

УДК 577.21 : 582.683.2

І.О. НІТОВСЬКА, А.М. ШАХОВСЬКИЙ,
М.Н. ЧЕРЕП, М.М. ГОРОДЕНСЬКА, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

**ОТРИМАННЯ ЦИБРИДНИХ
ТРАНСПЛАСТОМНИХ РОСЛИН
BRASSICA NAPUS
З ХЛОРОПЛАСТАМИ
LESQUERELLA FENDLERI**



Проводили перенесення трансформованих пластид *Lesquerella fendleri* до рослин *Brassica napus* методом соматичної гібридизації. В експериментах були використані транспластомні рослини *L. fendleri*, які містили в пластидній ДНК селективний маркерний ген *aadA16gfp*, що обумовлює стійкість до спектиноміцину/стрептоміцину та зелену флуоресценцію в ультрафіолетових променях. Протопласти хлорофілдефектних рослин *B. napus* зливали з γ -опроміненими протопластами транспластомних рослин *L. fendleri*. Зелені колонії, які росли на селективному середовищі із спектиноміцином та стрептоміцином, відбирали як гібридні. Серед 59 гібридних колоній для двох спостерігали регенерацію пагонів. Морфологічно нормальні рослини було отримано для однієї лінії. Молекулярно-біологічний аналіз рослин показав, що вони є транспластомними цибридами, які мають ядерний ген *B. napus* та трансформований пластом *L. fendleri*.

© І.О. НІТОВСЬКА, А.М. ШАХОВСЬКИЙ, М.Н. ЧЕРЕП,
М.М. ГОРОДЕНСЬКА, М.В. КУЧУК, 2006

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика. 2006. № 4

Вступ. Ріпак (*Brassica napus* L.) є важливою сільськогосподарською культурою, що займає друге місце в світі серед олійних культур по валовому збору рослинної олії. В Україні за останніх два роки посівні площі ріпака виростили в чотири рази і сягнули понад 1 млн га. З ріпака отримують харчову та технічну олії, а вижимки і вегетативну масу використовують у тваринництві як цінний корм. Продукти переробки ріпака широко застосовують у хімічній промисловості. Одним із напрямків промисловості, який активно розвивається в останні роки, є створення біопалива на базі олії ріпака. Особливо це набуває значення на тлі зростання цін на нафту на світових ринках, природних запасів якої за прогнозами вистачить лише на 40–60 років. Тому вже найближчим часом країни ЄС намагатимуться досягти 5%ної частки біопалива з ріпака в загальному обсязі палива з нафти.

Постійне збільшення посівних площ ріпака привело до активізації селекційної роботи по створенню нових сортів з поліпшеними характеристиками хімічного складу олії, підвищеною стійкістю до захворювань та абіотичних факторів. Натомість для покращання сортів ріпака залучаються новітні здобутки не тільки в галузі класичної генетики, але й генетичної інженерії. За даними 2000 р. до 11 % світових посівних площ ріпака було зайнято генетично модифікованими сортами [1]. Проте головним недоліком генетичної трансформації є загроза розповсюдження чужинних генів у навколишньому середовищі через переzapилення з дикими родичами. Тому найбільш привабливим напрямком генетичної трансформації ріпака є трансформація хлоропластів, оскільки пластиди цього виду, як і більшості культурних рослин, успадковуються по материнській лінії [2]. Крім згаданого екологічного аспекту, трансформація пластома порівняно з ядерною трансформацією має інші переваги, які пов'язані з організацією геному пластид [3], а саме: високий рівень експресії і акумуляції білків за рахунок великої кількості копій пластидної ДНК в клітині; можливість введення одразу декількох генів, організованих в один оперон; запобігання позиційного ефекту вбудовування гена, тому що інтеграція трансгена в пластом відбувається шляхом гомологічної рекомбінації.

Але, незважаючи на привабливість пластидної трансформації, її ефективність є набагато

нижчою, ніж ядерної. Рутинні протоколи отримання транспластомних рослин розроблено тільки для одного виду — *Nicotiana tabacum* [4, 5], і лише по одному повідомленню було опубліковано щодо отримання транспластомних рослин для деяких інших видів родин *Solanaceae* і *Brassicaceae*: *Solanum tuberosum* [6], *Lycopersicon esculentum* [7], *Glycine max* [8], *Petunia hybrida* [9], *Arabidopsis thaliana* [10], *Lesquerella fendleri* [11], *Brassica napus* [12].

Нещодавно було запропоновано новий підхід до створення транспластомних рослин видів через перенесення трансформованих пластид від інших видів (в тому числі віддалених) шляхом злиття протопластів [13, 14]. Інактивацию ядерного генетичного матеріалу виду — донора пластид — здійснюють за допомогою опромінення високими дозами. В результаті можливе створення цибридних транспластомних рослин, які містять ядерний матеріал одного виду, цікавого для дослідника, поряд з трансформованими хлоропластами іншого.

В нашій роботі ми намагались відпрацювати методику отримання транспластомних рослин ріпака шляхом перенесення трансформованих пластид іншого виду методом соматичної гібридизації. Оскільки серед отриманих транспластомних рослин родини *Brassicaceae* тільки рослина *L. fendleri* є гомопластидною та фертильною [11], саме її було обрано для наших експериментів. *B. napus* і *L. fendleri* є віддаленими видами родини та належать до різних триб — *Brassicaceae* і *Drabaeae* відповідно. За допомогою злиття протопластів ми отримали цитоплазматичні транспластомні гібриди, які містять ядро *B. napus* та трансформовані пластиди *L. fendleri*.

Матеріали і методи. В експериментах по злиттю протопластів використовували ріпак сорту Westar та транспластомні рослини *L. fendleri*, люб'язно надані проф. П. Маліга (Інститут Уаксмана Ратжерського державного університету штату Нью Джерсі, США). Рослини *L. fendleri* містили в пластомі селективний маркерний ген *aadA16gfp*, який обумовлює стійкість до антибіотиків спектиноміцину і стрептоміцину та зелену флуоресценцію в ультрафіолетових променях [11]. Рослини вирощували *in vitro* на безгормональному середовищі MS [15] при ос-

вітленні 2000 лк, фотоперіоді 16/8 год та температурі 22–24 °С і щомісячно пересаджували на свіже середовище, розмножуючи живцюванням.

Для експериментів по злиттю протопластів отримували хлорофілдефектні рослини *B. napus* за методикою [16], яка базується на використанні спектиноміцину, інгібітора пластидного білкового синтезу. Насіння стерилізували за стандартним протоколом [17] і пророщували на безгормональному середовищі MS з додаванням 600 мг/л спектиноміцину в умовах розсіяного світла при 22–24 °С і фотоперіоді 16/8 год. Через місяць паростки пересаджували на середовище для хлорофілдефектних рослин, що містило макро- і мікросоли середовища MS, вітаміни Мореля [18], 500 мг/л гідролізату казеїну, 35 г/л цукрози та по 0,2 мг/л БАП і НОК. Хлорофілдефектні рослини вирощували в зазначеному режимі, розмножували живцюванням і пересаджували на свіже середовище щомісячно.

В експериментах по соматичній гібридизації протопласти хлорофілдефектних рослин *B. napus* служили реципієнтом, а протопласти *L. fendleri* — донором трансформованих хлоропластів. Виділення мезофільних протопластів з листя 3–4-тижневих рослин ріпака проводили за методикою [17]. Протопласти *L. fendleri* отримували з листків 4-тижневих рослин або з калюсу за вказаною методикою, використовуючи ферментний розчин (0,6 % Macerozyme («Calbiochem», США), 0,2 % Cellulysin («Calbiochem», США), 0,6 % Onozuka R-10 (Jacult Biochemicals,)), 0,5 М цукрози та 5 мМ CaCl₂, рН 5,6). Калюс *L. fendleri* для виділення протопластів одержували з листя 3–4-тижневих рослин на середовищі EMS [19]. Для цього листки розрізали на смужки 1 мм завширшки та 10–15 мм в довжину, висаджували на середовище та культивували при температурі 24–26 °С в темряві. Калюс переносили на свіже середовище кожні 3–4 тиж. Для інактивации ядра та запобігання поділу клітин перед виділенням протопластів листя або калюс *L. fendleri* опромінювали γ -променями дозою 400–500 Гр (Co⁶⁰ 1,3 Гр/хв).

Протопласти реципієнта та донора пластид змішували у співвідношенні 3 : 1 та зливали за методикою Менцеля та ін. [20]. Після злиття

протопласти фіксували в алгінатній плівці [21] та культивували в тонкому шарі рідкого модифікованого середовища Km8p [22], яке не містило кокосової води, вітамінів А, D₃, В₁₂, *n*-амінобензойної кислоти та мало змінений склад гормонів: 2 мг/л НОК, 0,5 мг/л БАП, 0,2 мг/л 2,4-Д. Після утворення 4–8 клітинних колоній (приблизно через 5–7 днів) до протопластів додавали 1–2 мл свіжого середовища Km8p. Потім кожні 6 днів 1 мл середовища, в якому знаходились протопласти, замінювали на 2 мл рідкого середовища ST-1 [19]. Через місяць, коли клітинні колонії набували 0,5–1 мм у діаметрі, алгінатну плівку розчиняли [23], а колонії переносили на тверде середовище ST-1. Перед цим тверде середовище ST-1 накривали фільтрувальним папером для зручності маніпуляцій з клітинними колоніями під час перенесення їх на свіже середовище кожні два тижні. Гібридні колонії відбирали за ознакою позеленіння. Зелені колонії піддавали додатковій селекції на присутність трансформованого пластоми *L. fendleri*, висаджуючи їх на середовище ST-1 з антибіотиками спектиноміцином та стрептоміцином (по 100 мг/л). Через 1,5–2 міс зелені колонії переносили на регенераційні середовища без антибіотиків: 1) макро-, мікросолі та вітаміни середовища ST-1, 10 мг/л цукрози, 0,5 мг/л кінетина, 0,8 мг/л ГК3 і 0,1 мг/л ІОК; 2) макро-, мікросолі та вітаміни середовища ST-1, 10 мг/л цукрози, 1 мг/л зеатина, 1 мг/л БАП і 0,1 мг/л ІОК; 3) 1/2 солей середовища MS, вітаміни Мореля, 10 мг/л цукрози, 1 мг/л БАП і 1 мг/л НОК; 4) 1/2 солей середовища MS, вітаміни Мореля, 10 мг/л цукрози, 3 мг/л БАП і 1 мг/л зеатина. Рослини-регенеранти висаджували або на безгормональне середовище MS з 20 г/л цукрози, або з додаванням 0,8 мг/л ГК₃. З міжвузлів рослин-регенерантів отримували регенеранти наступного покоління на середовищі, яке містило 1/2 солей середовища MS, вітаміни Мореля, 10 мг/л цукрози та 0,25 мг/л БАП.

Гібридний калюс та рослини аналізували методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на ампліфікаторі «Терцик ІМ02» («ДНК-технологія», Москва). Виділення тотальної ДНК проводили згідно з протоколом [24]. Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 1%-ному агарозному гелі.

Спочатку за допомогою праймерів 5'-CACTACATTCGCTCATCGCC-3' і 5'-TGCTGGCCGTACATTTGTACG-3', специфічних до внутрішньої частини гена *aadA*, виявляли його присутність у гібридному матеріалі. Розмір продукта, ампліфікованого за допомогою праймерів, становив 479 пн. Необхідна температура реасоціації — 60 °С, тривалість реакції синтезу фрагмента — 1 хв при 72 °С.

Наступним кроком було визначення видової специфічності пластидної ДНК (плДНК) отриманого гібридного матеріалу. Для цього проводили ампліфікацію фрагмента плДНК за допомогою праймерів, специфічних до генів *atpB* (5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC) та *rbcL* (5'-TACAGTTGTCCATGTACCAG). Необхідна температура реасоціації становила 50 °С, тривалість реакції синтезу фрагмента — 1 хв при 72 °С. Рестриктивний аналіз ампліфікованого фрагмента хлДНК проводили за допомогою ферменту *EcoRV*.

Аналіз ядерної конституції гібридного матеріалу проводили шляхом порівняння спектра фрагментів ампліфікованих, використовуючи праймер 5'-GACAGACAGACAGACA-3' (температура реасоціації — 45 °С, тривалість реакції — 1 хв), або праймер 5'-TCCTCCTCCTCCTCC-3' (температура реасоціації — 50 °С, тривалість реакції — 1 хв).

Мітохондріальну ДНК (мтДНК) отриманого гібридного матеріалу досліджували за допомогою аналізу рестриктного спектра гена *ndh1*. Фрагмент гена довжиною 1500 пн. ампліфікували за допомогою праймерів 5'-GCA TTACGATCTGCAGCTCA-3' і 5'-GCAGCTCGATTAGTTTCTGC-3', специфічних до внутрішньої частини гена. Необхідна температура реасоціації становила 60 °С, тривалість реакції синтезу фрагмента — 2 хв при 72 °С. Рестрикцію фрагмента проводили ферментом *HindIII*.

Ядерну конституцію отриманого гібридного матеріалу вивчали також за допомогою аналізу множинних молекулярних форм ферментів (ММФФ) естерази та амілази. Ферментний екстракт отримували згідно з протоколом [25]. Електрофорез білків проводили в 7,5%-ному поліакриламідному гелі з додаванням 0,3 % крохмалю. Як буфер використовували 0,56 % розчин вероналу і 0,1 % Трис. Активність естерази та амілази виявляли відповідно до методик [25].

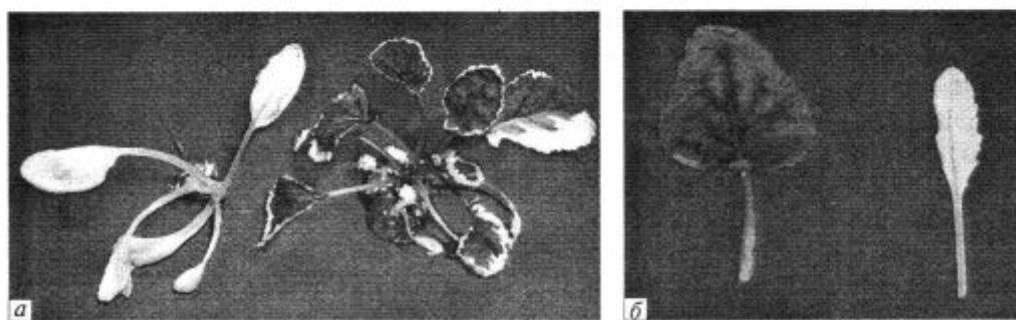


Рис. 1. Зовнішній вигляд хлорофілдефектних рослин ріпака: а — біла та строката рослини; б — морфологія листків вихідної та альбіносної рослин

Результати дослідження та їх обговорення. Використання пластомних хлорофілдефектних мутантів рослин як реципієнтів в експериментах по злиттю протопластів полегшує селекцію гібридів, які мають хлоропласти донора [26]. Проте стабільну хлорофілдефектність для представників родини хрестоцвітих можна ефективно генерувати і без мутагенезу шляхом нетривалого культивування зі спектиноміцином, який є інгібітором пластидного білкового синтезу [16]. Саме цей метод ми застосували для отримання хлорофілдефектних рослин ріпака.

На середовище зі спектиноміцином висадили 100 насінин ріпака сорту Westar. Протягом наступних чотирьох тижнів 51 хлорофілдефектну рослину з двома-трьома справжніми листочками перенесли в банки із середовищем без антибіотика. При подальшому культивуванні на середовищі без спектиноміцину більшість рослин ставали зеленими. Відновлення фотосинтезу спостерігали протягом півроку. Через 8 міс було відібрано шість ліній рослин зі стабільною хлорофілдефектністю: дві з них мали строкаті рослини, а чотири інші — білі (рис. 1, а). Кожна лінія рослин походила з окремої насінини. Білі рослини мали листки, менші за розміром порівняно із зеленими рослинами (рис. 1, б). Для експериментів було обрано дві лінії білих рослин, які краще росли та мали більші листки. Через рік культивування *in vitro* на деяких листках однієї з двох відібраних ліній спостерігали появу невеликих зелених секторів розміром 0,5—2 мм², що вказує на гетеропластидність отриманого матеріалу, яку спочатку не було виявлено. Тому при використанні хлорофілдефектних рослин, отриманих на спек-

тиноміцині, потрібно ретельно перевіряти їх на пластидну гомогенність, оскільки для експериментів по перенесенню хлоропластів важливо мати гомопластидні альбіносні форми.

Отже методика отримання хлорофілдефектних рослин ріпака, що базується на використанні спектиноміцину в поживному середовищі, є достатньо ефективною і нескладною у виконанні. За її допомогою можна одразу отримувати альбіносні рослини, які не потребують подальшого розхимерювання, тоді як мутагенез з використанням пластомних мутагенів, зокрема N-нітрозоз-N-метилсечовини, дозволяє отримувати лише строкаті рослини [27—29], які потрібно розхимерювати, що не завжди легко зробити. До того ж використання спектиноміцину менш шкідливе для здоров'я людини порівняно з мутагенами.

Було проведено три експерименти по злиттю протопластів хлорофілдефектних рослин *B. napus* і транспластомних рослин *L. fendleri* з метою перенесення трансформованих пластид *Lesquerella* до ріпака. Протопласти *L. fendleri* отримували або з калюсу, або з листків. Перед виділенням протопластів рослинний матеріал *L. fendleri* γ -опромінювали дозою 400 або 500 Гр. В експерименті 1 використовували калюсні протопласти *L. fendleri* (доза опромінення — 400 Гр), в експерименті 2 — мезофільні протопласти (500 Гр) і в експерименті 3 — калюсні протопласти (500 Гр). Загальна кількість протопластів в кожному експерименті була 1—2 · 10⁶. Ефективність висіву протопластів після злиття становила 45—50 % (за ефективність висіву ми приймали виражене у відсотках відношення кількості протопластів, що поділились, до загальної кількості).

■ Отримання цибридних транспластомних рослин *Brassica napus* з хлоропластами *Lesquerella fendleri* ■

Ймовірні гібридні колонії відбирали за ознакою позеленіння на середовищі ST-1. Зелені калюси аналізували методом ПЛР на присутність гена *aadA*, який містять трансформовані пластиди *L. fendleri*. Показано, що у багатьох колоній ген був відсутній (дані не наведено). Тому одержані зелені колонії переносили на середовище ST-1 із спектиноміцином та стрептоміцином для додаткової селекції на присутність трансформованого пластоми, оскільки продукт гена *aadA* забезпечує стійкість до цих антибіотиків. Протягом культивування на селективному середовищі кількість зелених колоній зменшилась майже в п'ять разів до 59 (по 17 колоній отримано в експерименті 1 і 2 та 25 колоній — в експерименті 3). Решта колоній знебарвились. Гібридні колонії нумерували. В нумерації колоній перша цифра відповідала номеру експерименту, а інші — порядковий номер протоклону, відібраного після селекції. Частина зелених калюсів аналізували методом ПЛР. Показано, що всі вони мали трансформований пластом *Lesquerella* (рис. 2) та або гібридне ядро, або ядро *B. napus* (рис. 3). Отже, зелені колонії, відібрані після селекції, утворились в результаті злиття клітин двох видів рослин, а ті, що знебарвились, ймовірно, походять від протопластів тієї альбіносної лінії *B. napus*, яка мала незначну кількість нормальних пластид.

Регенерацію пагонів спостерігали для двох клітинних ліній (12 і 314) через 7 міс після перенесення на регенераційні середовища. Пересаджені в банки рослини майже не росли, не формували коренів, а регенеранти лінії 12 перетворювались на калюс. Регенерація пагонів відбувалась протягом року на середовищах 1, 2

та ST-1 для лінії 12, а також на регенераційних середовищах 2 і 4 для лінії 314. В цілому 27 рослинко лінії 12 та 8 рослинко лінії 314 було висаджено в банки. Тільки регенеранти лінії 12, отримані через рік, були здатні нормально рости та утворювати корені. Морфологічно рослини були більше схожі на ріпак, але мали листки, дрібніші за розміром, круглястої або видовженої форми (рис. 4). На одній рослині могли бути листки одразу двох форм. Регенеранти наступного покоління, отримані з міжвузлів рослин лінії 12, мали листки тільки круглястої форми.

Аналіз рослин лінії 12 методом ПЛР показав, що вони, як і калюс цієї лінії, містили транс-

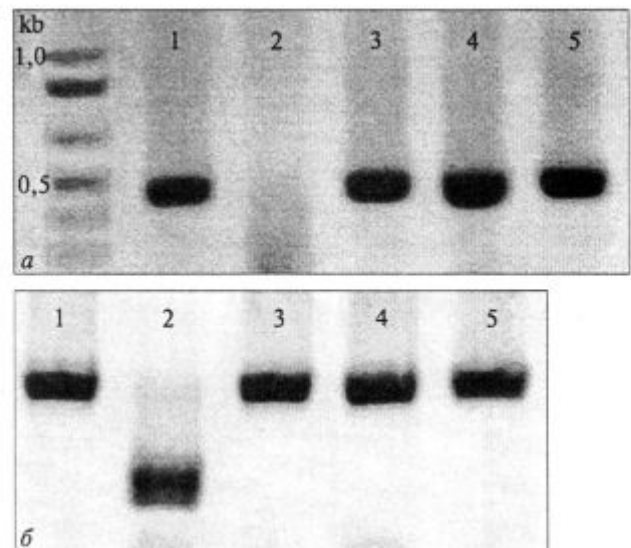


Рис. 2. ПЛР-аналіз пластоми гібридних калюсів: а — аналіз на присутність гена *aadA*; б — *EcoRV* гідроліз фрагмента *atpB-rbcL* пДНК; 1 — *L. fendleri*; 2 — *B. napus*; 3—5 — калюсні лінії 314, 12, 31 відповідно

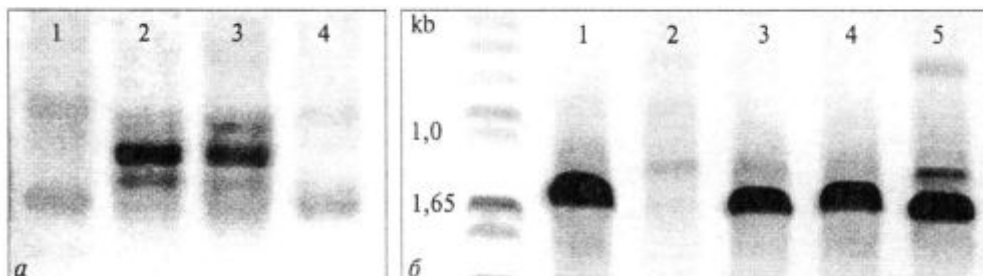


Рис. 3. Аналіз ядерної конституції гібридного калюсу методом ПЛР. Спектр фрагментів ампліфікованих, з використанням праймера 5'-GACAGACAGACAGACA-3' (а) або праймера 5'-TCCTCCTCCTCCTCC-3' (б); 1 — *B. napus*; 2 — *L. fendleri*; 3—5 — калюсні лінії 314, 12, 31 відповідно

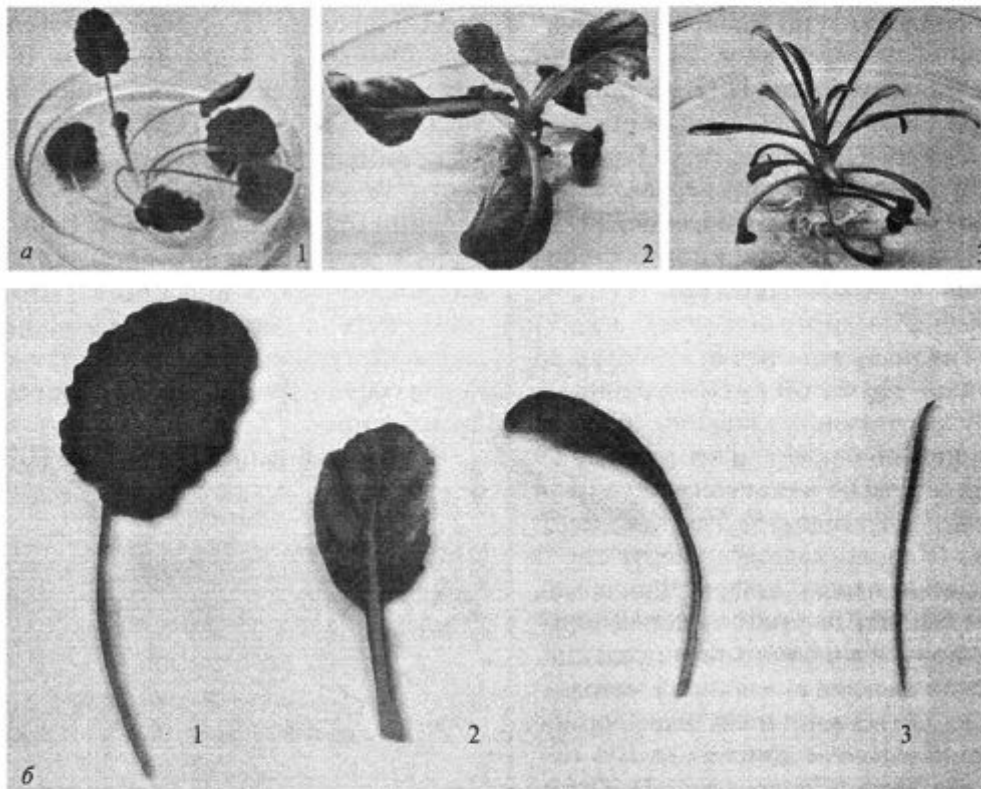


Рис. 4. Порівняльний морфологічний аналіз цитоплазматичного гібриду *B. napus* (+ *L. fendleri*); а — зовнішній вигляд рослин in vitro; б — морфологія листків; 1 — *B. napus*; 2 — цибрид, лінія 12; 3 — *L. fendleri*



Рис. 5. ПЛР-аналіз ДНК органел цибридних рослин *B. napus* (+ *L. fendleri*) лінії 12: а — *EcoRV* рестрикція *atpB-rbcL* фрагмента хлоропластної ДНК; б — *HindIII* гідроліз мітохондріального гена *ndh1*; 1 — *B. napus*; 2 — *L. fendleri*; 3 — рослина-регенерант; 4 — регенерант наступного покоління; 5 — біла рослина лінії 12

формований пластом *L. fendleri* (рис. 5, а) та ядерний геном *B. napus*. *HindIII* рестриктний аналіз ампліфікованого фрагмента мітохондріального гена *ndh1* показав, що він походить від *B. napus* (рис. 5, б).

Ядерну конституцію отриманого матеріалу додатково вивчали за допомогою аналізу ММФФ естерази та амілази рослин лінії 12, а також калюсу 314, з якого спостерігали регенерацію пагонів. Аналіз ММФФ показав, що рослини лінії 12 мали виключно ізоферменти ріпака, тоді як в ізозимних спектрах калюсу 314 були присутні ізоферменти, специфічні для обох батьків

(рис. 6). Таким чином, виходячи з результатів аналізів, отримані рослини лінії 12 є цибридами ріпака, які містять ядро *B. napus* та трансформовані пластиди *L. fendleri*. Оскільки рослини з трансформованим пластомом прийнято називати транспластомними, то рослини, яким було перенесено трансформований пластом від іншого виду, можна назвати цибридними транспластомними рослинами.

Для двох рослин лінії 12 спостерігали утворення білих пагонів (рис. 7, а) поряд із зеленими. Ми припустили, що поява білої рослини є результатом ймовірної присутності двох типів

■ Отримання цибридних транспластомних рослин *Brassica napus* з хлоропластами *Lesquerella fendleri* ■

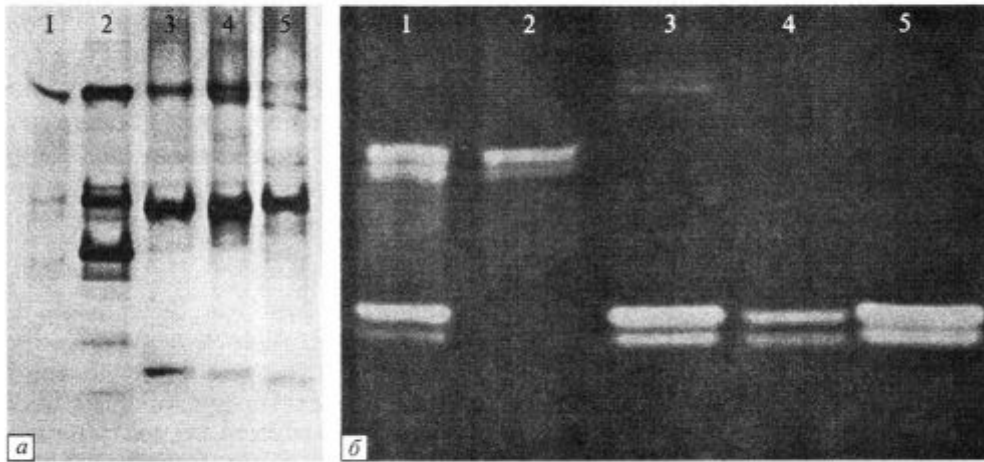


Рис. 6. Аналіз ММФФ естерази (а) і амілази (б): 1 — гібридний калюс 314; 2 — *L. fendleri*; 3 — *B. napus*, зелена рослина; 4 — рослина лінії 12; 5 — *B. napus*, альбіносна рослина

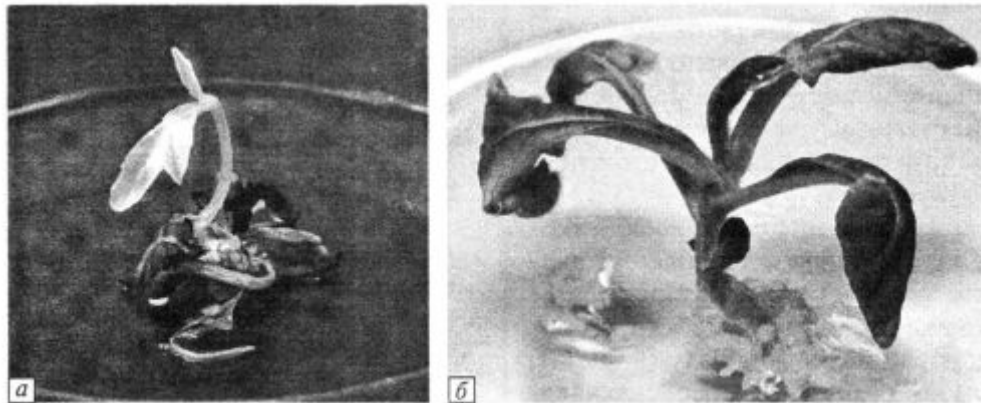


Рис. 7. Ознаки часткової ядерно-пластидної несумісності у деяких цибридних рослин лінії 12: а — утворення білого пагону; б — антоціанове забарвлення молодих листків

пластид у рослин-регенерантів (хлорофілдефектних *B. napus* та зелених *L. fendleri*) і їх подальшої сегрегації. Щоб пересвідчитись у цьому, білу рослину досліджували методом ПЛР. Проте показано, що в генетичному відношенні вона була така ж сама, як і зелені рослини лінії 12: мала пластиди *L. fendleri* (а не *B. napus*, як ми очікували), ядро та мітохондрії *B. napus* (рис. 5). Звідси ймовірним поясненням утворення білих рослин є прояв часткової ядерно-пластидної несумісності у цибридів [30, 31], які, можливо, на той час були недостатньо збалансовані та стабільні у генетичному відношенні. На користь такого припущення може також свідчити і той факт, що регенерацію рослин спостерігали тільки через 7 міс після селекції гібридного калюсу, а морфологічно нор-

мальні рослини отримали ще через рік. Для деяких рослин лінії 12 спостерігали появу молодих листків з ознаками хлорофілового дефіциту та антоціанового забарвлення (рис. 7, б), які з часом зникали, що, на наш погляд, теж могло бути фенотипічним проявом часткової ядерно-хлоропластної несумісності цибриду 12.

Факт соматичної сумісності ядерних геномів *B. napus* та *L. fendleri* встановлено вже досить давно [32]. В нашій роботі ми хотіли дослідити можливість поєднання ядра *B. napus* та пластид *L. fendleri* для створення транспластомних рослин ріпака шляхом соматичної гібридизації, оскільки *L. fendleri* є видом родини хрестоцвітих з високою регенераційною здатністю, для якого отримано транспластомні рослини [11].

Ми передбачали, що поєднати ядерний геном *B. napus* та пластиди *L. fendleri* буде непросто, оскільки Скаржинська та ін. [32] спостерігали спрямовану сегрегацію саме пластид *L. fendleri* у ядерних соматичних гібридів між цими видами. Серед 80 гібридних рослин тільки дві, отримані в експериментах без використання опромінення протопластів *L. fendleri*, мали пластиди обох батьків, а всі інші — хлоропласти *B. napus*. Спрямовану сегрегацію пластид автори пояснюють впливом вмісту ядерної ДНК і розміру клітини на кількість пластид і пластидної ДНК, тому нерівна кількість хлоропластів попадає в гібридну клітину від кожного із батьків, оскільки *B. napus* є алотетраплоїдом, а *L. fendleri* — диплоїдом. Більш жорстку та спрямовану сегрегацію пластид *Lesquerella*, яку спостерігали в експериментах з використанням опромінення протопластів *L. fendleri* (доза 180 або 200 Гр), автори пояснюють можливим зменшенням вмісту ядерної ДНК, необхідної для підтримання власних пластид [32]. Тому для того щоб збільшити ймовірність селекції продуктів злиття з ядром *Brassica* та пластидами *Lesquerella*, ми з одного боку використовували як реципієнт хлоропластів хлорофілдефектні рослини ріпака з порушеним пластидним білковим синтезом, а з другого — опромінення рослинного матеріалу *L. fendleri*, щоб запобігти небажаному перенесенню ядерного генетичного матеріалу. При таких умовах злиття протопластів ймовірність отримання саме цитоплазматичних гібридів зростає навіть при можливій частковій ядерно-цитоплазматичній несумісності в зазначеній комбінації [30, 31]. Дійсно частота утворення зелених гібридних колоній в наших експериментах була дуже низькою. Серед 59 відібраних гібридних колоній для двох спостерігали регенерацію пагонів, що співвідноситься з частотою регенерації попереднього дослідження: 4–5 % для експериментів з використанням опромінених протопластів *L. fendleri* [32].

Таким чином, нами вперше було отримано цибриди *B. napus* з хлоропластами *L. fendleri*. Оскільки хлоропласти *L. fendleri* були генетично трансформованими, отримані рослини ми назвали транспластомними цитоплазматичними гібридами. Отже в нашому дослідженні показано можливість створення транс-

пластомних рослин ріпака шляхом перенесення трансформованих пластид *L. fendleri* методом злиття протопластів. Отримані рослини є цікавою моделлю для дослідження ядерно-цитоплазматичних взаємовідносин та вивчення поведінки хлоропластних трансгенів в новому ядерному та мітохондріальному оточенні.

SUMMARY. Transferring of *Lesquerella fendleri* genetically transformed plastids to *Brassica napus* plants has been performed with the somatic hybridization method. The plastome of the previously engineered transplastomic *L. fendleri* plants contained the *aadA16gfp* selective marker gene conferring spectinomycin/streptomycin resistance and green fluorescence under UV light. The protoplasts of *B. napus* chlorophyll-deficient plants were fused with γ -irradiated protoplasts of *L. fendleri* transplastomic plants. A total of 59 green hybrid colonies have been isolated followed by spectinomycin/streptomycin selection. Shoot regeneration has been observed for two cell lines. Morphologically normal plants have been regenerated for one of them. PCR and isozyme analyses showed that the plants were transplastomic cybrids containing *B. napus* nuclei and *L. fendleri* transformed chloroplasts.

РЕЗЮМЕ. Проводили перенос трансформованих пластид *Lesquerella fendleri* в растения *Brassica napus* методом соматической гибридизации. В экспериментах были использованы транспластомные растения *L. fendleri*, которые содержали в пластидной ДНК селективный маркерный ген *aadA16gfp*, обуславливающий устойчивость к спектиномицину/стрептомицину и зеленую флуоресценцию в ультрафиолетовых лучах. Протопласты хлорофиллдефектных растений *B. napus* сливали с γ -облученными протопластами транспластомных растений *L. fendleri*. Зеленые колонии, которые росли на селективной среде, содержащей спектиномицин и стрептомицин, отбирали как гибридные. Среди 59 гибридных колоний в двух наблюдали регенерацию побегов. Морфологически нормальные растения были получены для одной линии. Молекулярно-биологический анализ растений показал, что они являются транспластомными цибридами, которые имеют ядерный геном *B. napus* и трансформированный пластом *L. fendleri*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. James C. Global review of commercialized transgenic crops: 2000. — ISAA Briefs, 2000, № 21: Preview. ISAA: Ithaca, NY.
2. Scott S.E., Wilkinson M.J. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa* // Nature Biotechnol. — 1999. — 17. — P. 390–392.

3. Bock R. Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology // J. Mol. Biol. — 2001. — 312. — P. 425—438.
4. Svab Z., Maliga P. High frequency plastid transformation in tobacco by selection for chimeric *aadA* gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1993. — 90. — P. 913—917.
5. Golds T., Maliga P., Koop H.-U. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* // Biotechnology. — 1993. — 11. — P. 95—97.
6. Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.-Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J.M., Nehra N.S. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. — 1999. — 19, № 2. — P. 209—216.
7. Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H., Bock R. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nat. Biotechnol. — 2001. — 19, № 9. — P. 870—875.
8. Dufourmantel N., Pelissier B., Garcon F., Peltier G., Ferrulo J.-M., Tissot G. Generation of fertile transplastomic soybean // Plant Mol. Biol. — 2004. — 55. — P. 479—489.
9. Zubko M., Zubko E., Van Zuilen K., Meyer P., Duy A. Stable transformation of petunia plastids // Transgenic Res. — 2004. — 13. — P. 523—530.
10. Sikdar S.R., Serino G., Chaudhuri S., Maliga P. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Rep. — 1998. — 18. — P. 20—24.
11. Skarjinskaia M., Svab Z., Maliga P. Plastid transformation of *L. fendleri*, an oilseed *Brassicaceae* // Transgenic Res. — 2003. — 12. — P. 115—122.
12. Hou B.-K., Zhou Y.-H., Wan L.-H., Zhang Z.-L., Shen G.-F., Chen Z.-H., Hu Z.-M. Chloroplast transformation in oilseed rape // Transgenic Res. — 2003. — 12. — P. 111—114.
13. Сытник Е.С., Парий А.Ф., Комарницький І.К., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Анализ ядерного и митохондриального геномов у транспластомных растений *Salpiglossis sinuata*, полученных путем переноса трансформированных пластид от гибрида *N. tabacum* (+ *S. sinuata*) // Цитология и генетика. — 2003. — 37, № 5. — С. 3—8.
14. Sytnik E., Komarnytsky I., Gleba Yu., Kuchuk N. Transfer of transformed chloroplasts from *Nicotiana tabacum* to the *Lycium barbarum* plants // Cell Biol. Intern. — 2005. — 29. — P. 71—75.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. — 1962. — 15. — P. 473—497.
16. Zubko M.K., Day A. Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance // Plant J. — 1998. — 15, № 2. — P. 265—71.
17. Нитовская И.А., Околот А.Н., Сидоров В.А. Регенерация растений из мезофильных протопластов *Brassica oleracea* var. *capitata* // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 6. — С. 3—6.
18. Morel G., Wetmore R.H. Fern callus tissue culture // Amer. J. Bot. — 1951. — 38. — P. 141—143.
19. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. — Киев: Наук. думка, 1985. — 132 с.
20. Menczel L., Nagy F., Kiss Z., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: correlation and resistance to *Nicotiana tabacum* plastids // Theor. Appl. Genet. — 1981. — 59. — P. 191—198.
21. Koop H.-U., Steinmuller K., Wagner H., Robler C., Eibl C., Sacher L. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation // Planta. — 1996. — 199. — P. 193—201.
22. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. — 1975. — 126. — P. 105—110.
23. Damm B., Willmitzer L. Regeneration of fertile plants from protoplasts of different *Arabidopsis thaliana* genotypes // Mol. Gen. Genet. — 1988. — 213. — P. 15—20.
24. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. — 1980. — 8. — P. 333—345.
25. Brewer G.J. An introduction to isozyme techniques. — New York; London: Acad. press, 1970. — 230 p.
26. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — Киев: Наук. думка, 1990. — 280 с.
27. Сидоров В.А., Самойлов В.М., Дубинич В.Л. Селекция in vitro цитоплазматических мутантов картофеля // Генетика. — 1990. — 26, № 1. — С. 84—89.
28. Рудас В.А. Получение пластомных хлорофиллдефектных мутантов у видов семейства пасленовых // Цитология и генетика. — 1994. — 28, № 2. — С. 42—48.
29. Нитовская И.А., Околот А.Н., Сидоров В.А. Получение in vitro хлорофиллдефектных растений капусты // Цитология и генетика. — 1996. — 30, № 1. — С. 72—76.
30. Kushnir S., Babiychuk E., Bannicova M., Momot V., Komarnitsky I., Gleba Y. Nucleo-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome // Mol. Gen. Genet. — 1991. — 225, № 5. — P. 225—230.
31. Ратушняк Я.И., Кочевенко А.С., Череп Н.Н., Завгородняя А.В., Латыпов С.А., Глеба Ю.Ю. Аллоплазматическая несовместимость у цибридных растений, обладающих геномом *Lycopersicon esculentum* Mill и плазмагенами *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. // Генетика. — 1995. — 31, № 5. — С. 660—668.
32. 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. — P. 1242—1250.

Надійшла 22.02.06