

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

на правах рукопису

КИРИЧЕНКО Ігор Володимирович

УДК 575.082.261:575.082.263:576.085.2

ГЕНЕТИЧНА РЕКОНСТРУКЦІЯ РОСЛИННОЇ КЛІТИНИ
ЗА ДОПОМОГОЮ МІКРОМАНІПУЛЯЦІЙ

03.00.15 - Генетика

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
дисертації на здобуття вченого ступеню
кандидата біологічних наук

Київ - 1994



00756359 (Z)

Робота виконана у відділі цитофізіології і клітинної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Науковий керівник - академік НАН України, доктор біологічних наук, професор
ГЛЕБА Ю. Ю.

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук
Б. А. ЛЕВЕНКО

кандидат біологічних наук
Г. П. ПЕТЮХ

Провідна організація - Інститут молекулярної біології і генетики НАН України

Захист відбудеться "29" грудня 1994 р. о 10 год. на засіданні спеціалізованої ради Д. 01.19.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. акад. Заболотного, 148.

Автореферат розіслано "28" листопада 1994 г.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
кандидат біологічних наук

Л. В. Малишева

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Методи експериментальних маніпуляцій з рослинними клітинами розраховані головним чином на роботу з клітинними популяціями. Робота з великими кількостями клітин дозволяє сподіватися на успіх навіть при низькій імовірності бажаної генетичної події, але вносить невизначеність в початкові умови досліду. Наприклад, при отриманні соматичних гібридів шляхом масового злиття протопластів, при якому визначення складу продуктів злиття відбувається імовірно, невідома напевне початкова генетична конституція продуктів злиття і, зокрема, скільки і яких батьківських протопластів приймало в ньому участь. Тому такі "масові" підходи дозволяють отримати відомості лише про кінцевий стан експериментального об'єкту при неповній чи недостатній інформації про його початковий стан. На відміну від них, мікрomanipуляції з одиничними клітинами та їх фрагментами дають можливість точно задавати склад клітинної системи, що реконструюється, стежити за її розвитком, отримувати точніші дані і правильніше їх інтерпретувати.

Спостереження за індивідуальними клітинами дозволяють краще оцінювати реакцію клітин на експериментальні впливи. Це дає змогу створювати досконаліші і ефективніші експериментальні методи.

Таким чином, маніпулювання з індивідуальними протопластами і клітинами рослин - це вельми перспективна область клітинної інженерії, що може знайти застосування як у фундаментальних, так і в прикладних галузях генетичної інженерії і біотехнології рослин, доповнюючи існуючі методичні підходи.

Мета і задачі дослідження. Мета даної роботи полягала у проведенні направленої генетичної реконструкції рослинної клітини за допомогою мікрomanipуляцій. Для досягнення цієї мети було необхідно вирішити такі задачі:

1. Розробити методи індивідуального культивування протопластів модельних видів (*Nicotiana*).
2. Адаптувати процедуру для ряду інших видів рослин.
3. Розробити методи електричного і хімічного злиття індивідуальних преселектованих протопластів модельних видів рослин та отримання рослин з одиничних продуктів злиття.
4. Адаптувати процедуру для ряду інших видів рослин.
5. Провести морфологічний, цитологічний та біохімічний аналіз отриманих рослин.

Наукова новизна роботи. Створено методи індивідуального культивування протопластів рослин. Протопласти тютюну (*Nicotiana tabacum*), ріпаку (*Brassica napus*), капусти (*B. chinensis*), сої (*Glycine max*), люцерни (*Medicago sativa*), гороху (*Pisum sativum*), картоплі (*Solanum tuberosum*), конюшини (*Trifolium pratense*) були індивідуально культивовані до стадії мікроколонії, з них шість останніх - вперше. Було створено методи електричного і вперше - хімічного злиття індивідуальних преселектованих протопластів в мікрокраплях під шаром олії. Вперше були проведені хімічні злиття індивідуальних преселектованих протопластів *B. napus* X *B. campestris*, *B. napus* X *B. napus*, *Lycium barbarum* X *Lycopersicon peruvianum*, *N. tabacum* X *N. tabacum*, *N. tabacum* X *Rauwolfia serpentina*, *N. tabacum* X *S. tuberosum*, *R. serpentina* X *Vinca minor*, *S. tuberosum* X *S. pinnatisectum*. Вперше було проведене високоефективне хімічне злиття одночасно трьох видів індивідуальних преселектованих рослинних протопластів

(*N. tabacum* X *R. serpentina* X *Rhazya stricta*). Вперше (за виключенням *N. tabacum* X *N. tabacum* і *B. napus* X *B. napus*) були проведені електричні злиття індивідуальних преселектованих протопластів *B. napus* X *B. napus*, *B. napus* X *Solanum nigrum*, *B. napus* X *B. nigra*, *Lycopersicon esculentum* X *L. esculentum*, *N. tabacum* X *N. tabacum*, *N. tabacum* X *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* X *N. plumbaginifolia* (цитопласти), *N. plumbaginifolia* X *N. plumbaginifolia*, *N. sylvestris* X *N. plumbaginifolia*, *N. tabacum* X *Antirrhinum majus*, *N. tabacum* X *Atropa belladonna*, *N. tabacum* X *R. serpentina*, *R. serpentina* X *Catharanthus roseus*, (*N. tabacum* X *Scopolia carniolica*) X *N. tabacum* (цитопласти), (*N. tabacum* X *Scopolia carniolica*) X *N. tabacum*. Вперше були отримані рослини з продуктів внутріклонового електрозлиття індивідуальних преселектованих протопластів *N. tabacum*, а також комбінацій *N. tabacum* X *N. plumbaginifolia*, *N. plumbaginifolia* X *N. plumbaginifolia*, *N. plumbaginifolia* X *N. langsdorffii*. Показана значна як міжклонова, так і внутріклонова мінливість отриманих рослин по морфології і числу хромосом. При цьому більша різниця в морфології рослин в загальному випадку відповідала більшій відмінності в числі хромосом. Показано також мінливість отриманих рослин по ізоферментних маркерах.

Практична цінність. Показано можливість індивідуального культивування протопластів ряду сільськогосподарськи важливих видів рослин (тютюну, ріпаку, капусти, сої, люцерни, гороху, картоплі, конюшини), високоефективного (до 95%) хімічного і електричного злиття індивідуальних преселектованих протопластів і цитопластів ряду сільськогосподарськи важливих і лікарських видів рослин. Створені методи індивідуального культивування протопластів і клітин рослин.

хімічного і електричного злиття індивідуальних преселектованих протопластів, а також отримані докази значної хромосомної і морфологічної мінливості дослин, отриманих з продуктів міжвидового, внутривидового и внутріклонового злиття можуть мати значення як для фундаментальних, так і прикладних галузей клітинної інженерії рослин.

Апробація роботи. Деякі положення дисертації було викладено на Міжнародній конференції з клітинної інженерії рослин (Паланга, 1989 р.). Основні положення дисертації було представлено на Міжнародному симпозиумі "Біотехнологія рослин та генетична інженерія" (Київ, 1994 р.).

Публікації. По матеріалах дисертації опубліковано 13 друкованих робіт.

Структура і об'єм роботи. Дисертацію викладено на 152 сторінках машинописного тексту. Вона складається із вступу, 4 розділів, заключення, висновків і списку цитованої літератури, включає 13 таблиць та 13 малюнків. Список літератури містить 226 бібліографічних посилань, з яких 215 - іноземні.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Рослини тютюну *Nicotiana tabacum* (L.) та *N. plumbaginifolia* (Viv.) та інших видів, що використовувалися як дослідні об'єкти, асептично вирощували за стандартними методиками на агаризованому середовищі MC (Murashige and Skoog, 1962). Протопласти виділяли за стандартними методиками, при цьому користувалися двома видами ферментних сумішей: Ф_к-2 і ФС-2К, котрі були створені на основі композиції Chupeau et al., 1974. Склад ферментної суміші Ф_к-2: Macerozyme R 10 (Serva, ФРН) - 20 мг, Onozuka R 10 (Serva,

ФРН) - 100 мг, Driselase (Sigma, США) - 50 мг, сахароза х.ч. - 17.100 мг $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ х.ч. - 100 мг, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ х.ч. - 100 мг, вода (бідистильована чи деіонізована) - до 100 мл, рН не доводили, стерилізація фільтруванням, зберігати при 4°C не більше місяця чи довший час при -20°C . ФС-2К являє собою Φ_r-2 з підвищеним у чотири рази вмістом ферментів, очищену на Sephadex-G25 (coarse, Pharmacia, Швеція).

Для нанесення мікрокрапель на дно пластикових чашок Петрі їх поверхню обробляли, а властивості культуральних середовищ модифікували. Обробку поверхні чашки Петрі найчастіше проводили водяною парою, для чого після внесення в чашку крапель середовища для культивування і/чи розчинів для хімічного чи електричного злиття, чашку на 3-5 хвилин закривали кришкою. Властивості культуральних середовищ модифікували додаванням до них бичачого сироваткового альбуміну (БСА) (V Фракція, Serva, ФРН) в концентрації 0,005-1% в залежності від середовища і виду протопластів.

Вазелінову олію для індивідуального культивування промивали бідистильованою водою, після чого насичували культуральним середовищем.

Індивідуальне культивування. Мікроманіпуляції над протопластами проводили за допомогою мікропіпеток з внутрішнім діаметром кінчика біля 100 мкм, виготовлених на мікрокузні МЗ-4 (п/о Черноголовка) з капілярів молібденового скла діаметром 1,5 мм. Мікропіпетку закріплювали на голівці маніпулятора фон Брюнна з комплекту мікроманіпуляторів КМ-2 (п/о Черноголовка), і з'єднували тefлоновим шлангом діаметром 2 мм з мікросприцем на 50 мкл. Шприц і шланг були заповнені аптечною вазеліною олією. Голівка маніпулятора прикріплювалася до столика інвертованого мікроскопа

Reichert-Jung Microstar (США).

Індивідуальне культивування проводили в пластикових чашках Петрі діаметром 40 мм. Спочатку в чашку вносили 2 краплі середовища для індивідуального культивування об'ємом 100-200 мкл, потім чашку накривали кришкою на 2-3 хв, після чого заповнювали олією доти, поки під шаром олії не зникали верхівки крапель. В одну з крапель вносили суспензію протопластів, а інша служила джерелом чистого середовища для нанесення мікрокрапель. Краплі середовищ для зміни в ході культивування вміщували в цю ж чашку.

Мікрокраплі наносили за допомогою мікропіпетки і мікрошприца на дно чашки Петрі. Нанесення 40-50 мікрокрапель тривало 15-20 хв. Після цього по мікрокраплях з великої краплі з суспензією розсаджували протопласти, що тривало ще 15-20 хв. Після розсаджування протопластів чашку Петрі вміщували у вологу камеру і інкубували в термостаті в темряві. Отримані мікроколонії регенерували за стандартними методиками.

Додавання середовища мікроколоніям. Розрахунок додавання середовища проводили за формулою (з Шмальгаузен, 1932, модифіковане): $V = V_0 e^{ct}$, де V - об'єм мікрокраплі, V_0 - початковий об'єм мікрокраплі, c - постійна швидкості росту, T - час.

Як V_0 був прийнятий об'єм 46,23 нл - середнє значення початкового об'єму мікрокрапель найуспішніших дослідів.

При додаванні середовища для культивування синхронно з ростом і поділом клітин $V = 2V_0$ за час подвоєння об'єму клітини t . Тоді справедливе $2V_0 = V_0 e^{ct}$, звідки після простих перетворень отримуємо $c = (\ln 2)/t$.

Для об'єктів, що використовувалися в досліді, t прий-

мали рівним 3 добам. Середовище до мікрокрапель додавали за допомогою мікропіпетки і мікроаплікатора (Microapplicator M. ISCO, США) кожні три-п'ять днів.

Для хімічного злиття використовували такі розчини. Сполучення 1. Розчин ПЕГ (поліетиленгліколю): глюкоза - 200,0 мг, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 15,0 мг, KH_2PO_4 - 1,0 мг, ПЕГ 6000 - 5000,0 мг, вода до 10 мл. рН не доводили. Стерилізували автоклавуванням. Натрій-гліциновий буфер: гліцин - 760,0 мг, вода - 100,0 мл, 0,1 N NaOH - до рН 10,5 чи 12,5, вода до 200 мл. Зберігали в пластиковому посуді при 4°C, стерилізували в пластиковому посуді безпосередньо перед дослідом. Розчин ДМСО: диметилсульфоксид (ДМСО) - 2,0 мл, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 266,0 мг, глюкоза - 1200,0 мг, вода до 20 мл, рН не доводили. Стерилізували автоклавуванням. Перед застосуванням розчини натрій-гліцинового буферу і ДМСО змішували в співвідношенні 1:1. Середовище W-5A, мг/л: NaCl - 9000, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 18400, KCl - 800, глюкоза - 1000, BSA - 100, рН 5,6, стерилізували фільтруванням. W-5 - те ж, без BSA.

Сполучення 2. Розчин ПЕГ: ПЕГ 6000 - 3000 мг, глюкоза - 594 мг, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 100 мг, вода до 10 мл, рН не доводили, стерилізували автоклавуванням. Розчин А: глюкоза - 9,9 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 1,0 г, ДМСО - 10,0 мл, вода до 100 мл, рН не доводили, стерилізували автоклавуванням. Розчин В: 0,1 N KOH - 8,0 мл, гліцин - 225,0 мг, вода до 10 мл, доводили рН до 10,5 свіжим 1N KOH, стерилізували фільтруванням. До використання розчини А і В зберігали замороженими, перед вживанням змішували в співвідношенні А:В=9:1.

Краплі вказаних розчинів і середовища для культивування об'ємом біля 100 мкл наносили на дно 40-мм пластикової чашки Петрі ближче до країв. Потім в чашку наливали очищену олію

доти, доки її шар не покривав верхівки крапель. Власне злиття проводили в мікрокраплях, розташованих у вільній центральній частині чашки. Перед додаванням розчину ПЕГ протопласти приводили в контакт, котрий підтримували і під час додавання, належним чином направляючи струмінь розчину з мікропіпетки. Краплі розчинів ДМСО і натрій-гліцинового буферу змішували в окремій краплі безпосередньо перед додаванням до мікрокрапель із протопластами, що їх зливали. Для збирання використаних після відмивки розчинів використовували окрему краплю. Після досліду всі краплі, крім крапель із середовищем для культивування і мікрокрапель з продуктами злиття, з чашки забирали за допомогою мікропіпетки.

Процедура злиття полягала в послідовних змінах за допомогою мікропіпетки розчинів в мікрокраплях з протопластами. Були досліджені такі схеми, чи послідовності злиття:

1. W-5 - ПЕГ (5-10%, 10-30 хв) - відбір розчину (ВР) - Буфер 9А:1В (сполучення 2) (15-20 хв) - ВР - середовище для культивування (СК) - ВР - СК.

2. СК - ПЕГ (5-25 хв) - Na-гліциновий буфер рН 10,5 + розчин ДМСО 1:1 (тут і далі сполучення 1) (5-25 хв) - ВР - СК - ВР - СК - ВР - СК.

3. W-5 - ПЕГ (5-25 хв) - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (5-25 хв) - ВР - СК - ВР - СК - ВР - СК.

4. W-5 - ПЕГ (5-25 хв) - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (5-25 хв) - ВР - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (5-25 хв) - ВР - СК.

5. W-5 - ПЕГ (5-25 хв) - СК - ВР - W-5 - ВР - СК.

6. W-5 - Na-гліциновий буфер рН 10,5 + розчин ДМСО 1:1 (5-25 хв) - ПЕГ (5-25 хв) - СК - ВР - W-5 - ВР - СК.

7. W-5 - ПЕГ (5-25 хв) - Na-гліциновий буфер рН 12,5 +

розчин ДМСО 1:1 - СК - ВР - СК - ВР - ПЕГ (якщо протопласти розійшлися) - СК - ВР - СК - ВР - СК - ВР.

8. W-5 - ПЕГ (5-25 хв) - 0,25 М розчин нітрату натрію - СК - ВР - СК - ВР - СК - ВР.

9. W-5 - ПЕГ (5-25 хв) - 0,25 М розчин нітрату натрію - ПЕГ - СК - ВР - СК - ВР - СК - ВР.

10. W-5 - 0,25 М розчин нітрату натрію - ПЕГ (5-25 хв) - СК - ВР - СК - ВР - СК - ВР.

11. W-5A - ПЕГ (10 хв) - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (5 хв) - ВР - W-5A - ВР - ПЕГ, 5 хв (якщо протопласти розійшлися) - ВР - W-5A - ВР - W-5A - ВР - W-5A - ВР - СК (+1 мг/мл БСА) - ВР - СК - ВР - СК.

12. W-5A + СК - ПЕГ (10 хв) - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (5 хв) - ВР - ПЕГ - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (5 хв) - ВР - ПЕГ - ВР - W-5A - ВР - W-5A - ВР - W-5A - ВР - СК - ВР - СК - ВР - СК.

13. W-5A + СК - ПЕГ (10 хв) - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (8 хв) - ВР - ПЕГ - СК - ВР - СК - ВР - СК - ВР - СК.

14. W-5A і(1:1)/чи СК - ПЕГ (10 хв) - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 1:1 (5-25 хв) - ВР - ПЕГ (якщо протопласти розійшлися) - W-5A і(1:1)/чи СК - ВР - W-5A і(1:1)/чи СК - ВР - W-5A і(1:1)/чи СК - ВР - СК - ВР - СК - ВР - СК. Тут і далі СК і W-5A містили 0,03 мг/мл БСА проти звичайної концентрації 1 мг/мл.

15. W-5A - ПЕГ (10 хв) - ВР - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО + 0,25 М нітрат натрію 1:1:1 (Буфер B-4) (7-10 хв) - ВР - СК - ВР - СК - ВР - СК.

16. W-5A - ВР - ПЕГ (10 хв) - ВР - B-4 (7-10 хв) - ВР - ПЕГ (якщо протопласти розійшлися) - ВР - W-5A - ВР - СК.

17. W-5A - BP - ПЕГ (10 хв) - (BP - Na-гліциновий буфер рН 12,5 + розчин ДМСО 2:1 (5-25 хв) - BP - W-5A) 1-2 рази - BP - СК - BP - СК - BP - СК.

Для електричного злиття використовували такі розчини (мг/100 мл): РЕЗ-1 (манніт 6000, БСА 13, лізоцим 10), РЕЗ-2 (манніт 9109, БСА 3-10), РЕЗ-3 (манніт 10931, БСА 5-10), РС-22 (БСА 5, сахароза 3000, манніт 10930), РЗ-23 (гліцин 225С, БСА 5, манніт 5460), РЕЗ-21 (гліцин 3750, БСА 5), РЕЗ-24 (манніт 9000, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5), РЕЗ-25 (манніт 9200, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5), РЕЗ-26 (манніт 8000, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5), РЕЗ-27 (гліцин 3750, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5), РЕЗ-28 (арабіноза 7510, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5), РЕЗ-29 (ксиліт 7530, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5), РЕЗ-30 (манніт 4500, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, ксилоза 3750), РЕЗ-31 (гліцин 6005, БСА 5-10), РЕЗ-32 (манніт 4500, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, ксилоза 4000), РЕЗ-33.0 (БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, ксилоза 8250) РЕЗ-33 (манніт 4500, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, ксилоза 3800), РЕЗ-34 (манніт 4500, БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,8, ксилоза 3800), РЕЗ-35 (БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14,4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6,8, ксиліт 7610), РЕЗ-41 (БСА 5, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5, гліцерин 7360).

Електрозлиття проводили за допомогою платинових мікроелектродів діаметром 50 мкм. Об'єм мікрокрапель для електрозлиття складав 1 мкл. Відстань між мікроелектродами сягала від 200 до 400 мкм, напруга: діелектрофорезу - 5-10 Вольт (частота 1 Мгц), прямокутного імпульсу - 14-20 Вольт (тривалість 80 мкс). Швидкість злиття сягала 50-100 пар/год. Після завершення електрозлиття розчин для електрозлиття

заміщували 100 нл поживного середовища і вели індивідуальну культуру продуктів злиття, як описано вище.

Отримання рослин з індивідуальних продуктів злиття *Nicotiana tabacum* (NT) і *N. plumbaginifolia* (NP). Після регенерації отримували вихідні колонії, котрі розрізали на приблизно рівні частини, які переносили на свіже середовище. По тому, як рослини підростали, процедуру переносу повторювали. Було розроблено систему позначень, завдяки котрій назва рослини відображала місце її розташування у вихідній колонії.

Препарати хромосом готували за стандартним методом приготування чавлених препаратів кінчиків корінців. Готові препарати переглядали на мікроскопі Univar (Reichert, Австрія). Ізоферментний аналіз отриманих рослин проводили за стандартними методами.

РЕЗУЛЬТАТИ І ОБГОВОРЕННЯ

Культивування індивідуальних преселектованих рослинних протопластів і продуктів їх злиття. Дані наведено в Таблицях 1 та 2, відповідно. Ефективність висіву індивідуальних протопластів тютюну та ріпаку та ефективність електрозлиття протопластів *Nicotiana* і регенерації рослин з продуктів злиття узгоджуються з відомими літературними даними.

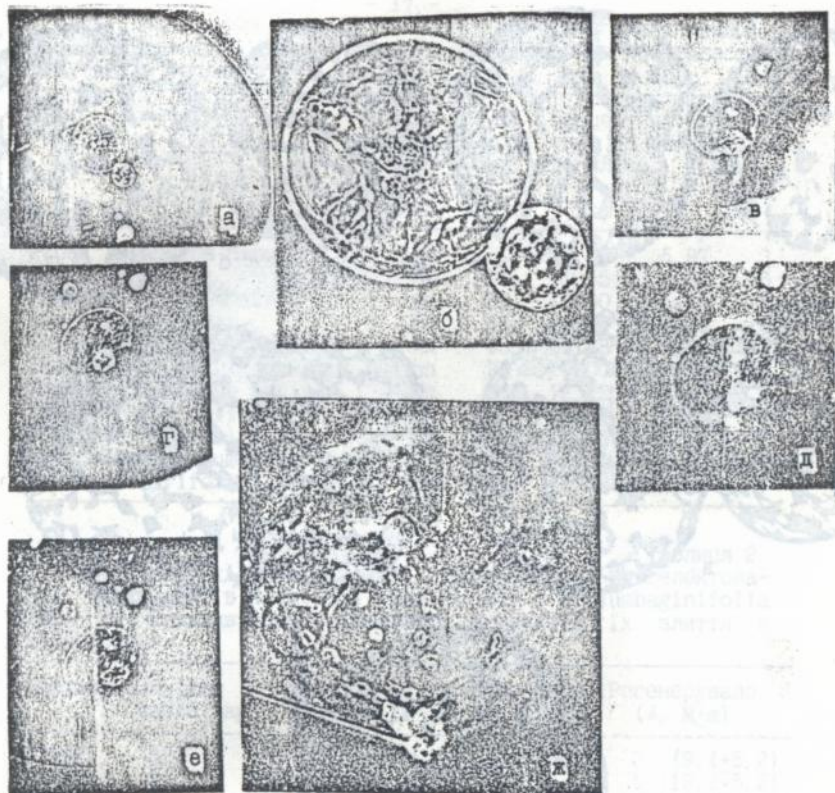
Хімічне злиття індивідуальних преселектованих протопластів. Коли для злиття застосовували стандартні методики, що добре зарекомендували себе при масовому злитті протопластів (див., напр., послідовності хімічного злиття 1, 2, 5, 6 і 10), продуктів злиття отримати не вдавалося. Це стало можливим (див. Мал. 1) лише після підвищення рН буферу для злиття до 12,5, застосування розчинів з БСА і розробки спеціаль-

них послідовностей злиття, деякі з котрих виявилися особливо ефективними (Таблиця 3).

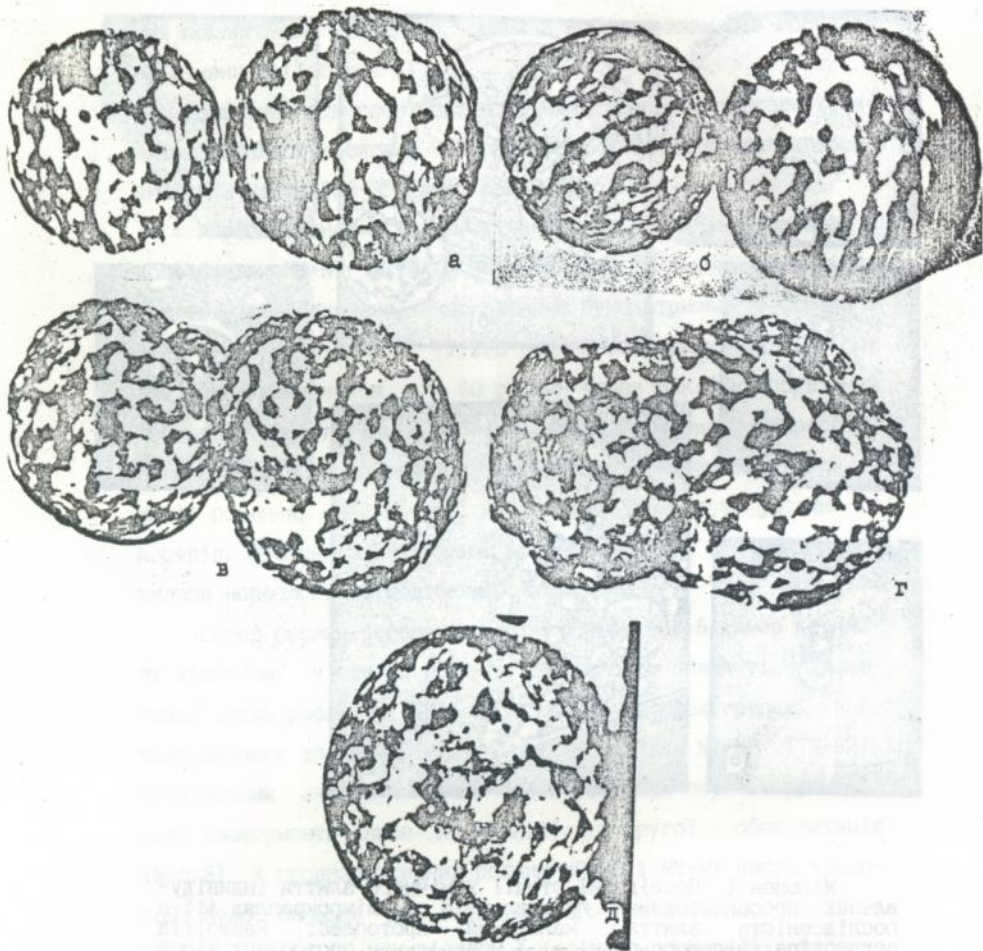
Ефективність електрозлиття індивідуальних преселектованих прстопластів сягала 95%. Найефективнішими виявилися розчини PE3-34 та PE3-35 (див. Мал.2, Табл.4).

Морфологічний і цитологічний аналіз отриманих рослин в комбінаціях NT+NT, NT+NP и NP+NP виявив їх значну мінливість навіть в тому випадку, якщо рослини було отримано з одного і того ж продукту злиття. У 296 рослин оцінювали ряд морфологічних показників. У 60 рослин через рік був проведений повторний морфологічний аналіз і визначене число хромосом. Найстабільнішими ознаками виявилися форма коренів, листя та колір рослини, найнестійкішими - швидкість росту рослин та коренів. Рослини з близькими числами хромосом звичайно виявлялися морфологічно подібними, і навпаки.

Серед рослин-регенерантів було знайдено 5 химер по числу хромосом; у однієї рослини листки були плямисті. Хромосомні числа рослин NT+NP розподілялись по двох групах: навколо значень для NP (27-32) і очікуваних для NT+NP (72-82). Біохімічний аналіз показав, що в рослинах першої групи наявні ізоферменти лише NP (Мал.4), а другої - обох батьків (Мал.3). У проаналізованих рослин NP+NP і NT+NT число хромосом було близьке до батьківського (відповідно 27-30 і 42-54); деякі рослини були химерами по хромосомних числах. Отримані дані можна пояснити, якщо припустити, що при розвитку одиничних продуктів злиття суміщалися два процеси (соматоклональної?) мінливості: 1) втрата невеликих кількостей хромосом (що приводило до виникнення анеуплоїдії), і 2) втрата великих груп хромосом, що відбувалася, можливо, при сегрегації чи незлитті ядер.



Малюнок 1. Послідовні стадії хімічного злиття індивідуальних преселектованих протопластів в мікрокраплях (11-а послідовність злиття, каллюсний протопласт *Rauwolfia serpentina* (більшого розміру) X мезофільний протопласт *Vinca minor*): а) вихідна пара протопластів в мікрокраплі (100X); б) те ж, при 400X. Видно, що протопласт *Rauwolfia* має тяжі цитоплазми і не містить хлоропластів, тоді як протопласт *Vinca*, навпаки, не має розвинутих тяжів, але містить численні хлоропласти; в) додавання ПЕГ (100X); г) додавання буферу для злиття (100X); д) друге додавання ПЕГ (100X); е) продукт злиття утворюється при відмивці (100X); ж) продукт злиття містить хлоропласти *Vinca* і має характерну структуру протопласта *Rauwolfia*. Частина протопласта *Vinca* залишилася зовні, не зливаючись (400X).



Малюнок 2. Послідовні стадії електрозлиття преселектованих протопластів тютюну в мікрокраплі: а) діелектрофорез; б) подача прямокутного імпульсу; в) - д) подальші етапи злиття.

Таблиця 1.

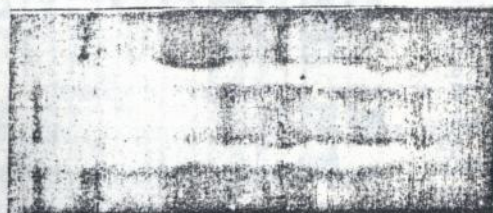
Ефективність індивідуального культивування протогласнів ряду видів рослин.

Вид	Кліти-ни (кл) чи про-топлас-ти (пп)	Кіль-кість, шт	Процент клі-тин, що по-ділилися, М ± м	Час куль-тиву-вання, діб
Ріпак (Brassica napus)	кл	60	30,00 ± 5,97	3
Ріпак (B.napus)	пп	251	11,55 ± 2,02	6
Капуста (B.chinensis)	пп	50	18,00 ± 5,49	7
Соя (Glycine max)	пп	39	46,15 ± 8,09	6
Тютюн (Nicotiana tabacum)	пп	45	75,56 ± 6,48	7
Тютюн (N.plumbaginifolia)	пп	25	20,00 ± 8,16	10
Люцерна (Medicago sativa)	пп	90	12,22 ± 3,47	4
Горох (Pisum sativum)	кл	9	44,44 ± 17,57	7
Горох (P. sativum)	пп	51	9,80 ± 4,21	8
Картопля (Solanum tuberosum)	кл	40	55,00 ± 7,97	7
Конюшина (Trifolium pratense)	пп	40	2,50 ± 2,50	7

Таблиця 2.

Ефективність електрозлиття індивідуальних преселектованих протогласнів *Nicotiana tabacum* (NT) і *N.plumbaginifolia* (NP) та культивування одиничних продуктів їх злиття в мікрокраплях.

Партнери	Вихідне число пар	Злилося, (%.. М+m)	Мікроколоній, (%.. М+m)	Регенерувало (%.. М+m)
NT+NP	32	12 (37,5+8,7)	4 (12,5+5,9)	3 (9,4+5,2)
NT+NT	41	35 (85,4+5,6)	9 (21,9+6,5)	5 (12,2+5,2)
NP+NP	27	17 (63,0+9,5)	5 (29,4+11,4)	5 (29,4+11,4)



N.t

N.p

3D-22

Малюнок 3. Ізоферментний (естерази) аналіз регенеранта 3D2-2, що розвинувся з продукту злиття індивідуальних преселектованих протогласнів *Nicotiana tabacum* (N.t.) і *N.plumbaginifolia* (N.p.).

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

Таблиця 3.

Найефективніші послідовності хімічного злиття індивідуальних преселектованих протопластів рослин (Nп - номер послідовності злиття, див. Матеріали і методи)

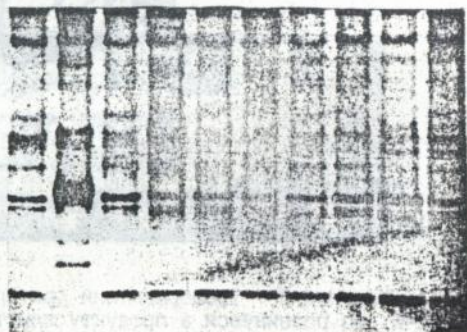
Батьківські види	Nп	Вихід- них пар	Зли- лося	Ефективність злиття (% М + м)
<i>R. serpentina</i> + <i>V. minor</i>	11	15	4	26,7 + 11,8
<i>N. tabacum</i> + <i>N. tabacum</i>	11	51	13	25,5 + 6,2
<i>N. tabacum</i> + <i>R. serpentina</i>	11	10	1	10,0 + 10,0
<i>N. tabacum</i> + <i>N. tabacum</i>	14	35	15	42,9 + 8,5
<i>B. napus</i> + <i>B. napus</i>	14	12	6	50,0 + 15,1
<i>N. tabacum</i> + <i>N. tabacum</i>	15	54	18	33,3 + 6,5
<i>N. tabacum</i> + <i>S. tuberosum</i>	15	10	2	20,0 + 13,3
<i>N. tabacum</i> + <i>N. tabacum</i>	16	52	31	59,6 + 6,9
<i>N. tabacum</i> +	17	10	4	40,0 + 16,3
<i>R. serpentina</i> + <i>R. stricta</i>				
<i>B. napus</i> + <i>B. campestris</i>	17	7	4	57,1 + 20,2

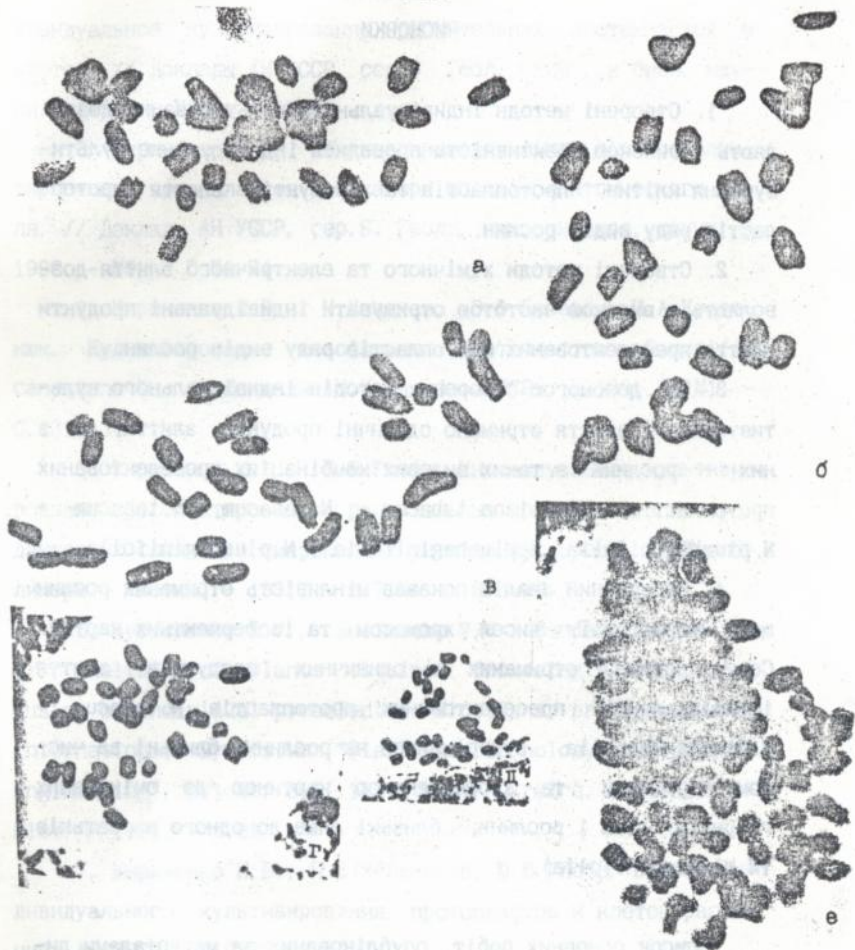
Таблиця 4.

Ефективність електрозлиття деяких комбінацій рослинних протопластів (розчин РЕЗ-34).

Батьки	Число віді- браних пар	Злилося	Ефективність (% М + м)
<i>A. belladonna</i> + <i>N. tabacum</i>	36	27	75,0 + 7,3
<i>N. tabacum</i> + (<i>S. carniolica</i> + <i>N. tabacum</i>)	37	35	94,6 + 3,8

Малюнок 4. Ізоферментний (естерази) аналіз регенерантів 1А8-19.6, 1А8-24.8, 1А8-21.7, 1А8-24.2, 3Е43-8, 1А8-4.3, 1А8-11.1, 3Д24-2, що розвинулися з продуктів злиття індивідуальних преселектованих протопластів *Nicotiana tabacum* (N. t.) і *N. plumbaginifolia* (N. p.)





Малюнок 5. Препарати хромосом рослин, отриманих з продуктів злиття індивідуальних преселектованих протопластів: 1Д9-13.2 (а), 1А8-21.2 (б), 1А2-3 (в), 3.10 (е) (комбінація *Nicotiana tabacum* + *N. plumbaginifolia*), 2Тbr²-Д (г) (комбінація *N. plumbaginifolia* + *N. plumbaginifolia*), VT²F-2 (д) (комбінація *N. tabacum* + *N. tabacum*).

ВИСНОВКИ

1. Створені методи індивідуального культивування дозволяють з високою ефективністю проводити індивідуальне культивування клітин, протопластів та продуктів злиття протопластів ряду видів рослин.

2. Створені методи хімічного та електричного злиття дозволяють з високою частотою отримувати індивідуальні продукти злиття преселектованих протопластів ряду видів рослин.

3. За допомогою створених методів індивідуального культивування і злиття отримано одиничні продукти злиття, а з них - рослини в таких видових комбінаціях преселектованих протопластів: *Nicotiana tabacum* + *N. tabacum*, *N. tabacum* + *N. plumbaginifolia*, *N. plumbaginifolia* + *N. plumbaginifolia*.

4. Проведений аналіз показав мінливість отриманих рослин щодо морфології, чисел хромосом та ізоферментних картин. Серед рослин, отриманих з одиничних продуктів злиття індивідуальних преселектованих протопластів *N. tabacum* + *N. plumbaginifolia*, зустрічалися як рослини, близькі за числом хромосом та ізоферментною картиною до очікуваних гібридів, так і рослини, близькі лише до одного з батьків (*N. plumbaginifolia*).

Список основних робіт, опублікованих за матеріалами дисертації:

1. Кириченко И. В., П. В. Мельников, Ю. Ю. Глеба. Регенерация растений из индивидуально культивируемых протопластов табака. // Доклады АН УССР, сер. Б. Геол., хим., и биол. науки. - 1989. - №7. - С. 63-65.

2. Кириченко И. В., Н. В. Кучук, Л. А. Сахно, Ю. Ю. Глеба. Ин-

дивидуальное культивирование растительных протопластов и клеток. // Доклады АН УССР, сер. Б. Геол., хим., и биол. науки. - 1990. - №3. - С. 63-65

3. Кириченко И. В. Слияние индивидуальных пар преселектированных протопластов табака при помощи электрического поля. // Доклады АН УССР, сер. Б. Геол., хим., и биол. науки. - 1990. - №6. - С. 71-74.

4. Кириченко И. В., Н. Упадхаи, О. Ф. Любарец, И. А. Костенюк. Культивирование мезофильных протопластов *Rauwolfia canescens* L. // Доклады АН Украинской ССР. - 1991. - №1. - С. 131-134

5. Кириченко И. В., Ю. Ю. Глеба. Индивидуальное культивирование преселектированных растительных протопластов и продуктов их слияния в микрокаплях питательных сред. // Биополимеры и клетка. - 1991. - т. 7, №4. - С. 6-20

6. Kyrychenko I. V., Sulimenko V. V., Bondarchuk L. V. et al. Analysis of plants obtained from single products of fusion of individual preselected *Nicotiana* protoplasts. / International Symposium "Plant Biotechnology and Genetic Engineering", October 3-6, 1994, Kiev, Ukraine. Abstracts. - Kiev. - 1994. - p. 61

7. Кириченко И. В., П. В. Мельников, Ю. Ю. Глеба. Способ индивидуального культивирования протопластов и клеток растений. АС СССР N1549225.

8. Кириченко И. В. Индивидуальное культивирование протопластов в микрокаплях. // Методы клеточной биотехнологии растений. Препринт 87.1. - Киев, Институт ботаники им. Н. Г. Холодного. - 1987. - С. 14-17.

9. Кириченко И. В. Индивидуальное культивирование протопластов в микрокаплях. // Методы культивирования расти-

тельных объектов *in vitro*. Препринт 88.3. - Киев, Институт ботаники им. Н. Г. Холодного. - 1988. - С. 24-28.

Кириченко И. В. Генетическая реконструкция растительной клетки при помощи микроманипуляций. Диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 - генетика. Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 1994.

Поскольку при массовом культивировании и слиянии протопластов растений невозможно точно определить исходный состав клеток, из которых получены растения-регенеранты, он задавался путём предварительной селекции родительских протопластов и их отбора из суспензии при помощи микропипетки и микроманипулятора. Были разработаны методы культивирования таких индивидуальных преселектированных протопластов, химического и электрического слияния их в желаемом сочетании и регенерации растений из полученных таким образом продуктов слияния. Полученные растения (*Nicotiana tabacum* X *N. tabacum*, *N. tabacum* X *N. plumbaginifolia*, *N. plumbaginifolia* X *N. plumbaginifolia*) показали вариабильность по морфологии, числу хромосом и изоферментным маркерам даже в том случае, когда происходили от одного и того же продукта слияния.

Ключові слова: протопласти, соматична гібридизація, *Nicotiana*.

Kyrychenko I.V. Genetic reconstruction of the plant cell by micromanipulations. Ph.D. thesis. Speciality 03.00.15 - Genetics. Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of the Ukraine, Kiev, 1994.

By using the procedures of mass culturing and mass fusion of plant protoplasts, the initial composition of the cells could not be determined exactly. To be aware of this composition the parental protoplasts were preselected and then picked up from the suspension using a micropipette and a micromanipulator. Methods of culturing of these individual preselected protoplasts, chemical and electrical fusion of that ones in desired combination and regenerating of the plants from the fusion products obtained in this way have been developed. The plants regenerated (*Nicotiana tabacum* X *N. tabacum*, *N. tabacum* X *N. plumbaginifolia*, *N. plumbaginifolia* X *N. plumbaginifolia*) demonstrated variability in their morphology, chromosome numbers and isoenzyme patterns even when they have been grown from the same fusion product.

AB 31.599
AB 31.599