

АНОМАЛІЇ АНАТОМІЧНОЇ БУДОВИ МІЖТРИБНОГО ЦИБРИДА *BRASSICA NAPUS* З ХЛОРОПЛАСТАМИ *LESQUERELLA FENDLERI*

Н.В. НУЖИНА¹, І.О. НІТОВСЬКА², А.В. ГОЛУБЕНКО^{1,2}, Б.В. МОРГУН², М.В. КУЧУК²

¹ Інститут біології Київського національного університету імені Тараса Шевченка
E-mail: nuzhynan@gmail.com

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

Проведено анатомічні дослідження вегетативних органів цитоплазматичного гібрида, який містить ядро *Brassica napus* та хлоропласти *Lesquerella fendleri*, у порівнянні з батьківськими формами. В дослідженнях використовували рослини, вирощені *in vitro*. Встановлено, що анатомічна будова цибирида є подібною до ріпака. Виявлено аномальні зміни в будові покривної, паренхімної та провідної тканин листка, черешка, стебла та кореня цибирида. Виникнення анатомічних порушень можна пояснити ядерно-цитоплазматичною несумісністю двох видів, що є однією з основних причин низької адаптивної здатності цибирида до умов *in vivo* і проявляється при експресії чужинних хлоропластних генів віддаленого виду.

Ключові слова: анатомія вегетативних органів рослини, цитоплазматичний гібрид, *Brassica napus*, *Lesquerella fendleri*, анатомічні порушення.

Вступ. Ріпак (*Brassica napus* L.) є однією з важливих олійних сільськогосподарських культур. Найбільший інтерес ця рослина представляє як джерело біодизеля, альтернативи до нафти. Для поліпшення сортів ріпака поряд із традиційними селекційними підходами дедалі активніше застосовуються новітні методи генетичної інженерії та біотехнології [1–4]. Оскільки культивування генетично модифікованих рослин пов'язане із загрозою поширення чужинних генів, то створення рослин з трансформованим пластом є більш безпечним для навколишнього середовища [5–7]. Наразі ефективні протоколи отримання транспластних рослин відпрацьовані лише для небагатьох видів [8]. Разом з тим такі рослини можна отримувати перенесенням трансформованих пластид від одного виду до іншого шляхом злиття протопластів [9, 10]. У попередньому дослідженні нами був створений транспластний цитоплазматичний гібрид, який містив ядро

B. napus та хлоропласти *Lesquerella fendleri* (A. Gray) Wats з трансформованим пластомом [11]. Спроби адаптації цибирида *in vivo* шляхом щеплення або перенесення в субстрат (торф, перліт, сфагновий мох) виявилися невдалими. Це може бути наслідком ядерно-цитоплазматичної несумісності віддалених видів [12, 13].

Створення експериментальних систем з ядерно-цитоплазматичними комбінаціями допомагає краще зрозуміти роль геному органел у життєдіяльності рослини. Такі рослини можна моделювати на рівні організму (аллоплазматичні лінії) [14, 15], окремих гібридних клітин та регенерантів з них (соматичні цитоплазматичні гібриди) [12, 16] і пластоми, через перенесення чужинних генів у хлоропластний геном [7, 16]. Цибрид *B. napus* з хлоропластами *L. fendleri* є цікавим рослинним матеріалом для дослідження ядерно-цитоплазматичної взаємодії у рослин, зокрема на анатомічному рівні. Метою даної роботи було проведення анатомічних досліджень отриманого цибирида для з'ясування причин низької адаптаційної здатності рослин.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були рослини, вирощені *in vitro*:

- *Lesquerella fendleri* (A. Gray) Wats (рис. 1, а) (люб'язно надані проф. П. Малига), що містять в пластидній ДНК селективний маркерний ген *aadA16gfp*, який обумовлює стійкість до спектиноміцину/стрептоміцину та зелену флуоресценцію в ультрафіолетових променях [18];
- *Brassica napus* L. сорту Westar (рис. 1, б);
- соматичний цибрид *B. napus* (+ *L. fendleri*) (рис. 1, в), який містить ядерний геном *B. napus* та хлоропласти *L. fendleri* з трансформованим пластомом [11].

Батьківські види належать до різних триб: *Brassica napus* – до триби Brassiceae, а *Lesquerella fendleri* – до триби Drabae.

Рослини вирощували на живильному середовищі Мурасіге-Скуга (МС) [19] з додаванням

© Н.В. НУЖИНА, І.О. НІТОВСЬКА, А.В. ГОЛУБЕНКО, МОРГУН Б.В., КУЧУК М.В., 2016



Рис. 1. Зовнішній вигляд рослин, вирощених *in vitro*: *a* – *Lesquerella fendleri* (A. Gray) Wats; *б* – *Brassica napus* L.; *в* – цибрид *B. napus* (+ *L. fendleri*). Масштаб – 1 см

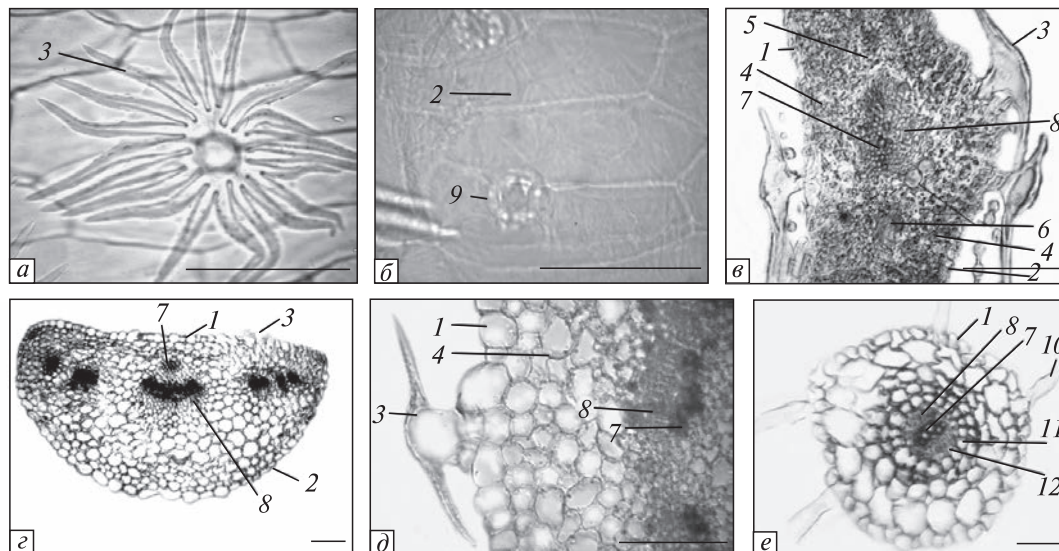


Рис. 2. Анатомічної будова *L. fendleri*: *a* – адаксіальна поверхня епідерми листка; *б* – абаксіальна поверхня епідерми листка; *в* – поперечний зріз листка; *г* – черешок; *1* – адаксіальна епідерма, *2* – абаксіальна епідерма, *3* – зірчасті трихоми, *4* – стовпчаста паренхіма, *5* – губчаста паренхіма, *6* – ідіобласти, *7* – ксилема, *8* – флоема, *9* – прориди; *д* – поперечний зріз стебла і *е* – кореня: *1* – епідерма/екзодерма, *3* – зірчасті трихоми, *4* – паренхіма/мезодерма, *7* – ксилема, *8* – флоема, *10* – кореневі волоски, *11* – ендодерма, *12* – перицикл. Масштаб – 100 мкм

0,1 мг/л НОК при освітленні 2000 лк, фотоперіоді 16/8 год та температурі 24 °С. Інтервал між пересадками на свіже середовище становив 30 діб.

Для анатомічних досліджень брали середні частини листкових пластинок (з 3-го і 4-го листків) та середні частини черешка, стебла і коріння. Досліджували по 10 рослин цибрида та батьківських форм. Зразки фіксували у FAA, заливали в желатин за стандартною методикою [20] та виготовляли поперечні зрі-

зи товщиною 10–15 мкм за допомогою заморожувального мікротому. Зрізи фарбували сафраніном. Проводили мацерацію листків з метою вивчення структур епідерми з адаксіальної та абаксіальної поверхонь листка. При описуванні епідерми листкової пластинки використовували методику Zarinkamar [21]. Мікроскопічні виміри здійснювали за допомогою окуляр-мікрометра на мікроскопі XSP-146TR та програми Image J. Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми Statistica 8. Достовір-

ність результатів визначали за t-критерієм Ст'юдента. Фотографії зроблено цифровим фотоапаратом Canon Power Shot A630.

Результати досліджень. Листок *L. fendleri* густо вкритий переважно 20-променевими зірчастими трихомами на ніжці (рис. 2, а), що майже перекривають одна одну, створюючи захист від надлишкової інсоляції. Одноклітинна епідерма листка вкрита тонкою кутикулою. Нижня (абаксіальна) епідерма майже вдвічі тонша за верхню (адаксіальну), що компенсується більшою щільністю покриву трихомами. Епідермоцити з обох боків листка мають прямолінійні обриси та витягнуто-багатокутну проекцію площі (рис. 2, б). З верхньої сторони епідермоцити майже вдвічі менші за площею, ніж з нижньої. Продихи анізоцитного типу (рис. 2, в). Розміри продихів з адаксіальної

сторони більші, ніж з абаксіальної, проте кількість їх менша (таблиця).

Стовпчата тканина в області центральної жилки представлена двома шарами з абаксіального боку та двома шарами менш видовжених клітин з адаксіального боку (рис. 2, в), тоді як ближче до периферії листкової пластинки кількість шарів зменшується до одного з кожної сторони, а клітини стають менш видовженими. Така будова паренхіми пов'язана з розміщенням листкової пластинки під гострим кутом відносно стебла. Таким чином, листки *L. fendleri* можна вважати ізолатеральними. В губчастому мезофілі зустрічаються ідіобласти у великій кількості, особливо їх багато біля провідних пучків. Останні оточені обкладовими клітинами.

Відносно велика товщина та вузька форма листка, інтенсивна опушеність трихомами, ізо-

Морфометричні параметри вегетативних органів *L. fendleri*, *B. napus* та цибрида *B. napus* з хлоропластами *L. fendleri*

Морфометричні параметри	<i>L. fendleri</i>	<i>B. napus</i> (+ <i>L. fendleri</i>)	<i>B. napus</i>
Товщина епідерми листка, мкм			
адаксіальна	26,94 ± 7,16	15,10 ± 3,85 *	16,35 ± 3,25
абаксіальна	16,51 ± 2,66	9,42 ± 1,85 ***	13,34 ± 3,77
Товщина, мкм			
листка	138,69 ± 15,85	116,68 ± 8,97 **	109,84 ± 4,96
епідерми стебла	26,52 ± 6,12	19,35 ± 4,11 *	19,77 ± 2,64
абаксіальної епідерми черешка	35,28 ± 7,73	18,60 ± 3,49 ***	36,28 ± 7,21
адаксіальної епідерми черешка	30,77 ± 4,98	18,18 ± 3,65 ***	24,02 ± 4,58
Продихи листка з адаксіального боку, мкм			
довжина	32,11 ± 4,56	24,00 ± 2,69 * 15,33 ± 2,03 ***	24,76 ± 1,66
ширина	27,61 ± 2,04	21,85 ± 2,31 *** 13,2 ± 0,66 ***	19,71 ± 1,99
Продихи листка з абаксіального боку, мкм			
довжина	27,77 ± 3,73	27,37 ± 1,53 ** 20,09 ± 2,38 ***	32,62 ± 3,49
ширина	24,02 ± 1,80	25,84 ± 1,57 *** 17,84 ± 2,37 ***	22,7 ± 1,82
Кількість продихів на поверхні листка, шт./мм ²			
адаксіальна	13,18 ± 6,01	75,2 ± 29,85 ***	233,6 ± 37,35
абаксіальна	20,82 ± 5,97	252,8 ± 48,78 *	269,6 ± 48,36
Площа епідермоцитів поверхні листка, мкм ²			
адаксіальна	3257 ± 946	2379 ± 630 *	2926 ± 876
абаксіальна	6324 ± 1861	2162 ± 649 ***	3518 ± 575

* P ≤ 0,05 відносно *L. fendleri*, ** P ≤ 0,05 відносно *B. napus*.

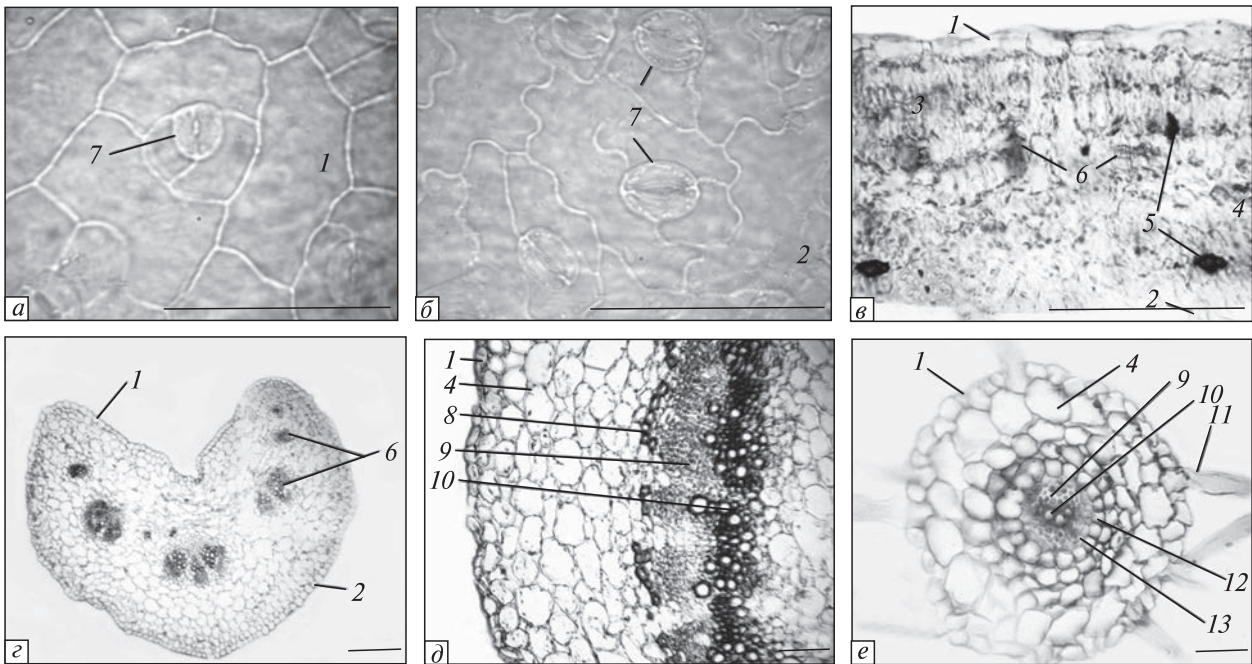


Рис. 3. Анатомічна будова *V. napus*: *a* – адаксіальна поверхня епідерми листка; *б* – абаксіальна поверхня епідерми листка; *в* – поперечний зріз листка; *г* – черешок: 1 – адаксіальна епідерма, 2 – абаксіальна епідерма, 3 – стовпчаста паренхіма, 4 – губчаста паренхіма, 5 – ідіобласти, 6 – провідний пучок, 7 – продиhi; *д* – стебло; *е* – корінь: 1 – епідерма/екзодерма, 4 – паренхіма/мезодерма, 8 – луб'яна склеренхіма, 9 – флоема, 10 – ксилема, 11 – кореневі волоски, 12 – ендодерма, 13 – перицикл. Масштаб – 100 мкм

латеральність, наявність обкладки провідних пучків є ознаками ксероморфності листків досліджуваних рослин.

Черешок у даного виду чітко не виражений, тому ми описували найвужчу частину листка в місці з'єднання його зі стеблом. Поперечний зріз має форму півмісяця. Анатомічне дослідження показало наявність зірчастих трихом на одношаровій епідермі. Епідермоцити вкриті тонким шаром кутикули і є вищими з абаксіального боку черешка, ніж з адаксіального (рис. 2, *г*). Провідна система представлена одним центральним пучком, де вже починає склеротизуватись первинна флоема, та симетрично розташованими бічними пучками, по 2–3 з кожного боку.

Стебло *L. fendleri* вкрите трихомами такого ж типу, як на листках (рис. 2, *д*). Поверхня стебла ребриста, що обумовлено різною висотою епідермоцитів в одношаровій епідермі. Деякі з них ймовірно водозапасаючі, що характерно для ксерофітних рослин. Паренхімна тканина складається з 5–6 шарів паренхімоцитів

неправильної округлої форми. Провідна система представлена замкнутим кільцем флоєми та ксилеми, наявних в однакових пропорціях. Поодинокі зустрічаються лігніфіковані волокна первинної флоєми.

Коренева система досліджуваних рослин має багато бічних коренів, густо вкритих кореневими волосками. Провідний пучок радіального типу оточений крупноклітинною ендодермою (рис. 2, *е*).

Вздовж жилок з адаксіального боку листка *V. napus* можна побачити довгі одноклітинні трихоми довжиною від 131 до 443 мкм, тоді як з абаксіального боку такі трихоми містяться по всій листковій пластинці. Адаксіальна епідерма листка відрізняється від абаксіальної. Так, з верхньої сторони проекція площі епідермоцитів розпластана, обриси клітин прямолинійно-рідкозвивисті (рис. 3, *а*), тоді як епідермоцити нижньої поверхні характеризуються витягнутою проекцією площі та звивистими обрисами (рис. 3, *б*). Для *V. napus*, як і для *L. fendleri*, епідермоцити з верхньої поверхні листка мають меншу

площу, а епідерма з адаксіального боку товща, ніж з абаксіального.

Продихи анізоцитного типу (рис. 3, а, б), з великими підпродиховими камерами. На верхній поверхні листка продихи мають менші розміри і зустрічаються в меншій кількості, ніж на нижній (таблиця).

Листки *B. napus* дорсовентральні. Стовпчаста паренхіма (2–3 ряди) розміщена лише з адаксіальної поверхні листка. Губчаста паренхіма представлена 4–5 шарами округлих клітин, витягнутих в поперечному напрямку, та великою кількістю ідіобластів (рис. 3, в).

Черешок рослин ріпака має увігнуту з внутрішньої сторони форму, вкритий одношаровою епідермою з потовщеною кутикулою. З адаксіального боку епідерма загалом тонша. В більшості випадків зустрічаються п'ять провідних пучків: три великих і по одному меншому по краях (рис. 3, г). На поверхні черешка та стебла ріпака зустрічаються поодинокі прості незалозисті одноклітинні трихоми.

Епідерма стебла ріпака одношарова, вкрита кутикулою. Провідна система представлена суцільним кільцем рівномірно розвинених ксилеми та флоєми. Лігніфіковані луб'яні волокна розміщені в один шар над діючою флоємою (рис. 3, д).

Коріння ріпака має багато бічних коренів, густо вкритих кореневими волосками. Провідний пучок радіального типу, ендодерма чітко виражена (рис. 3, е).

Листки цибрида вкриті одноклітинними простими нитчастими трихомами, подібними до трихом у ріпака (завдовжки від 274 до 499 мкм). Вони спостерігаються в області центральної жилки з обох боків та по крайовій зоні листової пластинки. Епідерма листків цибрида ріпака з хлоропластами *L. fendleri* більш подібна до епідерми *B. napus*. Так, проекція площі епідермоцитів з обох боків є розпластаною (рис. 4, а, б), що відповідає адаксіальній поверхні *B. napus*; обриси клітин верхньої епідерми звивисті, нижньої – крупно звивисті (рис. 4, а, б), що теж більш подібно до ріпака. Неоднорідні за висотою епідермоцити утворюють одношарову епідерму. За площею епідермоцити також дуже різні як зверху, так і знизу. Як і в батьківських форм, товщина верхньої епідерми майже вдвічі більша порівняно з нижньою. Продихи у ци-

брида анізоцитного типу такі ж, як і в батьківських форм. У цибрида аналогічно з ріпаком розміри продихів на верхній епідермі менші, ніж на нижній, а кількість продихів на верхній епідермі менша втричі. Проте на відміну від батьківських форм з обох боків листка цибрида виявлено як середні, так і дрібні продихи (рис. 4, а, б). Наявність дрібних продихів та неоднорідність епідермоцитів вказує на порушення розвитку покривної тканини листка у цибридних рослин.

Листки є дорсовентральними. За будовою паренхіми цибрид подібний до ріпака: наявні два ряди слабо вираженої стовпчастої паренхіми з адаксіальної поверхні листка, нижче розміщено 3–4 ряди губчастої паренхіми, зустрічаються поодинокі ідіобласти, провідні пучки мають обкладку. Однак можна спостерігати порушення впорядкованості рядів паренхіми порівняно з батьківськими рослинами (рис. 4, в). Товщина листка займає проміжне місце серед трьох досліджуваних рослин і становить $116,68 \pm 8,97$ мкм (таблиця).

Черешок цибрида на відміну від батьківських рослин має округлу форму. Одношарова епідерма має схожу будову з обох боків черешка: деформована, клітини неупорядковано відрізняються за висотою, відмічено проміжки не вкритої епідермою паренхіми (рис. 4, г). Разом з цим можна побачити незначне потовщення епідерми з абаксіального боку черешка аналогічно епідермі *L. fendleri* та *B. napus* (таблиця). Паренхімоцити переважно багатокутної форми. Провідна система часто являє собою з'єднані пучки серпоподібної форми, однак зустрічаються і черешки з одним великим центральним провідним пучком, трьома двома дрібнішими з одного боку та одним двома з іншого боку. Поверхня черешка і стебла містить поодинокі незалозисті нитчасті одноклітинні трихоми.

Стебло цибрида є одним з найбільш деформованих вегетативних органів. В базальній частині воно нагадує неупорядковано зрослі черешки з хаотично розміщеними пучками провідної системи, несистематизовано з'єднаними епідермою та паренхімою. Епідерма не має чіткої структури (рис. 4, д) і є тоншою, ніж у батьківських форм. Яскраво виражену асиметрію стебла можна спостерігати не ли-

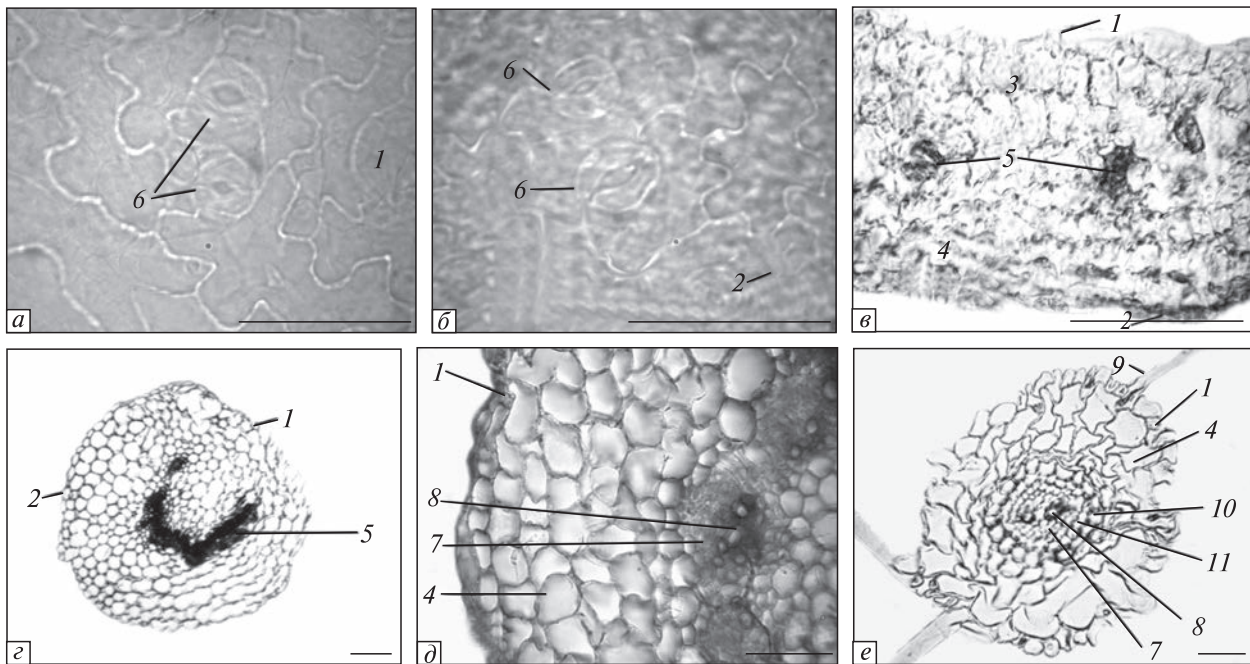


Рис. 4. Анатомічна будова цибрида *B. napus* (+ *L. fendleri*): *a* – адаксіальна поверхня епідерми листка; *б* – абаксіальна поверхня епідерми листка; *в* – поперечний зріз листка; *г* – черешок: 1 – адаксіальна епідерма, 2 – абаксіальна епідерма, 3 – стовпчаста паренхіма, 4 – губчаста паренхіма, 5 – провідний пучок, 6 – продихи; *д* – стебло; *е* – корінь: 1 – деформована епідерма/екзодерма, 4 – паренхіма/мезодерма, 7 – флоема, 8 – ксилема, 9 – кореневі волоски, 10 – ендодерма, 11 – перицикл. Масштаб – 100 мкм

ше на анатомічному, а й на морфологічному рівнях.

Анатомічна будова кореневої системи цибрида також має аномалії: утворюється дуже мало бічних коренів, зустрічаються корені з асиметрично розміщеною паренхімою, відсутньою місцями ризодермою, майже без корневих волосків. Ендодерма чітко виражена і помірно лігніфікована, як і в батьківських рослин (рис. 4, *e*).

Обговорення отриманих даних. Отримані іншими дослідниками соматичні гібриди між *B. napus* ($2n = 38$) та *L. fendleri* ($2n = 12$), які містили хлоропласти *B. napus*, були фертильними [22]. При поєднанні ядерного геному *Brassica napus* та пластид *Lesquerella fendleri* виникає часткова ядерно-цитоплазматична несумісність, яка виявляється у появі хлорофіл-дефектних секторів на листках [11], а також, на нашу думку, дефектів анатомічної будови цибрида і, як наслідок цього, його низької адаптивної здатності.

Порівнюючи анатомічну будову цибрида *B. napus* (+ *L. fendleri*) з будовою ріпака, до-

стовірно встановили відсутність відмінностей для таких показників, як товщина епідерми стебла, товщина абаксіальної епідерми листка, площа епідермоцитів з адаксіального боку листка, довжина більших продихів з адаксіального боку листка, кількість продихів з абаксіального боку листка (таблиця). При порівнянні цибрида з *L. fendleri* відсутність відмінностей встановили лише за довжиною більших продихів з абаксіального боку листка. Слід зазначити, що розміри продихів є більш лабільною ознакою порівняно з товщиною епідерми. Таким чином, показана анатомічна подібність цитоплазматичного гібрида до батьківської форми ріпака, що слугував донором ядерного геному.

У цибрида спостерігається достовірне потоншення епідерми стебла, листка та черешка порівняно з батьківськими формами, що є наслідком недостатнього розвитку покривної тканини і викликає зниження захисних механізмів даних рослин. Показники товщини листка і кількості продихів з обох боків листка цибрида займають проміжне становище порів-

няно з батьківськими формами (таблиця). Разом з цим зустрічаються великі та маленькі продиhi на одній поверхні листка цибрида (при одноманітних продихах у батьківських форм). Довжина продиhив листка цибрида є меншою, ніж у батьківських форм з обох боків, проте ширина великих продиhив з абаксіального боку листка цибридної рослини є навіть дещо більшою, ніж у батьківських форм. Наявність дрібних продиhив та менші розміри більших продиhив порівняно з батьківськими видами свідчать про недорозвиненість епідерми у цибрида.

Таким чином, можна стверджувати, що анатомічна будова цитоплазматичного гібрида, який містить ядро *B. napus* та хлоропласти *L. fendleri*, є подібною до ріпака, зокрема за типом проєкції та обрисів епідермоцитів, наявністю нитчастих трихом, будовою паренхіми листка, товщиною епідерми листка та стебла. Присутність дрібних продиhив, потоншення, а місцями відсутність епідерми вегетативних органів цибрида вказують на деструктивний розвиток цих структур з подальшим зниженням захисної здатності покривної тканини. Значне зменшення кількості кореневих волосків та асиметричність провідної системи призводять до погіршення постачання поживних речовин до «надземної» частини цибрида.

Виникнення анатомічних порушень у цибрида можна пояснити ядерно-цитоплазматичною несумісністю, яка виникає при активізації чужинних хлоропластних генів внаслідок поєднання віддалених видів. Показано, що багато кількісних параметрів рослин, зокрема ті, що впливають на урожайність і стабільність рослин, пов'язані як з ядерними, так і з цитоплазматичними генами [14, 23]. Це пояснюється тим, що органели відіграють ключову роль у забезпеченні енергетичних процесів у житті рослини. В процесі дослідження ядерно-цитоплазматичних химер знайдено численні прояви впливу геному органел на морфологічні, морфогенетичні та кількісні показники [13, 24, 25], фертильність [23, 26, 27], фотосинтез, дихання [13,28–32], стійкість до патогенів та інших негативних факторів [33], злиття хромосом, передачу та рекомбінацію окремих компонентів геному [34]. Заміна цитоплазми часто призводить до зниження фер-

тильності, стерильності і навіть до повної хлорофіл-дефектності цибридів [13, 15, 23], проте в окремих випадках спостерігаються протилежні явища. Відбувається ядерно-цитоплазматичний гетерозис (покращення кількісних показників та фертильності після комбінування ядер і цитоплазми різних рослин у порівнянні з цими показниками у рослини-донора ядра), коли алоплазматична лінія перевищує свій еуплазматичний аналог [23, 35].

Ядерно-цитоплазматична несумісність цибрида *B. napus* (+ *L. fendleri*) підтверджується тим, що під час довгострокового культивування *in vitro* помічено формування білих секторів на листках. Аналіз хлорофіл-дефектних тканин листка показав наявність у них пластоми *L. fendleri*, як і в зелених тканинах [11]. На нашу думку, причиною таких дефектів може бути те, що білки тилакоїдних мембран та ферментних комплексів хлоропластів кодуються як ядерними, так і пластидними генами. Під час комбінування ядра і цитоплазми різних видів рослин, особливо віддалених, виникають ускладнення при стереохімічному поєднанні певних білків. Це може впливати не лише на нормальну роботу пластид, але й на розвиток рослини в цілому, оскільки пластиди є важливими енергетичними компартментами рослинної клітини.

Взаємодія хлоропластного та ядерного геномів базується на коадаптації білково-ферментних комплексів, оскільки деякі білки кодуються пластомами, а інші – ядерним геномом. Зміни геномного складу клітини можуть призвести до змін фертильності та анатомічної будови. Наслідком аномальних змін анатомічної будови усіх вегетативних органів цибрида *B. napus* (+ *L. fendleri*) була погана адаптаційна здатність до умов *in vivo*, яка, очевидно, спричинена ядерно-цитоплазматичною несумісністю.

Висновки. Анатомічна будова цитоплазматичного гібрида, який містить ядро *Brassica napus* та хлоропласти *Lesquerella fendleri*, подібна до анатомічної будови ріпака. Виявлено аномалії анатомічної будови покривної та провідної тканин усіх вегетативних органів цибрида. Виникнення анатомічних порушень можна пояснити ядерно-цитоплазматичною несумісністю, яка проявляється при експресії чужинних хлоропластних генів віддаленого виду. Ядерно-цитоплазматична несумісність цибрид-

них рослин є однією з причин їх поганої адаптаційної здатності до умов *in vivo*.

Експерименти проводили за темами № 14БП-03601 Київського національного університету імені Тараса Шевченка та № 0112U001735 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

ANATOMICAL ABNORMALITIES
OF THE INTERTRIBAL CYBRID BETWEEN
BRASSICA NAPUS AND *LESQUERELLA FENDLERI*

*N.V. Nuzhyna, I.O. Nitovska, A.V. Golubenko,
B.V. Morgun, M.V. Kuchuk*

Institute of Biology, Taras Shevchenko National
University of Kyiv
Institute of Cell Biology and Genetic Engineering,
NAS of Ukraine, Kyiv

The anatomical research of the vegetative organs of the cytoplasmic hybrid *in vitro* plants containing the *Brassica napus* nucleus and the *Lesquerella fendleri* chloroplasts had been conducted in comparison to the parental forms. It was found, that the anatomical structure of the cybrid had been similar to rapeseed. Anomalous changes in the epithelial, parenchymal and connective tissue of the leaf, stalk, stem, and root of the cybrid were detected. The appearance of the anatomical defects can be explained by nuclear-cytoplasmic incompatibility which is the cause of low adaptability of the cybrid to *in vivo* conditions and takes place due to alien chloroplast gene expression in the remote species.

АНАТОМИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ
МЕЖТРИБНОГО ЦИБРИДА *BRASSICA NAPUS*
И *LESQUERELLA FENDLERI*

*Н.В. Нужина, И.А. Нитовская, А.В. Голубенко,
Б.В. Моргун, Н.В. Кучук*

Проведены анатомические исследования вегетативных органов цитоплазматического гибрида, который содержит ядро *Brassica napus* и хлоропласты *Lesquerella fendleri*, в сравнении с родительскими формами. В исследованиях использовали растения, которые выращивали *in vitro*. Установлено, что анатомическое строение цибрида сходно с рапсом. Выявлены аномальные изменения в строении покровной, паренхимной и проводящей тканей листа, черешка, стебля и корня цибрида. Появление анатомических нарушений можно объяснить ядерно-цитоплазматической несовместимостью, которая является причиной низкой адаптивной способности цибрида к условиям *in vivo* и возникает при экспрессии чужеродных хлоропластных генов отдаленного вида.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Poulsen, G.B., Genetic transformation of *Brassica*, *Plant Breed.*, 1996, vol. 115, no. 4, pp. 209–225.
2. Wang, W.C., Menon, G., and Hansen, G., Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants, *Plant Cell Rep.*, 2003, vol. 22, no. 4, pp. 274–281.
3. Cardoza, V., and Stewart, C.N., Jr., *Agrobacterium*-mediated transformation of canola, *Transgenic Crops of the World – Essential Protocols*, ed. I.S. Curtis, Kluwer Acad. Publ., 2004, pp. 379–387.
4. Slyvets, M., and Sakhno, L., Human interferon alpha 2b positively affects plant growth in both aseptic non-stressed and water deficit conditions, *Int. J. Biosci. Nanosci.*, 2014, vol. 1, no. 5, pp. 104–118.
5. Scott, S.E., and Wilkinson, M.J., Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*, *Nat. Biotechnol.*, 1999, vol. 17, no. 4, pp. 390–392.
6. Hou, B.K., Zhou, Y.H., Wan, L.H., Zhang, Z.L., Shen, G.F., Chen, Z.H., and Hu, Z.M., Chloroplast transformation in oilseed rape, *Transgenic Res.*, 2003, vol. 12, no. 1, pp. 111–114.
7. Schneider, A., Stelljes, C., Adams, C., Kirchner, S., Burkhard, G., Jarzombski, S., Broer, I., Horn, P., Elsayed, A., Hagl, P., Leister, D., and Koop, H.U., Low frequency paternal transmission of plastid genes in Brassicaceae, *Transgenic Res.*, 2015, vol. 24, no. 2, pp. 267–277.
8. Bansal, K., and Saha, D., Chloroplast genomics and genetic engineering for crop improvement, *Agric. Res.*, 2012, vol. 1, no. 1, pp. 53–66.
9. Sytnik, E., Komarnitsky, I., Gleba, Yu., and Kuchuk, N., Transfer of transformed chloroplasts from *Nicotiana tabacum* to the *Lycium barbarum* plants, *Cell Biol Int.*, 2005, vol. 29, no. 1, pp. 71–75.
10. Kuchuk, N., Sytnyk, K., Vasylenko, M., Shakhovskiy, A., Komarnitsky, I., Kushnir, S., and Gleba, Yu., Genetic transformation of plastids of different *Solanaceae* species using tobacco cells as organelle hosts, *Theor. Appl. Genet.*, 2006, vol. 113, no. 3, pp. 519–527.
11. Nitovska, I.O., Shakhovskiy, A.M., Cherep, M.N., Gorodenska, M.M., and Kuchuk, N.V., Creation of cybrid transplastomic plants of *Brassica napus* with *Lesquerella fendleri* chloroplasts, *Cytol. Genet.*, 2006, vol. 40, no. 4, pp. 191–198.
12. Kushnir, S., Babiychuk, E., Bannikova, M., Momot, V., Komarnitsky, I., Cherep, N., and Gleba, Yu., Nuclear-cytoplasmic incompatibility in cybrid plants possessing an *Atropa* genome and a *Nicotiana* plastome, *Mol. Gen. Genet.*, 1991, vol. 225, no. 2, pp. 225–230.
13. Zubko, M.K., Zubko, E.I., Ruban, A.V., Adler, K., Mock, H.P., Misera, S., Gleba, Yu.Yu., Grimm, B., Extensive developmental and metabolic alterations

- in cybrids *Nicotiana tabacum* (+ *Hyoscyamus niger*) are caused by complex nucleo-cytoplasmic incompatibility, *Plant J.*, 2001, vol. 25, no. 6, pp. 627–639.
14. Sychjova, I.M., Triboush, S.O., Danilenko, N.G., and Davydenko, O.G., The collection of allo- and isoplasmic barley lines with PDRF-studied mitochondrial DNA, *Barley Genet. Newslett.*, 1998, vol. 28, pp. 9–11.
 15. Tsunewaki, K., Wang, G.Z., and Matsuoka, Y., Plasmon analysis of *Triticum* (wheat) and *Aegilops*. 1. Production of alloplasmic common wheats and their fertilities, *Genes Genet. Syst.*, 1996, vol. 71, no. 5, pp. 293–311.
 16. Gleba, Yu.Yu., and Sytnik, K.M., *Protoplast fusion*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1984.
 17. Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P., Stable transformation of plastids in higher plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, no. 21, pp. 8526–8530.
 18. Skarjinskaia, M., Svab, Z., and Maliga, P., Plastid transformation in *Lesquerella fendleri*, an oilseed *Brassicaceae*, *Transgenic Res.*, 2003, vol. 12, no. 1, pp. 115–122.
 19. Murashige, T., and Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.
 20. *Romeis – Mikroskopische Technik*, Munchen, 1989.
 21. Zarinkamar, F., Stomatal observations in dicotyledons, *Pak. J. Biol. Sci.*, 2007, vol. 10, no. 2, pp. 199–219.
 22. Skarzhinskaya, M., Landgren, M., and Glimelius, K., Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats, *Theor. Appl. Genet.*, 1996, vol. 93, no. 8, pp. 1242–1250.
 23. Tsunewaki, K., Genome-plasmon interactions in wheat, *Japan J. Genet.*, 1993, vol. 68, no. 1, pp. 1–34.
 24. Jones, P., Keane, E.M., and Osborne, B.A., Effects of alien cytoplasmic variation on carbon assimilation and productivity in wheat, *J. Exp. Bot.*, 1998, vol. 49, no. 326, pp. 1519–1528.
 25. Goloenko, I.M., Lukhanina, N.V., Shimkevich, A.M., Aksyonova, E.A., Danilenko, N.G., and Davydenko, O.G., The productivity characteristics of substituted barley lines with marked chloroplast and mitochondrial genomes, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2002, vol. 7, pp. 483–491.
 26. Ratushnyak, Ya.I., Kochevenko, A.S., Cherep, N.N., Zavgorodnyaya, A.V., Latypov, S.A., and Gleba, Yu.Yu., Alloplasmatic incompatibility in cybrid plants possessing a *Lycopersicon esculentum* Mill. genome and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. Plasmagenes, *Russ. J. Genet.*, 1995, vol. 31, no. 5, pp. 565–571.
 27. Zubko, M.K., Zubko, E.I., Patskovsky, Y.V., Khvedynich, O.A., Fisahn, J., Gleba, Yu.Yu., and Schieder, O., Novel ‘homeotic’ CMS patterns generated in *Nicotiana* via cybridization with *Hyoscyamus* and *Scopolia*, *J. Exp. Bot.*, 1996, vol. 47, no. 8, pp. 1101–1110.
 28. Evans, J.R., The relationship between carbon-dioxide-limited photosynthetic rate and ribulose-1,5-bisphosphate-carboxylase content in two nuclear-cytoplasm substitution lines of wheat, and the coordination of ribulose-bisphosphate-carboxylation and electron-transport capacities, *Planta*, 1986, vol. 167, no. 3, pp. 351–358.
 29. Kushnir, S.G., Shlumukov, L.R., Pogrebnyak, N.J., Berger, S., and Gleba, Yu., Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and an *Atropa* plasmome, *Mol. Gen. Genet.*, 1987, vol. 209, no. 1, pp. 159–163.
 30. Nakamura, C., Kasai, K., Kubota, Y., Yamagami, C., Suzuki, T., and Mori, N., Cytoplasmic diversity in alloplasmic common wheats with cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops* revealed by photosynthetic and respiratory characteristics, *Japan J. Genet.*, 1991, vol. 66, no. 4, pp. 471–483.
 31. Babychuk, E., Schantz, R., Cherep, N., Weil, J.H., Gleba, Yu., and Kushnir, S., Alterations in chlorophyll a/b binding proteins in *Solanaceae* cybrids, *Mol. Gen. Genet.*, 1995, vol. 249, no. 6, pp. 648–654.
 32. Kochevenko, A.S., Ratushnyak, Ya.I., Korneev, D.Yu., Stasik, O.O., Shevchenko, V.V., Kochubei, S.M., and Gleba, Yu.Yu., Photosynthetic apparatus in a cytoplasmic hybrid of cultured tomato carrying the nucleocytoplasmic incompatibility trait, *Russ. J. Plant Physiol.*, 1999, vol. 46, no. 4, pp. 474–481.
 33. Keane, E.M., and Jones, P.W., Effects of alien cytoplasm substitution on the response of wheat cultivars to *Septoria nodorum*, *Ann. Appl. Biol.*, 1990, vol. 117, no. 2, pp. 299–312.
 34. Goloenko, I.M., and Davydenko, O.G., Disturbance of Mendelian segregation. Effects of cytoplasmic organelle genomes, *Tsitologiya i genetika*, 2005, vol. 39, no. 1, pp. 71–81.
 35. Kinoshita, T., and Kihara, H., NC-heterosis expressed in the nuclear hybrids of common wheat having cytoplasm of *Aegilops squarrosa*, *Seiken Ziho*, 1982, vol. 30, pp. 1–8.

Received 11.11.15