

12. *Genetic analysis of revertants for the nitrate reductase function of Nicotiana plumbaginifolia* / R. Dirks, L. Negrutiu, M. Heinderyck, M. Jacobs // *Mol. and Gen. Genet.*— 1986.— 202, N 2.— P. 309—311.
13. *Negrutiu I., Dirks R., Jacobs M. Regeneration of fully nitrate reductase deficient mutants from protoplasts culture of Nicotiana plumbaginifolia (Viviani)* // *Theor. and Appl. Genet.*— 1983.— 66, N 4.— P. 341—347.
14. *Fusion of plant protoplasts: A study using auxotrophic mutants of Nicotiana plumbaginifolia* / I. Negrutiu, D. de Brower, S. W. Watts et al. // *Ibid.*— 1986.— 72, N 2.— P. 279—286.
15. *Nitrate reductase deficient cell lines from haploid protoplast cultures of Nicotiana plumbaginifolia* / L. Marton, T. M. Dung, R. R. Mendel, P. Maliga // *Mol. and Gen. Genet.*— 1982.— 182, N 2.— P. 301—304.
16. *A BamHI family of highly repeated DNA sequences of Nicotiana tabacum* / B. Koukalova, J. Reich, R. Matyasek et al. // *Theor. and Appl. Genet.*— 1989.— 78, N 1.— P. 77—80.
17. *Della Porta S. L., Wood J., Hicks J. B. A plant DNA miniprep: Version II* // *Plant Mol. Biol. Repts.*— 1983.— 4, N 1.— P. 19—21.
18. *Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis* // *J. Mol. Biol.*— 1975.— 98, N 1.— P. 503—518.
19. *Intragenetic asymmetric hybrids between Nicotiana plumbaginifolia and Nicotiana sylvestris obtained by «gamma-fusion»* / I. Famelaer, Y. Y. Gleba, V. A. Sidorov et al. // *Plant Sci.*— 1989.— 61, N 1.— P. 105—117.
20. *Asymmetric hybridization in Nicotiana by «gamma-fusion» and progeny analysis of self-fertile hybrids* / I. Famelaer, I. Negrutiu, A. Mouras et al. // *Theor. and Appl. Genet.*— 1990.— 79, N 4.— P. 513—520.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91

УДК 575.143

Л. А. Сахно, Н. Н. Череп, М. В. Скаржинская, Ю. Ю. Глеба

СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ В РОДЕ BRASSICA: ПОЛУЧЕНИЕ ГИБРИДОВ МЕЖДУ РАПСОМ (BRASSICA NAPUS L.) И ГОРЧИЦЕЙ ЧЕРНОЙ (BRASSICA NIGRA L.)

Методом соматической гибридизации гипокотильных протопластов V. napus и мезофильных V. nigra с применением двойной инактивации получены три клона растений-регенерантов, объединяющих в себе три генома Brassica (A, B, C). Гибридность ядра подтверждается биохимическим (множественные молекулярные формы амилаз эстераз и аспаргатаминотрансфераз) и морфолого-физиологическим анализами. Исследования рестриктов хлоропластной ДНК показало наличие у клонов растений пластома рапса. Полученные гибриды рапс+горчица представляют интерес в плане изучения межгеномного взаимодействия в пределах рода Brassica, а также имеют практическую ценность как исходный материал для селекции.

Введение. Семейство *Brassicaceae* объединяет более 3000 видов растений, среди них такие ценные сельскохозяйственные культуры, как рапс *V. napus* и горчица черная *V. nigra*. Род *Brassica* характеризуется наличием трех типов геномов — A, B, C, причем *V. napus* имеет геном AC, *V. nigra* — геном B [1]. Объединение трех геномов в одном растении интересно с точки зрения межгеномного взаимодействия. Кроме того, у горчицы черной обнаружена полная устойчивость к широко распространенному заболеванию черная ножка, вызываемому *Phoma lingam* [2]. Поэтому гибридные растения могут оказаться полезными и с практической точки зрения, что и подтверждено исследованиями Сакристан с соавт. [3] и Шедин и Глимелнус [4]. В данной работе предпринята попытка получения соматических гибридов *V. napus* и *V. nigra* на основе некоторых сортов рапса отечественной селекции.

Материалы и методы. В качестве исходного материала использовали семена рапса сорта Марьяновский (Украинская сельскохозяйственная академия) и горчицы черной К-2656 (Канада). Гипокотильные

© Л. А. САХНО, Н. Н. ЧЕРЕП, М. В. СКАРЖИНСКАЯ, Ю. Ю. ГЛЕБА, 1991

протопласты получали из 3—5-дневных этиолированных проростков *V. napus* по методике, принятой в нашей лаборатории [5]. Мезофильные протопласты выделяли при ферментировании листьев асептически выращиваемых растений *V. nigra* [6]. Перед слиянием проводили двойную инактивацию протопластов [7]: гипокотильные обрабатывали 10 мМ раствором йодацетамида 20 мин при 4 °С, мезофильные — гамма-облучением дозой 500 Гр (источник — Co^{60} , 0,1 Гр/с). Слияние осуществляли по методике Менцеля с соавт. [8]. Продукты слияния культивировали в условиях, близких для изолированных гипокотильных протопластов [5]. Регенерацию достигали на среде NB2 [9]. Растения-регенеранты выращивали на безгормональной среде MS [10], затем в почве в условиях теплицы. У полученных регенерантов анализировали морфологию, изоферментный состав (множественные молекулярные формы амилаз, эстераз и аспартаминотрансфераз) и рестрикты хлДНК. Белки подвергали электрофоретическому фракционированию в 75 %-ном полиакриламидном геле (ПААГ) [11]. Ферменты выявляли общепринятым методом [12]. Анализ хлДНК проводили по ранее описанной методике [13] с небольшими модификациями.

Результаты и обсуждение. При отборе продуктов слияния *V. napus* и *V. nigra* использовали двойную инактивацию родительских протопластов. Йодацетамид подавлял деление гипокотильных протопластов рапса, оставляя их жизнеспособными в течение 24—36 ч, тогда как в норме они активно делились уже в первые сутки культивирования. Мезофильные протопласты *V. nigra* в используемой среде демонстрировали единичные деления, для их инактивации применяли гамма-облучение. В ходе экспериментов получены 138 каллусных клонов, шесть из которых регенерировали. Растения-регенеранты были морфологически нормальными, хорошо укоренялись и были высажены в почву в условиях теплицы. Фенотипически они либо близки к *V. napus* (линии *6Bng11*, *6Bng23*, *6Bng27*), либо занимали промежуточное положение (*6Bng4*, *6Bng6*, *6Bng19*). Листовая пластинка горчицы черной в культуре имеет ланцетовидную форму, гладкий край, характерные прилистники. Лист рапса округлой формы, зубчатый, без прилистников, листовая пластинка в 2—3 раза крупнее по сравнению с таковой у горчицы. Регенерировавшие растения имели листья, по величине соразмерные с рапсом, однако форма стала более близкой к *V. nigra*, появились прилистники, зубчатость края сохранилась, хотя значительно меньше выраженная. Морфология листовой пластинки родительских форм и линии *6Bng4* представлена на рис. 1. Следует отметить, что все регенеранты проявляли ярко выраженные гетерозисные свойства: ускоренный и мощный рост, более интенсивную зеленую окраску листьев по сравнению с исходными формами, что может быть обусловлено как их гибридной природой, так и условиями культивирования *in vitro*. При асептическом выращивании растения горчицы цвели при 16-ч фотопериоде, растения рапса и гибридные не зацветали. Высаженные в почву регенеранты цвели, образовывали фертильную пыльцу и дали семена при самоопылении.

Для характеристики полученных растений-регенерантов исследовали их изоферментную активность. На рис. 2 приведены результаты анализа множественных молекулярных форм ферментов растений, полученных после слияния протопластов, и их родительских форм (*a* — амилазы; *b* — эстеразы; *в* — аспартаминотрансферазы; *Vn* — *V. napus*; *Bng* — *V. nigra*; цифры — исследуемые клоны). Три линии —



Рис. 1

6*Bng*4, 6*Bng*6 и 6*Bng*19 обладали формами исследуемых ферментов, характерными для обоих родительских видов. Подобные результаты получены в работах по гибридизации *B. oleracea* и *B. campestris* [14,

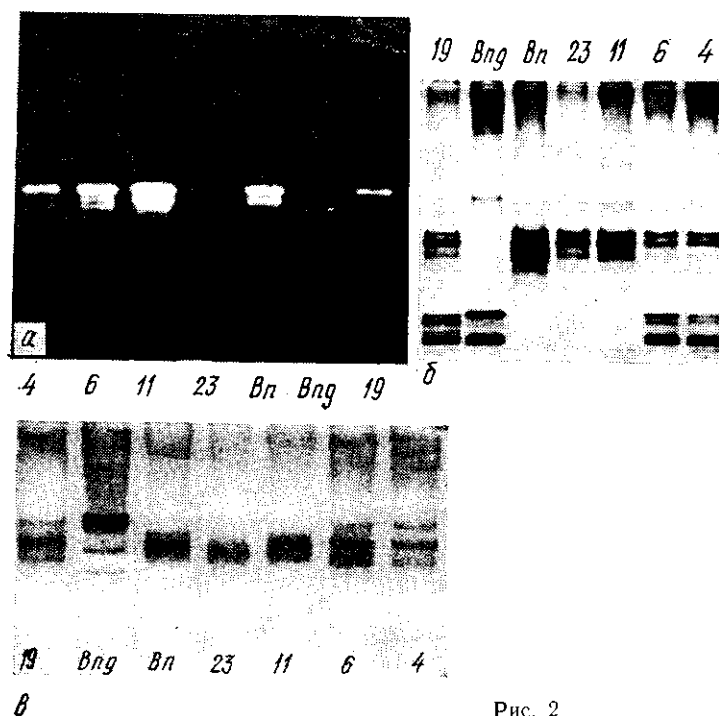


Рис. 2

15]. Три линии растений-регенерантов (6*Bng*11, 6*Bng*23, 6*Bng*27) по исследуемым характеристикам напоминали исходный рапс, но отличались от него интенсивностью полос изоферментов, что может являться

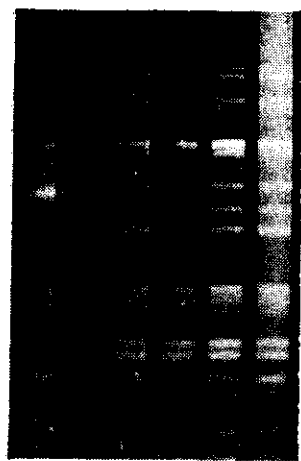


Рис. 3

следствием соматональной вариативности в культуре *in vivo* [16] либо результатом облучения родительских протопластов горчицы [15]. Исследование хлДНК выявило наличие у исследуемых клонов растений хлДНК, характерной для *B. napus* (рис. 3: рестриктивный анализ хлДНК ферментом *Bam*HI растений, полученных в результате слияния протопластов, и их родительских форм; обозначения, как на рис. 2). Шедин и Глимелиус предположили, что подобный результат может быть вызван несовместимостью цитоплазматических генетических детерминант, вследствие чего происходит селективная сегрегация пластома одного из родителей. Нельзя исключить и влияния на этот процесс условий культивирования, при которых протопласты партнера-«сегреганта» не делятся.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что по крайней мере три из проанализированных клонов растений-регенерантов (6*Bng*4, 6*Bng*6, 6*Bng*19) являются соматическими гибридами между *B. napus* и *B. nigra*, несущими геномы (или части их) обоих родителей, гены цитоплазмы у гибридных растений происходят от рапса. Таким образом, синтезированные методами клеточной инженерии растения имеют комбинации генов, которые невозможно получить с помощью полового скрещивания. Такие растения могут представлять практическую ценность и являются исходным материалом для селекции.

Резюме

Методом соматичної гібридизації гіпокотильних протопластів *B. napus* і мезофільних *B. nigra* із застосуванням подвійної інактивації одержано три клони рослин-регенерантів, що об'єднують в собі три геноми *Brassica* (A, B, C). Гібридність ядра підтверджується біохімічним (множинні молекулярні форми амілаз, естераз і аспартатамінотрансфераз) та морфолого-фізіологічним аналізами. Дослідження рестриктів хлоропластної ДНК виявило наявність у клонів рослин пластоми ріпака. Одержані гібриди ріпак+гірчичя викликають інтерес в плані вивчення міжгеномної взаємодії в межах роду *Brassica*, а також мають практичну цінність як вихідний матеріал для селекції.

Синшпагу

By using of the method of somatic hybridization with double inactivation of hypocotyl protoplasts of *B. napus* and mesophyll protoplasts of *B. nigra* were obtained 3 clones of hybrid plants. Genetic novelty of regenerants was shown by study of morphology, physiology, isozymes (esterase, amylase, aspartataminotransferase), chloroplast DNAs. Obtained hybrid plants may be treated by practical selection.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. UN. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode to fertilization // Jap. J. Bot.—1935.—7, N 3.—P. 389—452.
2. Sjodin C., Glimelius K. Screening for resistance to blackleg *Phoma lingam* (*Tode ex Fr.*) *Desm.* within *Brassicaceae* // J. Phytopathol.—1988.—123, N 3.—P. 322—332.
3. Sacristan M. D., Gerdemann-Knorck M., Schieder O. Incorporation of hydromycin resistance in *Brassica nigra* and its transfer to *B. napus* through asymmetric protoplast fusion // Theor. and Appl. Genet.—1989.—78, N 2.—P. 194—200.
4. Sjodin C., Glimelius K. *Brassica naponigra*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam* // Ibid.—77, N 5.—P. 651—656.
5. Сахно Л. А., Скаржинская М. В. Регенерация растений из изолированных протопластов *Brassica* // Физиология растений.—1990.—37, № 1.—С. 188—192.
6. Kohlenbach H. W., Wenzel G., Hoffmann F. Regeneration of *Brassica napus* plantlets in cultures from isolated protoplasts of haploid stem embryos as compared with leaf protoplasts // Z. Pflanzenphysiol.—1982.—105, N 2.—P. 131—142.
7. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodacetate treated protoplasts / V. A. Sidorov, L. Menczel, F. Nagy, P. Maliga // Planta.—1981.—152, N 2.—P. 341—345.
8. Effect of radiation dosage on efficiency of chloroplast transfer by protoplast fusion in *Nicotiana* / L. Menczel, G. Galiba, F. Nagy, P. Maliga // Genetics.—1982.—100.—P. 487—495.
9. Toriyama K., Hinata K., Kameya T. Production somatic hybrid plants «*Brassicomorica*» through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea* // Plant Sci.—1987.—48, N 2.—P. 123—128.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.—1962.—15, N 2.—P. 473—479.
11. Maurer H. R. Disk electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.—Berlin: Walter de Gruyter, 1976.—187 p.
12. Brewer G. Y. An introduction to isozyme techniques.—New York: Acad. press, 1970.—230 p.
13. Bookjans G., Stummann B. M., Henningsen K. W. Preparation of chloroplast DNA from pea plastids isolated in a medium of high ionic strength // Anal. Biochem.—1984.—141, N 2.—P. 244—247.
14. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability / R. Terada, J. Yamashita, S. Nishibayashi, K. Shimamoto // Theor. and Appl. Genet.—1987.—73, N 3.—P. 379—384.
15. Asymmetric somatic hybrids of *Brassica*: partial transfer of *B. campestris* genome into *B. oleracea* by cell fusion / Y. Yamashita, R. Terada, S. Nishibayashi, K. Shimamoto // Ibid.—1989.—77, N 2.—P. 189—194.
16. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Ibid.—1981.—60, N 1.—P. 197—214.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Київ

Получено 14.01.91