

(19) C2 (11) 72420 (13) UA

(98) вул. Мішина, 4, кв. 39, м. Київ, 03151

(85) null

(74) Крилова Надія Іванівна, (UA)

(45) [2005-03-15]

(43) [1999-06-07]

(24) 2005-03-15

(22) 1997-05-27

(12) null

(21) 97052448

(46) 2005-03-15

(86)

(30) 1003239 1996-05-31 NL

(54) РОСЛИНА ВИДУ BRASSICA OLERACEA З ЧОЛОВІЧОЮ СТЕРИЛЬНІСТЮ І СПОСІБ ЇЇ ОТРИМАННЯ РАСТЕНИЕ ВИДА BRASSICA OLERACEA С МУЖСКОЙ СТЕРИЛЬНОСТЬЮ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ PLANT OF THE SPECIES BRASSICA OLERACEA WITH MALE STERILITY AND A METHOD OF OBTAINING THEREOF

(56) GB 2211205 , 28.06.1989 2 JP 01-218530, 31.08.1989 2 WO 9205251, 02.04.1992 2

(71)

(72) NL Бартен Пітер NL Бартен Пітер NL Бартен Пітер

(73) NL БЕЙО ЗАДЕН Б.В. NL БЕЙО ЗАДЕН Б.В. NL BEJO ZADEN B.V.

Растения *B. oleracea* с цитоплазматической мужской стерильностью, полученные путем слияния протопластов фертильных растений *B. parus* и *B. oleracea*. Согласно данному изобретению, полученные растения имеют митохондриальную ДНК от *B. parus*, которая в комбинации со специфической ядерной ДНК *B. oleracea* обеспечивает цитоплазматическую мужскую стерильность у *B. oleracea*.

Рослини *B. Oleracea* з цитоплазматичною чоловічою стерильністю, одержані шляхом злиття протопластів фертильних рослин *B. napus* та *B. oleracea*. Згідно з даним винаходом, отримані рослини мають мітохондріальну ДНК від *B. napus*, яка у комбінації зі специфічною ядерною ДНК *B. oleracea* забезпечує цитоплазматичну чоловічу стерильність у *B. oleracea*.

B. oleracea plant, whose cytoplasm is provided, via protoplast fusion, with mitochondria comprising DNA at least partially originating from a *B. napus* plant, and which is coupled to (the property of) cytoplasmic male sterility (CMS) (i.e. responsible for cytoplasmic male sterility in the *B. oleracea* plant), and whose cells are provided with species-specific nuclear genome being normal for this plant.

1. Рослина виду *Brassica oleracea* з чоловічою стерильністю, клітинна цитоплазма якої утворена соматичною гібридизацією через злиття протопластів і має отриману від фертильної рослини *Brassica napus* мітохондріальну ДНК, яка у комбінації зі специфічною ядерною ДНК *Brassica oleracea* спричиняє цитоплазматичну чоловічу стерильність у рослини виду *Brassica oleracea*.

2. Рослина за п. 1, яка **відрізняється** тим, що її вибрано з групи, яка складається з кольорової капусти (*Brassica oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.), брокколі (*Brassica oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. cymosa Duch.), капусти Романеско (*Brassica oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.), брюсельської капусти (*Brassica oleracea* L. convar. oleracea var. gemmifera DC.), білої капусти (*Brassica oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.), капусти "бичаче серце" або стрільчастої капусти (*Brassica oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.), червоної капусти (*Brassica oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.), савойської капусти (*Brassica oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. rabauda I.), кольрабі (*Brassica oleracea* L. convar. acephala (DC.) Alef. var. gangyloides), капусти курлікало (*Brassica oleracea* L. convar. acephala (DC.) Alef. var. sabelaca L.) і португальської капусти (*Brassica oleracea* var. tronchuda syn. costata).

3. Насіння або частини рослини виду *Brassica oleracea* з чоловічою стерильністю, клітинна цитоплазма яких утворена соматичною гібридизацією через злиття протопластів і має отриману від фертильної рослини *Brassica napus* мітохондріальну ДНК, яка у комбінації зі специфічною ядерною ДНК *Brassica oleracea* викликає цитоплазматичну чоловічу стерильність у рослини виду *Brassica oleracea*.

4. Насіння або частини рослини за п. 3, які **відрізняються** тим, що їх вибрано з групи, яка складається з кольорової капусти (*Brassica oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.), брокколі (*Brassica oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. cymosa Duch.), капусти Романеско (*Brassica oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.), брюсельської капусти (*Brassica oleracea* L. convar. oleracea var. gemmifera DC.), білої капусти (*Brassica oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.), капусти "бичаче серце" або стрільчастої капусти (*Brassica oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.), червоної капусти (*Brassica oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.), савойської капусти (*Brassica oleracea* Z. convar. capitaia (L.) Alef. var. rabauda I.), кольрабі (*Brassica oleracea* L. convar. acephala (DC.) Alef. var. gangyloides), капусти курлікало (*Brassica oleracea* L. convar. acephala (DC.) Alef. var. sabelaca L.) і португальської капусти (*Brassica oleracea* var. tronchuda syn. costata).

5. Клітина рослини виду *Brassica oleracea* з чоловічою стерильністю, цитоплазма якої утворена соматичною гібридизацією через злиття протопластів і має отриману від фертильної рослини *Brassica napus* мітохондріальну ДНК, яка у комбінації зі специфічною ядерною ДНК *Brassica oleracea* викликає цитоплазматичну чоловічу стерильність у рослини виду *Brassica oleracea*.

6. Спосіб отримання рослини виду *Brassica oleracea* з чоловічою стерильністю, який полягає в тому, що здійснюють злиття протопластів, яке закінчується соматичною гібридизацією з утворенням клітинної цитоплазми, що має отриману від фертильної рослини *Brassica napus* мітохондріальну ДНК, яка у комбінації зі специфічною ядерною ДНК *Brassica oleracea* викликає цитоплазматичну чоловічу стерильність у рослини виду *Brassica oleracea*, отримують мікрокалуси та з них регенерують рослину.

Изобретение в соответствии с основным положением формулы касается растения с цитоплазматической мужской стерильностью, *Brassica oleracea*, т.е. разработки новых родительских линий такого растения. Кроме этого, изобретение касается способа получения указанного мужского стерильного растения, равно как и семян гибридов, полученных от новых родительских линий.

На протяжении столетий культуры *Brassica* выращивают в качестве пищевых культур, тогда как их семена служат основой для различных пищевых продуктов (растительного масла, горчицы и т.д.)

Гибридные семена различных овощных культур *Brassica* продаются с 1970 года. Эти семена дают гибридные растения *Brassica*, которые, будучи продуктом скрещивания двух строго инбредных родительских линий, сочетают их генетические свойства. Если одна или обе родительских линии является (являются) (частично) самоопыляющимися, для получения чистых гибридных растений *Brassica* необходимо принимать меры, предохраняющие от самоопыления. Одна из таких мер, препятствующих самоопылению, опирается на так называемую самонесовместимость одной или обеих родительских линий. Этим способом предупреждают возможность роста плодовой пыльцы в пестике специфических растений, включая пестик самих производящих пыльцу растений *Brassica*. Недостатком данного метода является то, что в некоторых случаях самоопыление все-таки происходит. В результате этого урожай семян приобретает большой процент инбредности. Другая мера, предупреждающая самоопыление той или другой родительской линии, основана на использовании цитоплазматической мужской стерильности (CMS). У редьки (*Raphanus sativus*) была обнаружена цитоплазма, индуцирующая мужскую стерильность, данная цитоплазма также известна как *Ogura* CMS-цитоплазма. Посредством слияния протопластов митохондрии *Ogura* CMS-цитоплазмы вводят в растения *Brassica oleracea*, в то время как ядра поступают из нормальных плодовых растений *B. oleracea*. Таким способом получают CMS *B. oleracea*-растения. Хлоропласты *Ogura* CMS-цитоплазмы, содержащие ДНК, ответственную за чувствительность растений с этой цитоплазмой к холоду, отделяли в процессе слияния.

Целью настоящего изобретения является получение растений *B. oleracea* с цитоплазматической мужской стерильностью, для которых были бы преодолены указанные выше недостатки, что явилось бы альтернативой использованию *Ogura* CMS-цитоплазмы, и достижение этой цели предусматривает получение цитоплазмы этих растений, используя слияние протопластов, с митохондриями, содержащими ДНК, источником которой по меньшей мере частично является растение *Brassica napus* и которая связана (свойством которой является) с мужской цитоплазматической стерильностью; иными словами, которая ответственна за цитоплазматическую мужскую стерильность в растении *B. oleracea*. Интенсивные исследования неожиданно показали, что несмотря на то, что растения *B. napus* являются нормально плодовитыми, слияние протопластов может эффективно вызывать цитоплазматическую мужскую стерильность у растений *B. oleracea* в результате использования надлежащей митохондриальной ДНК растений *B. napus*. Указанное выше слияние протопластов предпочтительно проводят, используя, с одной стороны, протопласты клеток листьев растений *B. napus* (донор), а с другой - протопласты клеток гипокотыла растений *B. oleracea* (акцептор).

В предпочтительном воплощении в соответствии с данным изобретением кроме того получают цитоплазму растения *B. oleracea* с видоспецифичным ядерным геномом, обычным для этого растения. Это делает ее на 100 % чистым продуктом.

В другом воплощении в соответствии с данным изобретением клетки включают видоспецифичные митохондрии из *B. napus*.

В следующем воплощении в соответствии с данным изобретением видоспецифичные митохондрии вводят посредством соматической гибридизации. При клеточном слиянии кодируемый ядрами генетический состав растений, получающих цитоплазму, остается неизменным (предпочтительно полностью). Так как цитоплазма, имеющая нужный состав, получается в один ход, обратное скрещивание, следовательно, не является необходимым. На практике стало очевидным, что растения *B. oleracea*, полученные после слияния протопластов, часто являются тетраплоидными или анеуплоидными. Уровни плоидности могут посредством этого возрастать более, чем в 10 раз, где С-гаплоидный геном. Растения с не-диплоидным геномом характеризуются тем, что их рост различен, и тем, что у них имеет место как мужская, так и женская стерильность. Применение проточной цитометрии удаляет все нечистые диплоидные растения из популяции растений *B. oleracea*, полученной посредством слияния. Вслед за слиянием диплоидные растения являются объектом молекулярного анализа, в результате которого устанавливают, какие из растений содержат митохондриальную ДНК (или ее фрагмент), о которой известно, что она наиболее генетически близка к CMS.

В дальнейшем воплощении в соответствии с данным изобретением растение *B. oleracea* выбирается из группы, состоящей из:

- капусты цветной (*B. oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.);
- брокколи (*B. oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. cymosa Duch.);
- Романской (*B. oleracea* L. convar. botrytis (L.) Alef. var. botrytis L.);
- капусты брюссельской (*B. oleracea* L. convar. oleracea (L.) Alef. var. gemnifera DC.);
- капусты белокочанной (*B. oleracea* L. convar. capitata fL.) Alef. var. alba DC.);
- капусты "бычье сердце" (*B. oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. alba DC.);
- капусты краснокочанной (*B. oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. rubra DC.);
- капусты савойской (*B. oleracea* L. convar. capitata (L.) Alef. var. sabauda L.);
- капусты полевой (*B. oleracea* L. convar. acephala (DC.) Alef. var. gonqyioides);
- капусты бахромчатой (*B. oleracea* L. convar. acephala (DC.) Alef. var. sabellica L.);
- капусты португальской (*B. oleracea* var. tronchuda syn. costata).

Данное изобретение также касается семян или частей растений по изобретению.

Данное изобретение кроме того касается клетки растения *B. oleracea*, цитоплазму которой получают (через слияние протопластов) с митохондриями, содержащими ДНК, источником которой по меньшей мере частично является растение *B. napus* и которая связана (свойством которой является) с мужской цитоплазматической стерильностью (CMS) (т.е. которая ответственна за цитоплазматическую мужскую стерильность в растении *B. oleracea*). Гибридная клетка содержит митохондриальную ДНК, являющуюся носителем цитоплазматической мужской стерильности (CMS).

Данное изобретение также касается способа получения растения *B. oleracea*, включающего этап получения через слияние протопластов цитоплазмы его клеток с митохондриями, имеющими ДНК по меньшей мере

частично происходящую из растения *B. parus* и которая связана (свойством которой является) с мужской цитоплазматической стерильностью (CMS) (т.е. которая ответственна за цитоплазматическую мужскую стерильность Э растения *B. oleracea*).

Семена обоих растений *B. parus* (донор) и *B. oleracea* (акцептор) стерилизуют и проращивают на среде MS30 или ей подобной; для донора это делается на свету, растения выдерживают в продолжение прорастания побегов и переносят их на свежую питательную среду. Семена акцептора проращивают в темноте; используют гипокотиль из полученных этиолированных проростков. Протопласты получают обработкой материала листьев и/или гипокотили ферментами, растворяющими клеточную стенку, как например пектиназа и целлюлаза, после предплазмолиза, который проходит в плазмолитическом растворе. После фильтрации и центрифугирования протопласты донора облучают гамма-лучами. Протопласты акцептора обрабатывают 10А, после чего обе группы протопластов подвергают слиянию. В процессе слияния для усиления агглютинации используют PEG; существенным в процессе слияния является высокое значение pH. Во время слияния протопласты оставляют в покое, чтобы не мешать процессу. По окончании слияния раствор PEG отмывают и заменяют на среду для регенерации. Регенерацию протопластов проводят в этой среде, посредством чего исключительно важным является наличие Сахаров, как например сахароза, и гормонов типа 2,4-D, BA и NAA и тому подобным. Во время регенерации осмотическое давление среды для регенерации поэтапно снижают соответственным добавлением среды, содержащей более низкую концентрацию сахарозы. Развивающийся микрокаллус переносят на твердую среду для регенерации. Каждые две недели указанный каллус переносят на свежую среду для регенерации. Вновь развившиеся побеги помещают на среду для корней, усиливающей вкоренение с помощью фитогормона, подобного IAA. Регенерированные растения проверяют на их уровень плоидности путем отбора образцов и определения относительного содержания ядерной ДНК на проточном цитометре. Растения, содержащие чистый диплоидный геном, сохраняют, остальные уничтожают. Оставшиеся растения подвергают дальнейшему анализу с помощью молекулярно-биологических методик. Используя ДНК, выделенную из образцов листьев, и зонд, специфичный к митохондриальной ДНК, исследуют, нужные ли митохондрии присутствуют в растении. Растения, содержащие цитоплазму акцептора (считающиеся полученными за счет "утечки" материала), уничтожают. Оставшиеся растения репродуцируют путем скрещивания и изучают на возможность их использования в парниковых и полевых условиях. Таким вопросам, как стерильность, образование семян и качество растений, уделяют особое внимание.

Далее настоящее изобретение будет разъяснено посредством нижеследующих примеров, все из которых являются предпочтительными воплощениями изобретения.

Пример 1. Стерилизация поверхности семян

Семена капусты (*B. oleracea*) завертывают в фильтровальную бумагу и погружают на 10 секунд в смесь, содержащую 70% этанола и 30% воды, с последующим погружением на 5 минут в стерильную воду при 55°C. Эту обработку продолжают следующей обработкой 0,3% (в/о) NaOCl + Твин 80 в течение 20 минут; данный процесс проводят в шкафу с ламинарным потоком.

По окончании этой обработки пакет с семенами трижды промывают стерильной водой в течение 5, 5 и 10 минут, соответственно.

Пример 2. Посев родительского (стартового) материала для получения протопластов из гипокотили

По окончании последнего этапа промывки пакет с семенами открывают и помещают в контейнер со средой 1/2 MS15. Контейнеры держат в темноте при температуре 25°C. Приблизительно через 7 дней гипокотили могут быть использованы для выделения протопластов.

Пример 3. Посев родительского (стартового) материала для получения протопластов из листьев

Стерилизованные семена высевают в соответствии с процедурой, описанной в Примере 2. Контейнеры помещают на свет при температуре 25°C. Через 14-28 дней листья растений могут быть использованы для получения протопластов; кончики побегов растений помещают в свежую ВВ; контейнеры хранят при 25°C на свету. Для выделения протопластов используют полностью выросшие листья.

Пример 4. Выделение протопластов

Материал листьев и гипокотили разрезают на маленькие кусочки и помещают в стеклянные чашки Петри (диаметром 11 см) или чашки Петри для культур тканей (ТС, диаметром 9 см), содержащие тонкий слой (12 мл) плазмолизирующего раствора. После этого к ним добавляют другие 12 мл плазмолизирующего раствора.

Чашки Петри завертывают в алюминиевую фольгу и оставляют в шкафу с ламинарным потоком по меньшей мере на один час.

По истечении указанного часа плазмолизирующий раствор заменяют приблизительно на 24 мл свежеприготовленного ферментного раствора.

Все это хранят в течение ночи в алюминиевой фольге при 25°C; ферментную смесь для получения протопластов гипокотили помещают на шейкер, а для получения протопластов листьев, наоборот, не помещают. Шейкер устанавливают на 30 об/мин с амплитудой 15 мм.

По окончании инкубации суспензии фильтруют на тefлоновом фильтродержателе через два нейлоновых фильтра 110 мкм и 53 мкм, соответственно. Фильтры повторно прополаскивают 1/3 объема CPW16 (± 8 мл).

Суспензии центрифугируют при 110хg в течение 5 минут.

Образовавшиеся небольшие слои, содержащие протопласты, отсасывают с помощью стерильной пастеровской пипетки и переносят в новую пробирку для центрифугирования. После аккуратного добавления 9 мл W5 суспензию протопластов центрифугируют при 75хg в течение 5 минут.

Протопласты листьев в дальнейшем обрабатывают следующим образом: выливают супернатант из различных центрифужных пробирок, а осадки тщательно ресуспендируют в 1-2 мл W5. Содержимое различных центрифужных пробирок объединяют и добавляют W5 до общего объема, равного 10 мл.

Центрифужную пробирку, содержащую протопласты (донор), закрывают Парафильмом, заворачивают в алюминиевую фольгу и помещают в лед до проведения облучения в 50 кРад.

Протопласты гипокотили обрабатывают следующим образом: выливают супернатант из различных центрифужных пробирок, а осадки тщательно ресуспендируют в 1-2 мл W5 + 2 mM IOA (4°C). Содержимое различных центрифужных пробирок объединяют, доводят до общего объема, равного 10 мл, с помощью W5 + 2 mM IOA и затем инкубируют в холодильнике при 4°C в течение 10 минут.

После этого суспензию центрифугируют при 75хg в течение 5 минут (таким образом, полное время инкубации с IOA составляет 15 минут).

Осадок ресуспендируют в 1-2 мл W5 и суспензию доводят до общего объема, равного 10 мл, с помощью W5, после чего содержимое переносят в стерильную емкость вместимостью 50 мл. Эту емкость, завернутую в алюминиевую фольгу, инкубируют при 25°C на шейкере (приблизительно 30 об/мин; амплитуда 15 мм) в течение того периода времени, пока протопласты облучают. Вслед за этим содержимое емкости переносят в центрифужную пробирку.

Обе пробирки с протопластами листьев и гипокотыля центрифугируют при 75хg в течение 5 минут, после чего осадок ресуспендируют в 1-3 МЛ W5.

Плотность суспензий протопластов определяют с помощью гемоцитометра.

Пример 5. Слияние протопластов

Протопласты из обеих суспензий объединяют вместе для слияния, получая суспензию с плотностью $9 \cdot 10^5$ протопластов/мл.

С помощью микролитровой пипетки на чашки Петри переносят капли объемом 40 мкл: 11 капель по 40 мкл - на чашку Петри диаметром 6 см или 25 капель по 40 мкл - на чашку Петри диаметром 9 см.

Чашки закрывают крышкой, после чего выключают освещение и отключают на 15 минут шкаф с ламинарным потоком, давая возможность протопластам прикрепиться к поверхности чашек Петри.

Снова включают шкаф с ламинарным потоком и к каждой капле протопластов добавляют по 60 мкл PEG-раствора.

Через 3-5 минут в чашки Петри добавляют следующие количества SV I:

4 мл в чашку диаметром 6 см,

9 мл в чашку диаметром 9 см.

Через 3-5 минут раствор отсасывают и в чашки добавляют SV II:

4 мл в чашку диаметром 6 см,

9 мл в чашку диаметром 9 см.

Через 3-5 минут раствор отсасывают и в чашки аккуратно добавляют 8р:

4 мл в чашку диаметром 6 см,

9 мл в чашку диаметром 9 см.

Важно добавлять 8р аккуратно для того, чтобы не допустить преждевременное отделение протопластов от дна чашки Петри.

Через 3-5 минут 8р-среду отсасывают и в чашки добавляют новую 8р-среду. Теперь протопласты могут сами отделяться от дна чашек Петри:

4 мл в чашку диаметром 6 см,

9 мл в чашку диаметром 9 см.

Чашки Петри запечатывают при помощи Парафильма и хранят при освещении приблизительно 500 люкс.

Пример 6. Регенерация

На восьмой день после слияния в чашки Петри добавляют 8рА в количестве, увеличивающем в три раза исходный объем:

8 мл в чашку диаметром 6 см,

18 мл в чашку диаметром 9 см.

Чашки Петри помещают на свет.

На пятнадцатый день после слияния микрокаллус, который образовался на дне чашек, аккуратно соскребают с помощью стерильного шпателя. Содержимое чашек Петри распределяют в четыре центрифужных пробирки с помощью пипетки на 10 мл и центрифугируют при 75хg в течение 5 минут.

Тем временем 6 мл среды K₃PP3-V вносят в четыре новых чашки Петри с помощью пипетки. По окончании центрифугирования супернатант выливают, а к осадку добавляют 6 мл среды K₃PPS-V. Осадок состоит из делящихся клеток и микрокаллуса и может легко быть ресуспендирован в среде K₃PPS-V. Среду и осадок отсасывают с помощью пипетки на 10 мл и переносят на чашки Петри. На 21 день после слияния образовавшийся микрокаллус из среды K₃PPS-V инокулируют в среду K₃PPS-R. Растущий (микро)каллус переносят в свежую среду K₃PPS-R каждые 2 недели.

Как только каллус даст побеги, его переносят в контейнеры с K₃PPS-R-средой. Как только побеги становятся достаточно большими, их собирают и помещают в среду для выращивания корней (BB-среду).

Пример 7. Измерения с помощью проточной цитометрии. Отбирают необходимые для анализа образцы листьев, приблизительно равные по площади 1см², и помещают их в 2 мл раствора DAPI. Этот образец разрезают на маленькие кусочки острым лезвием бритвы и фильтруют через 15 мкм фильтр. Измерения проводят на клеточном анализаторе Partec CA-II по методу De Laat et al. Относительное содержание ДНК в растениях определяют, сравнивая положения пиков растений, полученных в результате слияния, с таковыми диплоидных растений.

Пример 8. Молекулярные определения

Растения *B. oleracea* с цитоплазматической мужской стерильностью, полученные посредством соматической гибридизации, отличаются от растений *B. oleracea* с другой цитоплазмой (других видов капусты, включая содержащие цитоплазму *ogura*, *anand* или *polima*) с помощью ДНК-зонда. Этот зонд состоит из фрагмента митохондриальной ДНК, выделенной из фенотипически стерильных растений (CMS), и после расщепления с помощью *EcoRI* клонированного в *Escherichia coli*. Данный фрагмент характеризуется тем, что он может быть вырезан из плазмидной ДНК *E. coli* с помощью *EcoRI* и специфически гибридизован с митохондриальной ДНК из капусты (см. Фиг.).

В пробирку для проведения реакции отбирают необходимый для анализа материал листьев растений в количестве 200 мг и замораживают в жидком азоте. В эти пробирки добавляют 750 мкл буфера для экстракции и материал гомогенизируют при помощи Potterstick. Образец центрифугируют при 13000хg в течение 10 минут и супернатант, содержащий материал зеленого цвета, аккуратно сливают. К осадку добавляют 125 мкл буфера для экстракции, после ресуспендирования добавляют 135 мкл лизирующего буфера и 60 мкл раствора лаурилсаркозина. После краткого перемешивания смесь нагревают до 60°C в течение 20 минут. В пробу добавляют 375 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт и реакционную пробирку встряхивают в течение по

меньшей мере 40 минут. Далее отцентрифугировать при 13000хg в течение 10 минут, перенести верхнюю фракцию в новый реакционный сосуд и при необходимости повторить еще раз этап обработки CHCl_3/IAA . И наконец добавить 500 мкл изопропанола и встряхивать реакционные пробирки в течение нескольких минут. Отцентрифугировать при 13000хg в течение 5 минут. Осадок ресуспендировать в 500 мкл ТЕ-буфера.

Расщепление ДНК эндонуклеазой рестрикции проводят следующим образом. Для RFLP-анализа необходимо приблизительно 4 мкг ДНК. Окончательный раствор, в котором проходит рестрикция, состоит из 0,1 объема универсального буфера для рестрикции, подобного One-Phor-All Buffer PLUS (Фармация), 4 мкг ДНК, 4 мМ спермидина и 2 единиц рестрикционного фермента. Инкубацию проводят при 37°C по меньшей мере в течение 3 часов.

Реакцию останавливают изменением концентрации EDTA до 10 мМ, используя концентрированный раствор. ДНК осаждают добавлением 0,1 объема 3 М NaAc и 2,5 объема этанола при -20°C. Смесь выдерживают при -20°C в течение 2 часов; после центрифугирования при 10000хg в течение 10 минут осадок промывают ледяной смесью 70% этанол/вода, высушивают и растворяют в ТЕ-буфере.

Электрофорез в агарозном геле фрагментов ДНК, которые надо разделить, проводят следующим образом: взвешивают 2 г агарозы и кипятят в 250 мл TAE-буфера. После охлаждения до теплого состояния добавляют этидибромид до конечной концентрации 0,5 мг/л. Гель выливают и охлаждают до тех пор, пока он не затвердеет. Образцы наносят в буфере для нанесения и разделяют фрагменты ДНК. Процесс электрофоретического разделения заканчивают, когда фронт красителя BFB (бромфенолового голубого) достигает приблизительно 1 см от верхнего края геля.

При подготовке к проведению блоттинга гель обрабатывают следующим образом.

- 5 минут в 0,25 М HCl (1х),
- 15 минут в 0,5 М NaOH/1,5 М NaCl (2х),
- 10 минут в 1 М NH_4AC /20 ММ NaOH (2х).

Hybond-мембрану (Amersham) вырезают по размерам геля и смачивают, погружая на несколько секунд в 2хSSC, а затем в 1 М NH_4AC /20 ММ NaOH. По этому размеру вырезают три куса фильтровальной бумаги Ватман 3ММ. Собирают устройство, в котором посредством перетекания жидкости ДНК переносится с геля на мембрану в течение 4 часов. Перенос происходит в 1 М NH_4AC /20 ММ NaOH. После высушивания мембраны ДНК связывают с обеими сторонам мембраны, облучая УФ-лучами в течение 1 минуты.

Нужную пробу ДНК метят следующим образом: перенесенную ДНК денатурируют нагреванием при 95°C в течение 10 минут и быстрым охлаждением во льду. В реакционном сосуде смешивают следующие составляющие:

- 10 нг-3 мкг ДНК,
- 2 мкл гексануклеотидной смеси,
- 2 мкл dNTP (с дигоксигенин-dUTP),
- 1 мкл полимеразы Кленова.

После перемешивания смесь инкубируют в течение ночи при 37°C. ДНК осаждают добавлением 2 мкл 3 М NaAc и 44 мкл этанола (96%). Смесь помещают на 30 минут при -20°C. После центрифугирования при 10000хg в течение 15 минут осадок промывают 70% этанолом в воде (о/о) и высушенный осадок растворяют в 50 мкл ТЕ.

Гибридизация меченых фрагментов с мембраной: мембрану помещают в 2хSSC на несколько секунд. После этого мембрану герметично закрывают в емкости, содержащей 20 мл предгибризационной смеси. Мембрану инкубируют по меньшей мере в течение одного часа при температуре 60-65°C. Предгибризационную смесь удаляют, заменяют 4 мл гибризационной смеси и проводят инкубацию в течение ночи. По окончании инкубации мембрану промывают: 4 раза по 2 минуты в отмывающем растворе 1; 4 раза по 2 минуты в отмывающем растворе 2 и два раза по 15 минут в отмывающем растворе 3 (при 60-65°C).

Детектирование меченых зон проводят при комнатной температуре, блот ополаскивают в буфере для ополаскивания 1 и затем герметично закрывают в буфере для ополаскивания 2 (10 мл буфера 2 на 100 см² мембраны). По окончании инкубации на шейкере длительностью 30 минут буфер для ополаскивания 2 заменяют на анти-dig-раствор (15 мл на 100 см² мембраны). По окончании инкубации на шейкере длительностью 30 минут мембрану промывают: 2-3 раза в продолжение 10 минут в буфере для ополаскивания 2, 3-4 раза в продолжение 10 минут в буфере для ополаскивания 1 и один раз в буфере для ополаскивания 3. Мембрану инкубируют с раствором AMPPD (10 мл на 100 см² мембраны) в течение 20 минут. Мембрану помещают в кассету с поляроидной пленкой вверх; после необходимой экспозиции пленку вынимают и обрабатывают.

Пример 9. Описание фенотипа цветка растения с цитоплазматической мужской стерильностью *B. oleracea* с митохондриями из *Brassica napus*

Цветорасположение: главная ось грозди направлена вверх, иногда укорочена или собрана в пучки, часто разветвлена. Прицветники присутствуют редко, иногда повернуты и скручены. Черешки иногда укорочены или собраны в пучки.

Цветочный бутон: чаще закрыт, иногда открыт, стороны чашелистиков не соприкасаются друг с другом и остаются сложенными. Поверхность от ровной до выпуклой, верхушка в основном завернута внутрь, иногда заострена. Пестик часто перерастает верхнюю часть.

Цветок: чашелистики шириной 1-4 мм, длиной 4-12 мм, прямые, часто слегка повернуты, стороны иногда загнуты внутрь, верх загнут внутрь. Присутствуют медоносные железы. Лепестков 4, иногда много больше - до 40, ширина 4-7 мм, длина 11-19 мм. При количестве равном 4 внутренние лепестки часто более короткие. Nail может на вид быть собран в трубочку. Пластика в основном не загнута назад, часто сильно повернута в сторону, иногда сильно закручена. Цвет верхней стороны белый или желтый RHS 2A-3A-2C-3C-4A-5A-5B-6A, нижняя сторона белая или желтая RHS 2A-2B-2C-3A-3C-4B-4C-4A, край верхушки часто ровный, иногда с зазубринами. Тычинок 6 то 2 и в том случае иногда собраны 2 by 2, длина до половины длины чашелистиков, иногда такой же длины как чашелистики. Пыльники небольшие и треугольные, пыльца не присутствует. Пестик один, иногда до трех, один длиннее других, в основном прямой, без опыления часто вырастает длиной приблизительно 30 мм. Bill и пестик иногда изогнуты, иногда слабо выпячены. Завязь часто свернута и скручена.

Цветок на вершине грозди иногда совсем без чашелистиков, лепестков и тычинок и с сильно скрученными и свернутыми завязями или по виду собраны 2 by 2; расщепление раскрыто вдоль образованного шва, напоминающее лист на прицветнике с параллельным расположением жилок.

Дополнительные растворы для клеточной биологии:

раствор ферментов:

1% (в/о) целлюлаза R-10 в K₃PPS-1

0,1% (в/о) пектиназа в K₃PPS-1

pH=5,6

раствор PEG:

266,7 мМ PEG1500

300 мМ глюкоза

50 мМ CaCl₂·2H₂O

pH=7,0

SV I:

50 мл раствора PEG + 100 мл предплазмолизирующего раствора

SV II:

20 мл раствора PEG + 100 мл предплазмолизирующего раствора 10A (иодацетамид)

2 мМ 10A в W5; pH=5,6

1% раствор агарозы в MilliQ-воде.

Растворы для молекулярной биологии:

буфер для экстракции:

350 мМ сорбитола

100 мМ Трис-основания

5 мМ EDTA

добавить свежеприготовленным: 20 мМ Na-бисульфита лизирующий буфер:

20 мМ Трис-основания

50 мМ EDTA

2% (в/о) СТАВ

N-лаурилсаркозина натриевая соль: 10% (в/о)

хлороформ/изоамиловый спирт: 24:1 (о/о)

изопропанол

TE: 10 мМ Трис-HCl; pH 8,0

1 мМ EDTA

4 мМ спермидин

Концентрированный раствор EDTA: 1 М

3 М NaAc

этанол 96%

70% этанол/вода (о/о)

раствор этидийбромид: 10 мг/мл H₂O

ТАЕ-буфер:

4,84 грамма Трис-основания/л

1,14 мл уксусной кислоты

10 мМ EDTA; pH 8,0

буфер для нанесения:

24% Ficoll 400

0,1% SDS

0,1% ксилолцианол

0,1% бромфеноловый синий

0,25 М HCl

0,5 М NaOH/1,5 М NaCl

1 М NH₄AC/20 мМ NaOH

2xSSC:

30 мМ Na-цитрат·2H₂O; pH 7,2

300 мМ NaCl

0,2xSSC: разбавленный в 10 раз 2xSSC

0,1xSSC: разбавленный в 20 раз 2xSSC

гексануклеотидная смесь: сконцентрированная в 10 раз гексануклеотидная смесь от Boehringer Mannheim

dNTP:

0,1 мМ dATP

0,1 мМ dCTP

0,1 мМ dGTP

0,65 мМ dTTP

0,35 мМ дигоксигенин-dUTP (Boehringer)

блокирующий реагент: Boehringer Mannheim; арт. номер 1175041 предгибризационная смесь:

75 мМ Na-цитрат

750 мМ NaCl

0,5% блокирующий реагент

0,1% N-лаурилсаркозин (в/о)

0,2% SDS

гибризационная смесь:

75 мМ Na-цитрат

750 мМ NaCl

0,5% блокирующий реагент

0,1% N-лаурилсаркозин

0,2% SDS

40-50 нг пробы меченого дигоксигенин-dUTP/мл

отмывающий раствор 1: 2xSSC + 0,1% (в/о) SDS

отмывающий раствор 2: 0,2xSSC + 0,1% (в/о) SDS
отмывающий раствор 3: 0,1xSSC + 0,1% (в/о) SDS
буфер для ополаскивания 1:
100 мМ Трис-HCl pH 7,5
150 мМ NaCl
буфер для ополаскивания 2:
буфер для ополаскивания 1
0,5% блокирующий реагент (свежеприготовленный)
буфер для ополаскивания 3:
буфер для ополаскивания 1
50 мМ MgCl₂
конъюгат анти-dig-AP: Boehringer Mannheim; арт. номер 1175041 раствор AMPPD: 10 мкл AMPPD в мл
буфера 3 для ополаскивания (0,26 мкМ)

Используемые сокращения:

2,4D: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
двузамещенный 3-(4-метоксиспиро{1,2-

AMPPD: диоксетан-3,2'-трицикло-
[3.3.1.1^{3,7}]декан}-4-ил)фенилфосфат
натрия

AP: кислая фосфатаза

BA: 6-бензиламинопурин

CMS: цитоплазматическая мужская
стерильность

DIG: дигоксигенин

dATP: дезоксиаденозинтрифосфат

dCTP: дезоксицитозинтрифосфат

dGTP: дезоксигуанинтрифосфат

dNTP: дезоксинуклеотидтрифосфат

dTTP: дезокситининтрифосфат

dUTP: дезоксиурацилтрифосфат

EDTA: этилендиаминтетрауксусная кислота

g: ускорение свободного падения (9,8 м/с²)

IOA: иодацетамид

кРад: 1000 Рад, единица ионизирующего
облучения

мкг: микрограмм

мкл: микролитр

мМ: миллимолярный

мкМ: микромолярный

М: молярный

MS: Murashige & Skoog

NAA: нафталинуксусная кислота

PEG: полиэтиленгликоль

pH: мера кислотности

rpm: обороты в минуту

SSC: соль цитрат натрия

SDS: додецилсульфат натрия

TC: культура ткани

UV: ультрафиолет

0/0: объем/объем

в/о: вес/объем

Почти для всех процедур может быть сформулировано, в каких пределах необходимо поддерживать pH, концентрацию и т.д. и на каком уровне следует проводить эксперименты на практике. Три уровня для этих растворов/процедур даны ниже:

среды для культур тканей:

1/2MS15, MS30 в BB:

сахар, например сахароза; концентрация 0,5-600 мМ, в норме 200-400 мМ.

pH 5-10; обычно 5,5-6,0;

температура культивирования: 22-27°C, в норме 25°C;

облучение: 0-60 кРад; в норме 50 кРад;

температура, при которой проводят слияние: 20-25°C; обычно 22°C;

концентрации растительных гормонов: 0-10 мкМ; в норме 0-3 мкМ.

Необходимые растворы для слияния клеток:

	CPW16	W5	предплазмолиз	плазмолиз	K3PPS- 1	K3PPS- V	K3PPS- R	8P	8PA	1/2MS15	MS30	BB
KNO ₃ (mM)	10	-	...	-	24.73	24.73	24.73	18.80	18.80	9.40	18.79	1879
NH ₄ NO ₃ (mM)	-	-	...	-	3.13	3.13	3.13	7.49	7.49	10.3	20.61	20.61
FeNaEDTA (mM)	-	-	.	-	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.20
MgSO ₄ 7H ₂ O (mM)	1.0	-	-	-	1.01	1.01	1.01	1.22	1.22	0.75	1.50	1.50

CaCl ₂ (mM)	10	125	50	60	2.00	2.00	2.00	4.08	4.08	1.50	2.99	2.99
KCl (mM)	-	10.7	-	-	-	-	-	4	4	-	-	-
NaCl (mM)	-	154	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (mM)	0.2	-	-	-	-	-	-	1.25	1.25	0.63	1.25	1.25
NaH ₂ PO ₄ (mM)	-	-	-	-	1.09	1.09	1.09	-	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)	-	-	-	-	1.01	1.01	1.01	-	-	-	-	.
H ₂ BO ₃ (μM)	-	-	-	-	48.62	48.52	48.52	48.52	48.52	0.10	0.10	0.10
CuSO ₄ ·5H ₂ O (μM)	0.10	-	-	-	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
MaSO ₄ H ₂ O (μM)	-	-	-	-	69.16	59.16	59.16	59.16	59.16	0.10	0.10	0.10
K ₁ (μM)	0.97	-	-	-	6.00	6.00	6.00	4.52	4.52	5.00	5.00	5.00
NaMnO ₄ ·2H ₂ O (μM)	-	-	-	-	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (μM)	-	-	-	-	6.96	6.96	6.96	6.96	6.96	29.91	29.91	29.91
CaCl ₂ ·6H ₂ O (μM)	-	-	-	-	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
глицин (мкМ)	-	—	.	-	-	-	-	-	-	26.64	26.64	26.64
миоинозит (мкМ)	-	-	-	-	-	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
пиридоксин HCL (μM)	-	-	-	-	4.86	4.86	4.86	4.86	4.86	2.43	2.43	2.43
тиамин HCl (μM)	-	-	-	-	29.65	29.65	29.65	29.65	29.65	0.30	0.30	0.30
никотиновая кислота (μM)	-	-	-	-	8.12	8.12	8.12	8.12	8.12	4.06	4.06	4.06
Na-пируват (μM)	-	-	-	-	-	-	-	181	181	-	-	-
лимонная кислота	-	-	-	.	-	-	-	208	208	-	-	-

	CPW16	W6	предплазмолиз	плазмолиз	K3PPS-1	K3PPS-V	K3PPS-R	8P	8PA	1/2MS15	MS30	BB
яблочная кислота (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	298	298	.	-	.
фумаровая кислота (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	344	344	-	-	-
аскорбиновая кислота (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	5.7	5.7	-	-	-
глюкоза (мкМ)	-	5.55	-	-	-	-	-	379	379	-	-	-
фруктоза (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	1.39	1.39	-	-	.
рибоза (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	1.67	1.67	-	-	-
манноза (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	1.39	1.39	-	-	-
рамноза (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	1.52	1.52	-	-	-
целлобиоза (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	0.73	0.73	-	-	-
сорбит (мкМ)	-	-	50	300	-	-	-	1.37	1.37	-	-	-
маннит (мкМ)	-	-	-	-	-	-	-	1.37	1.37	-	-	-
гидролизат казеина (мг/л)	-	-	-	-	-	-	-	250	250	-	-	-
сахароза (мм)	467	-	-	-	400	100	30	0.73	0.73	43.82	43.82	43.82
ксилоза (мм)	-	-	-	-	1.67	1.67	1.67	1.67	1.67	-	-	-
молоко из кокосового ореха (мл/л)	-	-	-	-	-	-	-	20	20	-	-	-
2,4D (μM)	-	-	-	-	0.45	0.45	-	4.5	.	-	-	.
BA (μM)	-	-	-	-	4.4	4.4	2.2	2.2	-	-	-	-
NAA (μM)	-	-	-	-	0.13	0.13	-	0.49	-	.	-	-
IAA (μM)	-	-	-	-	-	-	0.57	-	,	-	-	5.71
зеатин (μM)	-	-	-	-	-	-	2.28	-	-	-	-	-
агароза(%(B/O)	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
агар (% (B/O)	-	-	-	-	-	-	0.7	-	-	0.7	0.7	0.7
pH	Окружающей	5.6	7.0	6.4	5.6	5.6	5.6	5.6	5.6	5.8	5.8	6.0

