

Оригинальные работы

УДК 577.21:575.222.7

О.О. ОВЧАРЕНКО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ,
М.М. ЧЕРЕП, Ю.Ю. ГЛЕБА, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

ОТРИМАННЯ МІЖТРИБІНІХ СОМАТИЧНИХ ГІБРИДІВ *BRASSICA JUNCEA* + *ARABIDOPSIS THALIANA* ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ПОВЕДІНКИ ТРАНСГЕННИХ ОЗНАК



Була проведена міжтрибна соматична гібридизація між рослинами дикого типу *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. і трансгенними *A. thaliana* L. Рослини арабідопсису містили гетерологічну систему транспозонів *Spm/dSpm*, несли репортерний ген β-глюкуронідази (*gus*) та селективні гени стійкості до канаміцину (*prt II*) і фосфінотрицину (*bar*). Гібридне походження отриманих рослин було підтверджено за допомогою морфологічного аналізу, гістохімічного виявлення активності *gus* гена, ПЛР-*RFLP*, *RAPD* та аналізу множинних молекулярних форм ферментів. Встановлено, що гетерологічна система транспозонів *Spm/dSpm* здатна функціонувати у гібридних рослинах. В гібридах не відбувалася повної елімінації генетичного матеріалу арабідопсису, а трансгени стабільно підтримувалися.

© О.О. ОВЧАРЕНКО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ,
Н.Н. ЧЕРЕП, Ю.Ю. ГЛЕБА, Н.В. КУЧУК, 2004

Вступ. Соматична гібридизація дозволяє подолати бар'єри несхрещуваності між видами, не сумісними статевим шляхом. В той же час соматичні гібриди між філогенетично віддаленими видами в більшості випадків не мають економічного значення через неможливість регенерації морфологічно нормальніх рослин або їхню стерильність. Родина *Brassicaceae* була однією з небагатьох, де навіть міжтрибні гібриди були частково фертильні [1–4].

До недоліків методу соматичної гібридизації можна віднести практично повне перенесення генетичного матеріалу обох батьків. Це веде до зниження фертильності отриманих симетричних гібридів, переносу певних небажаних генів.

Можливим підходом до переносу обмеженої кількості генетичної інформації є використання транспозуючих елементів, що дозволило б переносити від донора до реципієнта лише певну кількість генів. Відомо, що у віддалених гібридів часто відбувається спонтанна елімінація хромосом одного з батьків [5–8], але при цьому необхідні для дослідника гени можуть бути перенесені транспозуючим елементом в соматичному гібриді від одного геному до іншого.

Brassica juncea та *A. thaliana* належать до різних триб родини *Brassicaceae*. Як один з партнерів у процесі соматичної гібридизації були використані трансгенні рослини *A. thaliana*, що містили гетерологічну систему транспозонів *Spm/dSpm*, несли репортерний ген β-глюкуронідази (*gus*) та селективні гени стійкості до канаміцину (*prt II*) і фосфінотрицину (*bar*). Другим партнером були рослини гірчиці (*Brassica juncea*). В результаті було отримано міжтрибні соматичні гібриди *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana*, досліджено можливість функціонування системи транспозонів *Spm/dSpm* та поведінку трансгенних ознак у міжтрибних гібридіах.

Матеріали та методи. *Рослинний матеріал.* В роботі було використано асептичні рослини дикого типу гірчиці сарептської *B. juncea* (L.) Czern. & Coss. сорту Green in Snow та трансгенні рослини *Arabidopsis thaliana* L. Насіння арабідопсису, трансформованого плазмідою pIC 401 (рис. 1), було люб'язно надано фірмою «Icon Genetics» (GmbH — Halle, Biozentrum, Німеччина).

Виділення протопластів та соматична гібридизація. Протопласти виділяли з гіпокотілів 7-денних проростків гірчиці або з листків

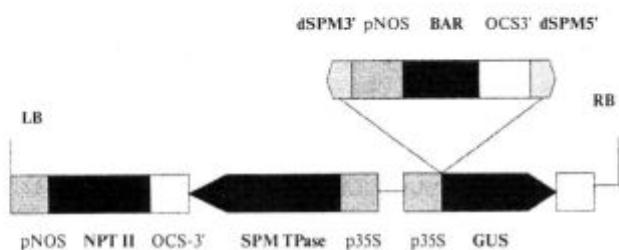


Рис. 1. Схема плазмідного вектора pIC 401, використаного для трансформації *A. thaliana*

21–28-денних рослин гірчиці та арабідопсису. Ферментація тканин проходила протягом 16–18 год у суміші ферментів (0,3 % Onozuka R-10, 0,1 % Driselase, 0,3 % Macerase), розчинених у 0,4 М сахарозі. Очистку протопластів від клітинного дебрису проводили методом флотації в 0,4 М сахарозі з подальшим подвійним відмиванням у сольовому середовищі W5 [9]. Злиття протопластів проводили за модифікованою методикою Менцеля [10]. Протопласти культивували в темряві при 25 °C протягом 7 діб в середовищі SW1 [11]. Після перших поділів до суспензії протопластів додавали рівний об'єм середовища SR (B5 [12] + 0,3 M глюкоза + 0,1 M сахароза + 1 мг/л БАП + 0,1 мг/л НОК). На 21-й день середовище з протопластами розбавляли свіжим SR.

На 28-й день макроколонії переносили на тверде регенераційне середовище FH (B5 + 0,2 М маннітол + 30 г/л сахарози + 1,0 мг/л БАП + 0,1 мг/л НОК + 2,0 мг/л Зеа + 5,0 мг/л фосфінотрицину). Рослини, що регенерували, переносили на середовище B5 з 10 мг/л фосфінотрицину.

Гістохімічне виявлення активності GUS гена. Для виявлення активності GUS гена у рослин, що регенерували, листкові експланти довжиною близько 1 см аналізували за методикою Jefferson [13]. Наявність експресії продукту гена GUS визначали під бінокулярним мікроскопом при збільшенні в 32 рази.

ПЛР-RFLP та RAPD-аналіз гібридних ліній. Тотальну рослинну ДНК виділяли з рослинного матеріалу за методикою Cheung [14].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили, використовуючи ряд праймерів (таблиця), за методикою, прийнятою у нашій лабораторії [15].

Аналіз множинних молекулярних форм ферментів. Для підтвердження гібридної природи отриманих рослин аналізували множинні молекулярні форми ферментів (амілази та естерази) за стандартною методикою [16].

Результати досліджень та їх обговорення. Після злиття рослинні клітини швидко діли-
лись і регенерували. Продукти злиття відбирали
шляхом селекції стійких до фосфінотрицину

Праймери, використані при проведенні ПЛР-аналізів

Код	Праймери
<i>atpB-rbcL</i>	5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3' i 5'-TACAGTTGCCATGTACCAAG-3'
ITS	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' i 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
Мікросателітна ДНК	(TCC)×5
Мікросателітна ДНК	(GACA)×4
RAPD-аналіз	OPA-11 (5'-CAATGCCGT-3'), OPA-12 (5'-TCGGCGATAG-3'), OPA-13 (5'-CAGCACCCAC-3')
<i>gus</i>	5'-TGGGTGGACGATATCACCGTGGTGA-3' i 5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3'
<i>nptII</i>	5'-GAGGCTATTGGCTATGACTG-3' i 5'-CAAGCTTTCAGCAATATCAG-3'
<i>bar</i>	5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAAC-3' i 5'-AGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'
<i>SpmTPase</i>	5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3' i 5'-GCTTTGGGTATGCAGCCTAGTTC-3'

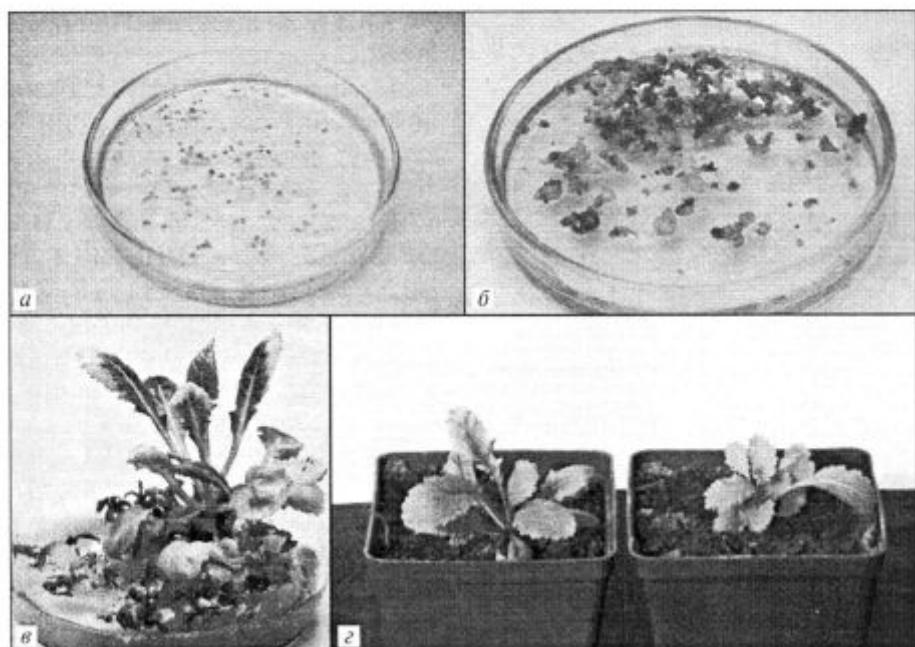


Рис. 2. Етапи отримання гібридних рослин: *а* — макроколонії на селективному середовищі з 5 мг/л фосфінотрицину; *б* — індукція гібридних ембріоїдів; *в* — гібридна рослина у віці 2 міс в культурі *in vitro*; *г* — гібридна рослина, висаджена в ґрунт (ліворуч), та ґречиця *B. juncea* (праворуч)

клонів. Рослини трансгенного *A. thaliana* несуть гени стійкості до канаміцину та фосфінотрицину. Окрім того, на поживному середовищі, яке ми застосовували для культивування, протопласти *A. thaliana* не діляться, а протопласти ґречиці діляться з високою частотою, але погано регенерують рослини, утворюючи коріння замість пагонів. Тому рослини, що регенерували на поживному середовищі з 10 мг/л фосфінотрицину, з великою ймовірністю були гібридними (рис. 2, *a*, *б*).

Всі регенеранти, стійкі до фосфінотрицину, морфологічно відрізнялися від арабідопсису, що дозволяло розглядати їх як гібридні. Хоча при соматичній гібридизації не застосовували методів фізичної або хімічної інактивації протопластів арабідопсису, отримані рослини були подібними до ґречиці (рис. 2, *в*, *г*).

Вектор, який був використаний при трансформації арабідопсису, несе систему на основі *En/Spm* елемента. Модифікований (*dSpm*) елемент містить ген стійкості до фосфінотрицину (*bar*), потрібний для відбору інтеграції Т-ДНК та реінсерції транспозону. *dSpm* знаходить між 35S промотором з вірусу мозаїки цвітної капусти та ATG кодоном гена β-глюкуронідази (*gus*), який стає активним в разі транспозиції елемента.

Стійкі до фосфінотрицину гібриди були проаналізовані для виявлення активності β-глюкуронідази за допомогою гістохімічної реакції. Серед 290 проаналізованих рослин 127 не давали позитивної реакції, тоді як інші 163 давали синє забарвлення, інтенсивність якого та характер розташування забарвлених зон відрізнялися у різних клонах (рис. 3). Рівномірне синє забарвлення в результаті GUS реакції вказує на процес ексації, яка відбулася у меристематичних тканинах на ранніх етапах розвитку гібридної рослини. Наявність специфічного синього забарвлення опосередковано показувала присутність генетичного матеріалу арабідопсису. Серед регенерованих фосфінотрицин-стійких рослин відбирали ті, у яких була відсутня активність β-глюкуронідази, що є можливим свідченням елімінації хромосом *A. thaliana*. Але після проведення ПЛР-аналізу 32 GUS негативних клонів було показано присутність цього гена у досліджених рослинах. Відсутність активності β-глюкуронідази можна пояснити метилюванням *gus* гена, реінсерцією *dSpm* елемента [17] або походженням гібридного клону від клітини *A. thaliana*, в якій був низький рівень експресії *Spm* транспозази, і, як наслідок цього,

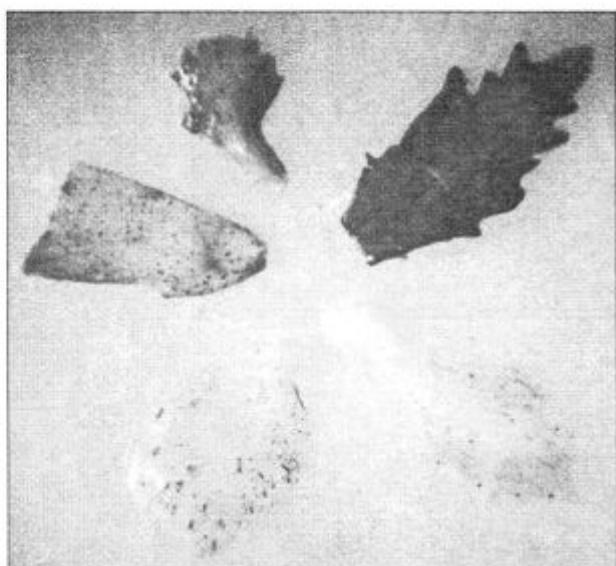


Рис. 3. Гістохімічне виявлення активності β -глюкуронідази у листках гібридів. Показано відмінності у рівні експресії гена

транспозиція *dSpm* елемента не відбувалась взагалі.

Аналіз продуктів ампліфікації тотальної ДНК гібридних ліній з використанням праймерів до генів *bar* (рис. 4) та *prt II* підтвердив їх наявність у гібридних лініях. Досить несподіваними виявилися результати ампліфікації з праймерами до *Spm*-транспозази: у лінії j7 та

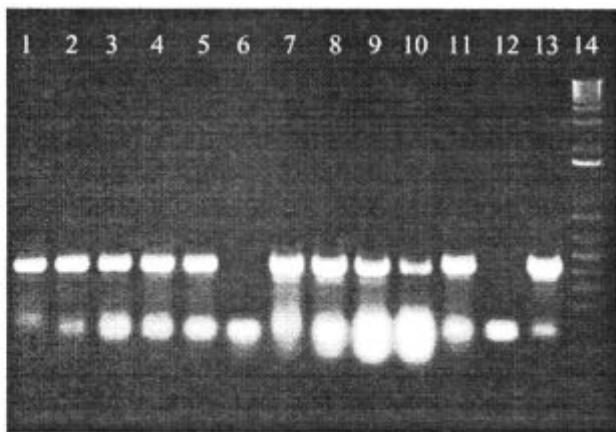


Рис. 4. Аналіз продуктів ампліфікації тотальної ДНК гібридних ліній, що показує наявність гена *bar*: 1–5 та 8–11 — ДНК гібридних ліній j1, j7, j27, j42, j59 та j79, j74, j73, j39 відповідно; 6 — негативний контроль, ДНК *B. juncea*, 7 — позитивний контроль, ДНК арабідопсису, трансформованого плазмідою pIC 401; 12 — негативний контроль, без ДНК, 13 — позитивний контроль, ДНК плазміди pIC 401; 14 — 1 Kb Plus ДНК маркер

j74 вона була відсутня. Причиною цього може бути делеція гена.

Для остаточного підтвердження гібридного походження рослин ряд ліній було відібрано для подальших молекулярно-біологічних досліджень. Аналіз гібридності по ядрі проводили за допомогою RAPD-аналізу із застосуванням ОРА-праймерів, ПЛР-RFLP, праймерів до мікросателітної ДНК та ITS. RAPD (рис. 5) та ITS-аналізи показали наявність ядерного матеріалу як *B. juncea*, так і *A. thaliana*. Продукти ампліфікації при використанні (TCC) \times 5 праймера показали наявність у гібридних рослинах послідовностей ядерної ДНК, характерних лише *B. juncea*. При ампліфікації за допомогою праймера (GACA) \times 4 електрофоретичний спектр ПЛР продуктів лише двох з досліджуваних гібридних ліній цілком відповідав спектру *B. juncea*. Інші досліджені зразки мали меншу, ніж у *B. juncea*, кількість фрагментів ампліфікованої ДНК, але більшу, ніж у *A. thaliana*.

Походження пластома визначали за допомогою рестриктного аналізу спейсерної ділянки між генами *atpB* — *rbcL*. Cla I гідроліз показав, що хлоропластний геном гібридів походить від *B. juncea*.

Додатково 38 гібридних ліній було проаналізовано за допомогою ізоферментного аналізу. Ізозимний спектр естераз (рис. 6) показав наявність у всіх гібридних лініях на фоні спектра, характерного для гірчиці, зон активності ферментів, що походили від арабідопсису. Ізозимний спектр амілази показав наявність у 20 гіб-

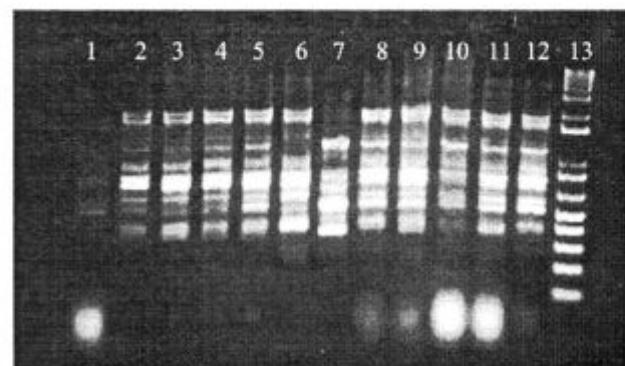


Рис. 5. Визначення ядерного геному за допомогою RAPD-аналізу з використанням праймерів ОРА: 6 — *B. juncea* та 7 — *A. thaliana*; 1–5, 8–12 — гібридні лінії j74, j1, j7, j27, j42 та j59, j73, j39, j7 відповідно; 13 — 1 Kb Plus ДНК маркер

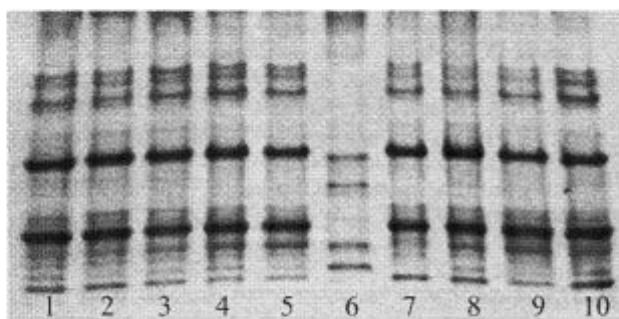


Рис. 6. Ізозимний спектр естеразі гібридних ліній j187, j14, j104, j100, j18 (1–5), j39, j73, j56 (8–10), *A. thaliana* (6) і *B. juncea* (7)

рилів специфічних для *A. thaliana* зон активності фермента, однак активність цих ізоформ була набагато нижчою, ніж у арабідопсису, одна (j100) лінія мала додаткову, не характерну для обох батьків полосу, а ще 17 ліній мали спектр амілази, подібний до *B. juncea*.

Наші дослідження показали, що продукти злиття *B. juncea* та *A. thaliana* здатні до морфогенезу та утворення функціонально асиметричного потомства. Гетерологічна система транспозонів *Spm/dSpm* проявляє активність у гібридних рослинах, хоча в деяких лініях активність (експресія) β -глюкуронідази була відсутня. В отриманих гібридних рослинах трансгени стабільно підтримувалися разом з частиною генетичного матеріалу арабідопсису. Нам не вдалося виявити серед них рослини, які втратили хромосоми арабідопсису з сайтом інтеграції трансгенів, на що опосередковано вказувала присутність генів *nptII*, *Spm*-ази та *gus*. Таким чином, неможливо точно довести наявність сайта реінсерції *bar* гена в геном гірчиці. Відібрати рослини, які несуть інтегрований в хромосоми гірчиці *dSpm* елемент з *bar* геном, можна при розходженні хромосом гірчиці та арабідопсису в різні гамети у мейозі.

SUMMARY. Intertribal somatic hybridization between wild type *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. and transgenic *A. thaliana* L. has been carried out. Genome of *A. thaliana* plants contained heterologous transposable element *Spm/dSpm*, reporter GUS gene, selective genes for kanamycin- (*npt II*) and phosphinothricin (*bar*) resistance. Hybrid nature of obtained plants was confirmed with their morphology, GUS histochemical assay, PCR-RFLP, RAPD and isozyme analyses. It was determined that heterologous transposable element *Spm/dSpm* is able to function in hybrid plants. There was no complete elimination

of *A. thaliana* genetic material in the hybrids and the transgenes were stably maintained.

РЕЗЮМЕ. Проведена межтрибная соматическая гибридизация между растениями дикого типа *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. и трансгенными *A. thaliana* L. Растения арабидопсиса содержали гетерологическую систему транспозонов *Spm/dSpm*, несли репортерный ген β -глюкуронидазы (*gus*) и селективные гены устойчивости к канамицину (*npt II*) и фосфинотрицину (*bar*). Гибридное происхождение полученных растений было подтверждено с помощью морфологического анализа, гистохимического определения активности *gus* гена, ПЛР-РФЛП, РАПД и анализа множественных молекулярных форм ферментов. Установлено, что гетерологическая система транспозонов *Spm/dSpm* способна функционировать в гибридных растениях. В гибридах не происходило полной елиминации генетического материала арабидопсиса, а трансгены стабильно поддерживались.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Forsberg J., Landgren M., Glimelius K. Fertile somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. — 1994. — 95. — P. 213–223.
2. Fahleson J., Eriksson I., Landgren M., Stymne S., Glimelius K. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Thlaspi perfoliatum* with high content of the *T. perfoliatum*-specific nervonic acid // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 87, № 7. — P. 795–804.
3. Skarzhinskaya M., Landgren M., Glimelius K. Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats // Theor. Appl. Genet. — 1996. — 93, № 8. — P. 1242–1250.
4. Gleba D., Borisjuk N.V., Borisjuk L.G., Kneer R., Poulev A., Skarzhinskaya M., Dushenkov S., Logendra S., Gleba Y.Y., Raskin I. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — 96. — P. 5973–5977.
5. Sundberg E., Glimelius K. Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae* // Theor. Appl. Genet. — 1991. — 83. — P. 81–88.
6. Babiychuk E., Kushnir S., Gleba Y.Y. Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna* L. // Theor. Appl. Genet. — 1992. — 84. — P. 87–91.
7. Tabaeizadeh Z., Perennes C., Bergounioux C. Increasing the variability of *Lycopersicon peruvianum* Mill. by protoplast fusion with *Petunia hybrida* L. // Plant Cell Rep. — 1985. — 4, № 1. — P. 7–11.
8. Turpin C. Attempt of male cytoplasmic sterility introduction by intergeneric fusion in cultivated tomato // Acta Hort. — 1986. — 191. — P. 377–379.
9. Medgyesy P., Menczel L., Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer

- from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris* and isolation of their somatic hybrids // Mol. Gen. Genet. — 1980. — **179**, № 3. — P. 693–698.
10. Menczel L., Nagy F., Kiss Z.R., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastids // Theor. Appl. Genet. — 1981. — **59**. — P. 191–195.
 11. Sidorov V.A., Zubko M.K., Kuchko A.A. Somatic hybridization in potato: use of gamma-irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* in genetic reconstruction // Theor. Appl. Genet. — 1987. — **74**, № 3. — P. 364–368.
 12. Gamborg O.L., Miller L.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell Res. — 1968. — **50**, № 1. — P. 151–158.
 13. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol. Biol. Report. — 1987. — **5**. — P. 387–405.
 14. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // PCR Meths. Appl. — 1993. — **3**. — P. 69–70.
 15. Сахно Л.А., Ситник Е.С., Череп Н.Н., Комарницький І.К., Кучук Н.В., Климюк В.І. Активність системи Spm транспозонові кукурудзи у трансгенних растеній *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Shultz, отриманих путем як прямого переноса ДНК в протопласти, так і агробактеріальної трансформації корневих експлантов // Цитологія і генетика. — 2002. — **36**, № 6. — С. 3–8.
 16. Борисюк Н.В., Климюк В.І., Пароконний А.С., Самойлов А.М., Череп Н.Н., Шаховський А.М., Шлумуков Л.Р. Біохімічний аналіз в клеточній інженерії растеній. — Київ, 1988. — 49 с. — (Препринт / АН УССР, Інститут ботаніки; 88.1).
 17. Tissier A.F., Marillonnet S., Klimyuk V., Patel K., Torres M.A., Murphy G., Jones J.D.G. Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in *Arabidopsis*: A tool for functional genomics // Plant Cell. — 1999. — **11**, № 10. — P. 1841–1852.

Надійшла 02.02.04