Brassicaceae*. / Abstracts Plant Genome IV, San Diego, 1996.

7. Nitovskaya I.A., Shakhovsky A.M., Sidorov V.A. Asymmetric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. // Plant Physiology and Biochemistry. Special issue, 10th FESPP Congress, Florence, Italy. - 1996, September 9-13. - p. 40.

Nitovska I.O. Genetic reconstruction of nucleus and cytoplasm of *Brassica oleracea* L. by protoplast fusion.

Thesis for a scientific degree of Candidate of Biological Sciences on speciality 03.00.25. - Cell Biology, Institute of

Cell-Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 1997.

The results of 7 scientific publications are defended.

The effective method of protoplast culturing and plant regeneration of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) using protoplast immobilization in calcium-alginate has been developed. Chlorophyll-deficient mutants of cabbage were isolated using the treatment of seeds with N-nitroso-N-methylurea. Two approaches for somatic hybrid selection within *Brassicaceae* have been proposed. One approach is based on using of protoplast of cabbage chlorophyll-deficient mutants as recipients and γ -irradiation of donor protoplasts. Another is based on using double inactivation of donor protoplast before fusion. Interspecific (*B. oleracea* L. + *B. napus* L.) and intertribal (*B. oleracea* L. + *Arabidopsis thaliana* L., *B. oleracea* + *Capsella bursa-pastoris* L.) asymmetric somatic hybrids and cybrids with nuclear genome of cabbage and *Arabidopsis* plastome were obtained. Using chromosome counting, isozyme analysis and restriction analysis of organelle DNA, obtained asymmetric hybrids were shown to have different nuclear genome, plastome of the donor species or cabbage and rearrangement of mitochondrial DNA.

Нитовская И.А. Генетическая реконструкция ядра и цитоплазмы *Brassica oleracea* L. с помощью слияния протопластов.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.25. - клеточная биология, Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1997.

Защищается 7 научных работ по теме диссертации.

Предложена эффективная методика культивирования протопластов и регенерации растений капусты белокочанной (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) с использованием иммобилизации протопластов в алгинат кальция. В результате обработки семян N-нитрозо-N-метил-мочевинной получены хлорофиллдефектные мутанты *B. oleracea* var. *capitata*. Предложены две клеточных технологии селекции асимметричных соматических гибридов в семействе *Brassicaceae*: одна основывается на использовании протопластов хлорофиллдефектных мутантов капусты как реципиентов и γ -облучения протопластов донора, а другая - на использовании двойной инактивации протопластов донора перед слиянием. Получены межвидовые (*B. oleracea* L. + *B. napus* L.) и межтрибные (*B. oleracea* L. + *Arabidopsis thaliana* L., *B. oleracea* + *Capsella bursa-pastoris* L.) асимметричные соматические гибриды капусты, а также гибриды с ядерным геномом капусты и пластомом *Arabidopsis thaliana*. С помощью цитогенетического анализа, анализа множественных молекулярных форм ферментов и рестрикционного анализа ДНК органелл показано, что полученные асимметричные гибриды капусты были различны по своей ядерной генетической конституции, имели хлоропласты донорного вида или капусты и реконструированную митохондриальную ДНК.

Ключевые слова: *Brassica oleracea*; хлорофиллдефектные мутанты; слияние протопластов; *Brassicaceae*; межвидовые и межтрибные соматические гибриды.



Підп. до друку 09.01.97. Формат 60×84¹/₁₆.
Папір друк. № 1. Спосіб друку офсетний. Умовн. друк. арк. 139.
Умовн. фарбо-відб. 1,50. Обл.-вид. арк. 10.
Тираж 100. Зам. № 7-32.

Фірма «ВІПОЛ»
252151, Київ, вул. Волинська, 60.