

УДК 577

М.Ю. ВАСИЛЕНКО, И.К. КОМАРНИЦКИЙ,
Л.А. САХНО, Ю.Ю. ГЛЕБА, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
Украины НАН, Киев

**ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ
МЕЖРОДОВЫХ СОМАТИЧЕСКИХ
ГИБРИДОВ МЕЖДУ *BRASSICA NAPUS*
И ЛИНИЕЙ ТИПА «ALBINO»
*ORYCHOPHRAGMUS VIOLACEUS***



Хлорофиллдефектная линия типа «albino» получена для *Orychophragmus violaceus* с использованием спектиномицина. Соматическую гибридизацию между *Orychophragmus violaceus* и *Brassica napus* осуществляли путем слияния зеленых мезофильных протопластов рапса и каллусных протопластов линии «albino» *O. violaceus*. По типу регенерации и способности к позеленению отобрано около двух сотен растений-регенерантов, которые определялись как гибридные. Хлоропластная ДНК у отобранных гибридов была идентична хлДНК рапса, что подтверждено PCR-RFLP анализом фрагментов пластидной ДНК. Фрагменты митохондриальной ДНК гибридов, проанализированные с помощью PCR-RFLP анализа, были идентичны фрагментам *O. violaceus*. По данным анализа изоферментов, RAPD анализа, а также анализа ДНК теломерных последовательностей, рДНК и сателлитной ДНК у большинства гибридов ядерный геном представлен геномом *O. violaceus*. Для ряда линий проведен цитогенетический анализ, который показал широкую вариабельность числа хромосом у полученных линий.

© М.Ю. ВАСИЛЕНКО, И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Л.А. САХНО,
Ю.Ю. ГЛЕБА, Н.В. КУЧУК, 2003

Введение. Использование диких родственников в качестве источника генетических ресурсов широко применяется в селекции сельскохозяйственных растений. В области отдаленной гибридизации для представителей рода *Brassica* имеется ряд работ по половой гибридизации с видами из родов *Sinapis* [1, 2], *Moricandia* [3], *Raphanus* [4], а также по соматической для *Lesquerella* [5, 6]. Дикие родственники таких культур, как *B. napus*, часто используются в качестве донора генов устойчивости к патогенным грибам и нематодам. Привлекательной для селекционеров является возможность модификации состава жирных кислот с целью создания масел, пригодных для использования в разнообразных областях хозяйственной деятельности человека [6, 7].

Один из диких представителей семейства *Brassicaceae* — *Orychophragmus violaceus*.

Этот вид, происходящий из Китая, имеет высокие показатели содержания в масле пальмитиновой, олеиновой и линолевой жирных кислот при низком количестве линоленовой и эруковой [8]. Опубликован ряд работ, посвященных половой гибридизации между *O. violaceus* и представителями рода *Brassica* [8–11]. Авторы данных работ сообщают о сегрегации родительских геномов в ходе митозов и, как следствие, получении миксоплоидных гибридов с клетками, содержащими как хромосомы одного из родителей, так и различные комбинации хромосом обоих родителей. Изучая сегрегацию хромосом у гибридов между *Orychophragmus* и некоторыми диплоидами рода *Brassica*, Li с соавт. [10] отмечают различную роль AA (*B. campestris*, $2n = 20$), BB (*B. nigra*, $2n = 16$) и CC (*B. oleracea*, $2n = 18$) геномов в стабильности этих гибридов.

Метод соматической гибридизации, позволяющий работать с видами эволюционно более отдаленными друг от друга, значительно расширяет возможности селекционеров, увеличивая разнообразие селекционного материала, а также является орудием научных исследований в области изучения взаимодействия геномов, выявления их функциональных составляющих и т.д. Используя различные способы инактивации геномов (химические или физические), возможно получать гибриды с асимметричным наследованием родительских геномов, в том числе и цитоплазматических [5, 6, 12]. Поскольку под контролем цитоплазматических генов находится целый ряд практически важных признаков (ЦМС, устойчивость к различным патогенам, гербицидам, уровень фотосинтеза), представляется важным изучение наследования пластов и митохондрий у соматических гибридов.

В настоящей работе описано получение соматических гибридов между видами *B. napus* и *O. violaceus* с использованием хлорофиллдефектной линии *O. violaceus*, а также представлены данные по проведенным анализам для отобранных гибридов.

Материалы и методы. Растительный материал. Растения рапса (*Brassica napus* L. сорт Клеточный) и *Orychophragmus violaceus* получали из семян, которые стерилизовали последовательным погружением в 70%-ный этанол (до 2 мин) и диазид (до 20 мин) с последующей трехразовой отмыжкой стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена проращивали в темноте на агаризованной безгормональной среде Мура-сиге-Скуга (MS) [13], дополненной 30 г/л сахарозы. Взрослые растения культивировали при 26 °C, 16-часовом фотопериоде.

Получение линий *Orychophragmus violaceus* muna «albino». Хлорофиллдефектность у *O. violaceus* была индуцирована согласно Зубко [14, 15]. Сегменты черешков *O. violaceus* культивировали на среде MS, содержащей 30 г/л сахарозы, 1 мг/л бензиламинопурина (БАП), 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК), 500 мг/л спектиномицин-хлорида. Среди регенерирующих растений отбирали хлорофиллдефектные и переносили их на среду без спектиномицина. Критерием стабильности линии служила необратимая хлорофиллдефектность в течение, как минимум, 2–3 мес при отсутствии спектиномицина в составе питательной среды.

Каллус *O. violaceus* получали из взрослых хлорофиллдефектных растений на среде MS, содержащей 30 г/л сахарозы, 1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), 0,5 мг/л НУК, 0,1 мг/л БАП.

Выделение и слияние протопластов, селекция гибридных линий. Протопласты выделяли из листьев 3–4-недельных растений *B. napus* и культуры хлорофиллдефектных каллусов *O. violaceus*. Для ферментирования тканей использовали раствор, содержащий 5 мМ CaCl₂, 0,5 % Cellulase «Onozuka R-10» (Yakult Honsha, Япония), 0,3 % «Macerozyme R-10» (Yakult Honsha, Япония), 0,2 % Cellulisin (Duchefa, Нидерланды), 0,45 М сахарозу. Ферментирование осуществляли в темноте при 25 °C в течение 12–14 ч. Выделение и очистку протопластов проводили согласно Sundberg et al. [16]. Для слияния густую суспензию протопластов (0,5–1,0 · 10⁶ клеток/мл среды W5) наносили каплями по 100–200 мкл в пластиковые чашки Петри и оставляли на 10–15 мин для осаждения протопластов и прикрепления их ко дну чашки. Затем в каждую каплю добавляли равный объем раствора ПЭГ (30 % ПЭГ 4000–6000, 0,3 М глюкоза, 66 мМ CaCl₂). Через 15–20 мин ПЭГ разбавляли средой W5 [17] с 50 мМ MES (2-[N-морфолино] этансульфоновая кислота) малыми порциями в течение 15 мин. Затем аккуратно удаляли избыток раствора над клетками и заменяли его на питательную среду Km8p [18]. Плотность посева составляла 5 · 10⁴ клеток/мл. Отбор гибридных линий проводили по типу регенерации, характерному для *O. violaceus*, и способности клеточных колоний к позеленению.

PCR-RFLP анализ гибридных линий. Тотальную ДНК выделяли из растительного материала, культивируемого в стерильных условиях, согласно ранее описанной методике [19]. ПЦР проводили на амплификаторе «Термик» фирмы «DNA-Technology» (Россия). Для проведения ПЦР использовали ранее разработанные праймеры:

Праймер	Синтезируемый фрагмент
5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3'	atpB-rbcL, 1047 п.н. [20]
5'-TACAGTTGTCCATGTACCAG-3'	
5'-GCTTTACCTTATTCTGATCG-3'	ndh7 (2f–3r), 1,5 п.н. [21]
5'-TGTTCTTGGGCCATCATAGA-3'	
(TTTAGGG)×3	Теломерные повторы [22, 23]
5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	ITS рДНК[24]
5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
5'-TCGGCGATAG-3' (OPA-12),	RAPD-анализ; OPA-праймеры фирмы «Operon Technologies», США
5'-CAATCGCCGT-3' (OPA-11),	
5'-CAGCACCCAC-3' (OPA-13)	

Реакционная смесь (20 мкл) содержала 10 мМ трис-НСl, pH 9,0 (при 25 °C), 50 мМ хлористого калия, 2 мМ хлористого магния, 0,1 % тритона X-100, 0,5 мкМ соответствующего праймера, 200 мкМ каждого из четырех дезокситрифосфатов, 40 нг ДНК и 0,5 ед. Taq-полимеразы («Promega»). После завершения реакции смесь фракционировали в 3%-ном агарозном геле в однократном TAE буфере.

Изоферментный анализ гибридных линий. Ферментный экстракт для изоферментного анализа получали из гомогената смеси растительный материал — буфер для экстракции (0,05 М трис-НСl, 12 % глицерин, 0,2 % меркаптоэтанол, pH 6,8) путем центрифугирования при 15000 g в течение 40 мин. Надосадочную жидкость использовали для электрофореза. Все операции от гомогенизации материала до завершения электрофореза проводили при температуре 0–5 °C. Проявление полос активности ферментов (эстеразы, пероксидазы, амилазы) проводили согласно ранее описанной методике [25].

Цитологический анализ гибридных линий. Число хромосом у гибридных и родительских форм подсчитывали в давленных препаратах клеток кончиков корешков. Для этого предобработанный в течение 2 ч 0,05%-ным раствором колхицина материал фиксировали уксусным спиртом (один объем CH_3COOH и три объема $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) около 1 сут и окрашивали ацеторсеином в течение ночи. Окрашенные кончики корешков помещали в каплю 45%-ной уксусной кислоты на предметное стекло, нагревали в пламени спиртовки и давили покровным стеклом до образования клеточного моно слоя. Готовый препарат изучали под микроскопом «Univar» фирмы «Reichert» (Австрия) с фотоприставкой.

Результаты исследований и их обсуждение. Первым шагом для проведения экспериментов по соматической гибридизации было получение линии типа «albino» *O. violaceus*. Растения *O. violaceus* («albino») были получены путем регенерации из черешковых эксплантов на средах, содержащих спектиномицин. Согласно гипотезе, предложенной Зубко с соавт. [14, 15], хлорофиллдефектность у видов семейства *Brassicaceae* вызывается необратимой элиминацией рибосом пластид под действием спектиномицина. Из хлорофиллдефектных растений был получен каллус, который использовался как источник прото-

пластов для экспериментов по соматической гибридизации.

Для селекции соматических гибридов, как правило, используют механический отбор продуктов слияния [26, 27], инактивацию родительских геномов облучением и/или биохимическими ядами [5, 12, 17], генетическую и физиологическую комплементацию [28]. В нашей работе были совмещены методы генетической комплементации и механического отбора потенциально гибридных колоний. Используя спектиномицин-индуцируемую хлорофиллдефектность в качестве единственного маркера одного из родителей (рис. 1, а), мы отбирали гибридные линии без применения каких-либо селективных агентов, руководствуясь при отборе лишь морфологическими критериями.

В четырех независимых экспериментах по слиянию каллусных протопластов *O. violaceus* с мезофильными протопластами *B. napus* было отобрано около 200 зеленых колоний, внешне напоминающих колонии *O. violaceus* дикого типа (рис. 1, б). Большинство отобранных колоний смогли регенерировать в растения, подавляющее большинство которых оказались морфологически подобными исходным растениям *O. violaceus* (рис. 2). Лишь небольшое количество колоний (3–5 %) характеризовались аномалиями развития, в некоторых случаях наблюдалось формирование хлорофиллдефектных сегментов. Столь низкий процент морфологических аномалий при отдаленной гибридизации, а также отсутствие родительских форм среди отобранных растений, по-видимому, можно объяснить тем, что из массы регенерирующих колоний отбирались самые крупные, быстро развивающиеся зеленые колонии.

Незначительная часть гибридных растений (до 5 %) имели морфологические признаки (рост стебля, форма листовой пластинки), характерные как для рапса, так и для *O. violaceus*. В процессе культивирования обнаружилось, что все гибридные линии обладают несколько сниженными темпами роста, однако другие показатели (частота деления протопластов, частота регенерации) значительно выше, чем у исходных родительских форм. Такой эффект, по-видимому, можно объяснить соматической вариативностью, имеющей место в культуре *in vitro*, и последующей «непроизвольной» селекцией наибо-

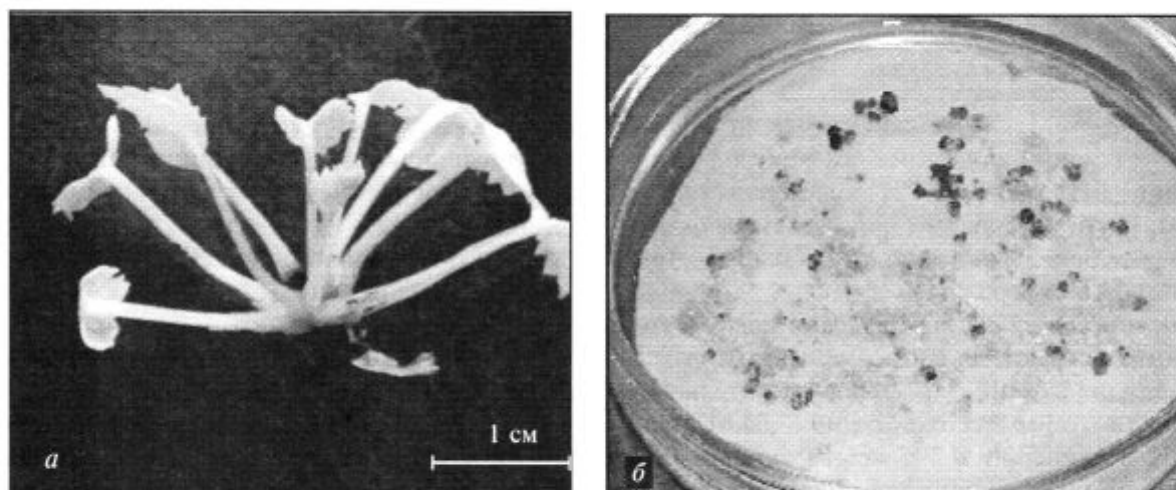


Рис. 1. Линия типа «albino» *O. violaceus*, полученная посредством спектиномицина (а), и регенерирующие гибридные колонии *O. violaceus* (+) *B. napus* (б)

лее активно делящихся клеточных линий. Известно, что в культуре *in vitro* может наблюдаться достаточно высокий (по крайней мере, для некоторых культур) уровень изменчивости [29], который иногда используется для получения новых линий, например, с высоким регенерационным потенциалом. Не исключено, конечно, что увеличение регенерационной способности у протопластов гибридных растений возникло благодаря совмещению геномов исходных растений.

Для молекулярно-биологических анализов было отобрано 12 гибридных линий, наиболее характерных по фенотипам для всей массы полученных растений.

Данные рестриктного анализа *atpB-rbcL* фрагмента хлоропластной ДНК (хпДНК) (рис. 3), по-

лученного в результате амплификации, показывают, что анализированные гибриды имеют гомологичные фрагменты с хпДНК *B. napus*, а это доказывает присутствие в гибридных линиях пластид *B. napus*.

Аналогично анализу пластома нами был проведен анализ митохондриальной ДНК (мтДНК) для тех же линий гибридов. Были использованы четыре пары праймеров для получения фрагментов различных участков мтДНК. На рис. 4 показаны ДНК-фрагменты гена одной из субъединиц НАД-дегидрогеназы (*ndh7*), которые оказались идентичны фрагментам *O. violaceus*. Таким образом, в отличие от пластид, митохондрии у полученных линий принадлежат *O. violaceus*. Согласно имеющимся в литературе дан-

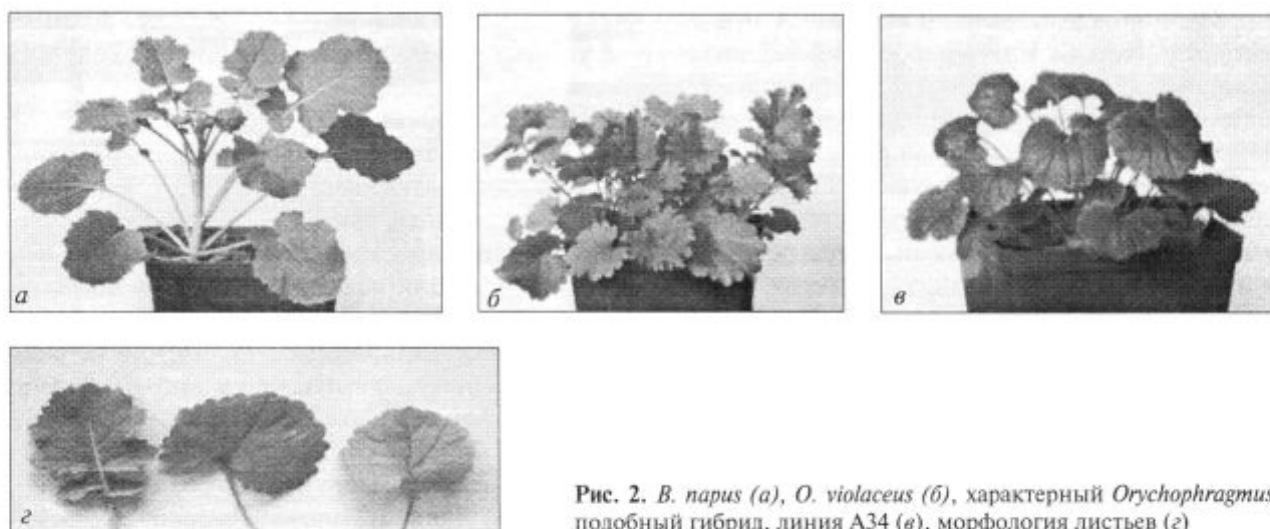


Рис. 2. *B. napus* (а), *O. violaceus* (б), характерный *Orychophragmus*-подобный гибрид, линия А34 (в), морфология листьев (г)

ным по сегрегации цитоплазматических геномов, наследование плазматенов у соматических гибридов без селективного давления происходит двуправленно [16], тогда как использование селективных маркеров (или методов инактивации одного из геномов) приводит к униполярной сегрегации (при условии совместимости ядерного и цитоплазматического геномов) [12, 30, 31]. В нашем случае имеет место получение цитоплазматических гибридов с пластидами *B. napus* и митохондриями *O. violaceus*. Такая комбинация цитоплазматических геномов, по-видимому, неслучайна, поскольку отбор проводили по восстановлению способности к образованию хлорофилла, а сегрегация митохондрий не контролировалась условиями эксперимента и, очевидно, была направлена в пользу митохондрий *O. violaceus*.

Дополнением к сказанному могут быть результаты многих исследовательских групп [30, 32–35], сводящиеся к тому, что среди большого разнообразия генетически различных форм, возникших из слившихся протопластов, имеются формы, несущие пластом одного родителя наряду с митохондрионом другого, а также формы с пластомом одного родителя и реконструированным митохондрионом. Как известно, геном митохондрий более вариабелен, чем пластом [30, 35, 36], поэтому мы не исключаем возможности рекомбинационных перестроек у полученных нами гибридов, по крайней мере в митохондрионе, хотя в изученных нами фрагментах мтДНК таких перестроек обнаружено не было.



Рис. 3. ПЦР-продукты *atpB-rbcL* фрагмента хлДНК *O. violaceus* (14), *B. napus* (15) и гибридных линий C103, C58, C54, B69, B66, B57, B52, A55, A35, A34, A15, A6 (2–13), обработанные рестриктазой *MnII*; 16, 17 — *atpB-rbcL* фрагмент *O. violaceus* и *B. napus* без обработки *MnII*; 1 — 1 т.п.н. ДНК маркер



Рис. 4. ПЦР-продукты *ndh7* фрагмента мтДНК *O. violaceus* (13), *B. napus* (14) и гибридных линий C58, C54, B69, B66, B57, B52, A55, A35, A34, A15, A6 (2–12), обработанные рестриктазой *HaeIII*; 15, 16 — *ndh7* фрагмент *O. violaceus* и *B. napus* без обработки *HaeIII*; 1 — 1 т.п.н. ДНК маркер

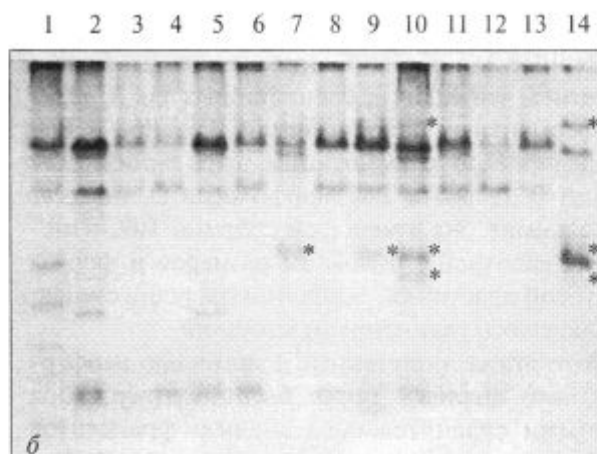
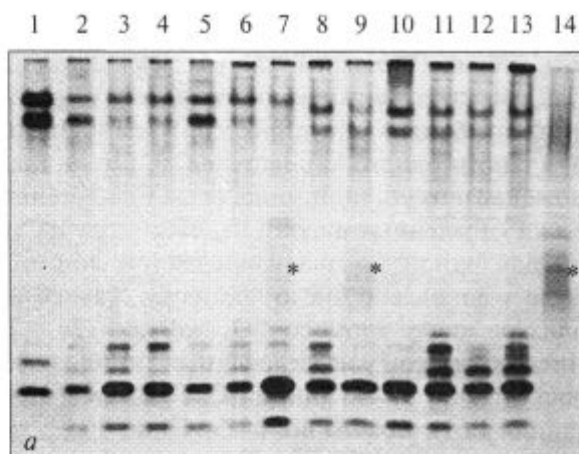


Рис. 5. Изоферментный анализ гибридных линий A6, A15, A34, A35, A55, B52, B57, B66, B69, C54, C58, C103 (дорожки 2–13 соответственно) и родительских форм *O. violaceus* (1), *B. napus* (14); а — эстеразы, б — пероксидазы

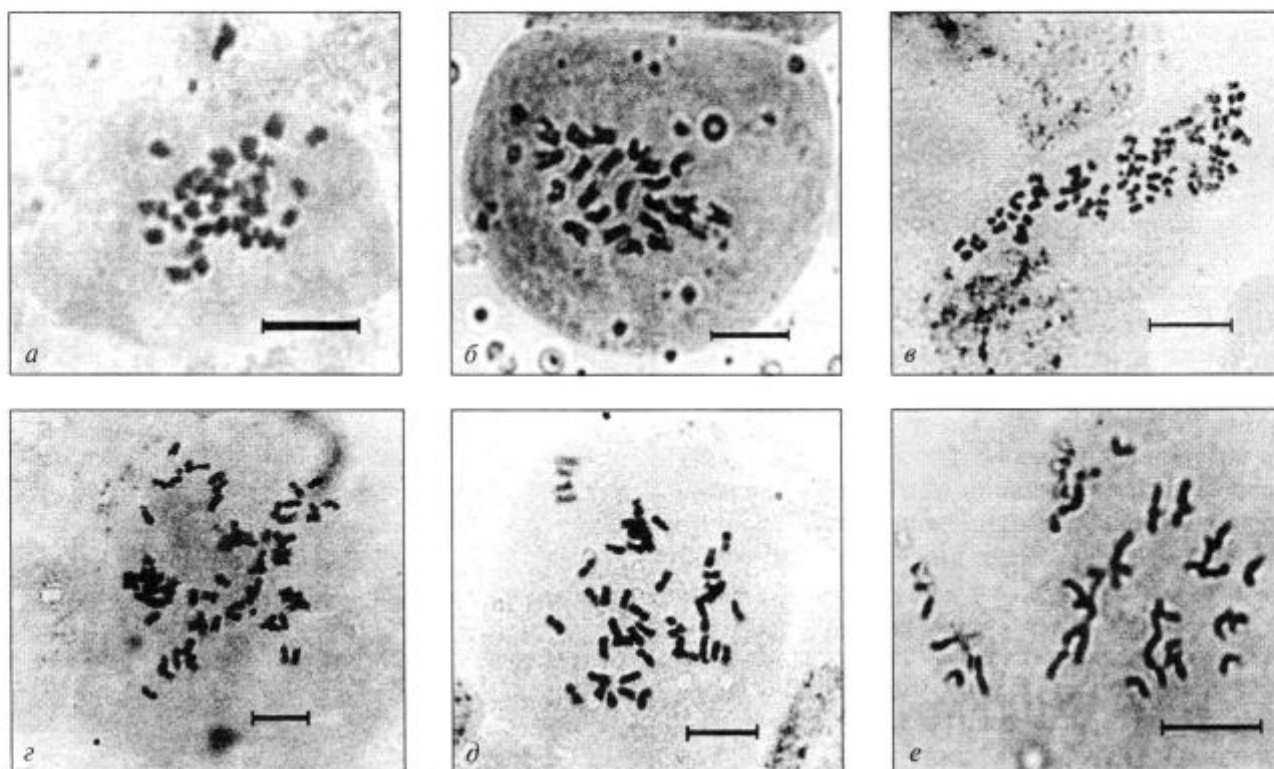


Рис. 6. Метафазные хромосомы *B. napus*, $2n = 38$ (а), *O. violaceus*, $2n = 24$ (б) и гибридов между *O. violaceus* и *B. napus*: B61, $2n = 70-74$ (в); A30, $2n = 61-64$ (г); A34, $2n = 43-48$ (д); C51, $2n = 39-43$ (е); масштабный отрезок — 10 мкм

Данные изоферментного анализа свидетельствуют, что ядерный геном анализируемых гибридов в значительной степени представлен генетическим материалом *O. violaceus*. Распределение полос активности эстераз и пероксидаз лишь для трех линий (B52, B66, B69) оказалось двухродительским (рис. 5), остальные же линии имели полосы, специфичные для *O. violaceus* или не характерные для обоих родителей полосы. Важно отметить, что наличие специфичных для *B. napus* изоферментных полос у линий B52, B66 и B69 коррелировало с фенотипом этих линий. Для линий B52, B66 и B69 морфология *O. violaceus* была характерна в меньшей степени. Так, изменения касались в основном размеров и формы листовой пластинки, особенностей роста стебля, наблюдалось удлинение междоузлий.

Результаты, полученные с помощью изоферментного анализа, также были подтверждены данными сравнительного анализа фрагментов ДНК теломерных последовательностей, рДНК и сателлитной ДНК (данные не показаны).

Данные цитогенетического анализа (рис. 6),

полученные пока для небольшого числа гибридных линий, оказались несколько неожиданными. Теоретически число хромосом у симметричного соматического гибрида *B. napus* + *O. violaceus* должно составлять $2n = 38 + 24 = 62$, однако, основываясь на данных молекулярно-биологических анализов и *Orychophragmus*-подобном фенотипе отобранных растений, мы предполагали, что гибриды большей частью асимметричны. Как известно, асимметрия по геному у соматических гибридов индуцируется путем инактивации генома одного из родителей [5, 12], но также может возникать спонтанно, чаще у филогенетически отдаленных видов [37]. Несмотря на это, ни для одной проанализированной линии не было установлено число хромосом, равное или близкое числу хромосом *O. violaceus* ($2n = 24$). Число хромосом у исследованных линий колебалось от $2n = 39-43$ (линия C51) до $2n = 70-74$ (линия B61). Возможно, увеличение числа хромосом у линий A30, A34, B61, C51 объясняется трехклеточным слиянием (два ядра *O. violaceus* ($2n = 24$) · 2 = 48 и пластом *B. napus*) при

гибридизации или увеличением пloidности одного из геномов, в частности *O. violaceus* ($4n = 48$, $6n = 72$). В работах, посвященных половой гибридизации *O. violaceus* с представителями рода *Brassica* [8–11], сообщается о сегрегации родительских хромосом путем элиминации генома *O. violaceus* и удвоения гаплоидного набора хромосом *B. napus*. Если этот процесс, как предполагают авторы [11], генетически закреплен и характерен для данной пары родителей, то в случае соматической гибридизации он, очевидно, не происходит и/или не имеет четко выраженной направленности.

Выводы. Таким образом, полученные путем соматической гибридизации гибридные растения *Orychophragmus violaceus* + *Brassica napus* являются асимметричными по наследованию цитоплазматических геномов, а также имеют, по крайней мере, функциональную асимметрию по ядерному геному. В настоящей работе показана эффективность использования мутации типа «albino», индуцированной при помощи спектиномицина у *O. violaceus*, для селекции цитоплазматических гибридов. Установлено, что совместимость ядерного генома *O. violaceus* и пластома *B. napus* достаточно высока, подтверждением чему может служить низкая частота появления спонтанных химерных форм и способность гибридных растений развиваться в грунте.

SUMMARY. The *Orychophragmus violaceus* chlorophyll-defective line of «albino» type has been obtained by spectinomycin treatment. Somatic hybridization between *Orychophragmus violaceus* and *Brassica napus* was performed by fusion of green mesophyll protoplasts of rape and callus protoplasts of the *O. violaceus* «albino» line. Near two hundred of regenerant plants were selected according to the regeneration type and ability to become green, and were determined as hybrids. Chloroplast DNA in selected hybrids was identical to rape chlDNA, which was confirmed by the PCR-RFLP analysis of plastid DNA fragments. Fragments of hybrid mitochondrial DNA analyzed by the PCR-RFLP analysis were identical to fragments of *O. violaceus*. The nuclear genome of the majority of hybrids was represented by the *O. violaceus* genome, which was demonstrated by analyses of isoenzymes, DNA telomeric sequences, ribosomal and satellite DNAs, and the RAPD analysis. The cytogenetic analysis of a number of lines has shown variability in the number of chromosomes in the obtained lines.

РЕЗЮМЕ. Хлорофилдефектну лінію типу «albino» отримано для *Orychophragmus violaceus* з використанням спектиномицину. Соматична гібридизація між *O. violaceus*

та *Brassica napus* здійснювалась шляхом злиття зелених мезофільних протопластів ріпака з калусними протопластами лінії «albino» *O. violaceus*. За типом регенерації та здатністю до позеленіння відібрано біля 200 рослин-регенерантів, які визначались як гібридні. Хлоропластна ДНК у відібраних гібридів була ідентична хлДНК ріпака, що підтверджено PCR-RFLP аналізом фрагментів пластидної ДНК. Фрагменти мітохондріальної ДНК гібридів були ідентичні фрагментам *O. violaceus*. За даними ізоферментного та RAPD аналізів, а також аналізу ДНК теломірних послідовностей, рДНК та сателітної ДНК у більшості гібридів ядерний геном представлений геномом *O. violaceus*. Для ряду ліній проведено цитогенетичний аналіз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sjödin C., Glimelius K. Screening for resistance to black-leg *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. within *Brassicaceae* // J. Phytopathol. — 1988. — 123. — P. 322–332.
2. Nothnagel T., Budahn H., Straka P., Schrader O. Successful backcrosses of somatic hybrids between *Sinapis alba* and *Brassica oleracea* with the *Brassica oleracea* parent // Plant Breed. — 1997. — 116. — P. 89–97.
3. Rawsthorne S., Hylton C.M., Smith A.M., Woolhouse H.W. Photorespiratory metabolism and immunolocalization of photorespiratory enzymes in leaves of C3 and C3-C4 intermediate species of *Morinda* // Planta. — 1988. — 173. — P. 298–308.
4. Voss A., Snowdon R.J., Lühs W., Friedt W. Intergeneric transfer of nematode resistance from *Raphanus sativus* into the *Brassica napus* genome // Acta Hort. — 2000. — 539. — P. 129–134.
5. Skarzhinskaya M., Landgren M., Glimelius K. Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats // Theor. Appl. Genet. — 1996. — 93. — P. 1242–1250.
6. Schröder-Pontoppidan M., Skarzhinskaya M., Dixelius C., Stymne S., Glimelius K. Very long chain and hydroxylated fatty acids in offspring of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Lesquerella fendleri* // Theor. Appl. Genet. — 1999. — 99. — P. 108–114.
7. Töpfer R., Martini N., Schell J. Modification of plant lipid synthesis // Science. — 1995. — 268. — P. 681–685.
8. Li Z., Liu H.L., Luo P. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* // Theor. Appl. Genet. — 1995. — 91, № 1. — P. 131–136.
9. Li Z., Wu J.G., Liu Y., Liu H.L., Heneen W.K. Production and cytogenetics of the intergeneric hybrids *Brassica juncea* × *Orychophragmus violaceus* and *B. carinata* × *O. violaceus* // Theor. Appl. Genet. — 1998. — 96. — P. 251–265.
10. Li Z., Heneen W.K. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between the three cultivated *Brassica* diploids and *Orychophragmus violaceus* // Theor. Appl. Genet. — 1999. — 99. — P. 694–704.
11. Cheng B.F., Séguin-Swartz G., Somers D.J. Cytogenetic and molecular characterization of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* // Genome. — 2002. — 45. — P. 110–115.

12. Sidorov V.A., Menczel L., Nagy F., Maliga P. Chloroplast transfer in Nicotiana based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts // *Planta*. — 1981. — **152**. — P. 341–345.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* — 1962. — **15**, № 3. — P. 473–497.
14. Zubko M.K., Day A. Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance // *Plant J.* — 1998. — **15**, № 2. — P. 265–271.
15. Зубко М.К. Стабильная хлорофиллдефектность, индуцированная у крестоцветных при помощи антибиотиков // *Физиология и биохимия культур растений*. — 1999. — **31**. — С. 467–473.
16. Sundberg E., Landgen M., Glimelius K. Fertility and chromosome stability in Brassica napus resynthesised by protoplast fusion // *Theor. Appl. Genet.* — 1987. — **75**. — P. 96–104.
17. Medgyesy P., Menczel L., Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from Nicotiana tabacum into Nicotiana sylvestris and isolation of their somatic hybrids // *Mol. and Gen. Genet.* — 1980. — **179**. — P. 693–696.
18. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of Vicia hajastana and protoplasts at very low population density in liquid media // *Planta*. — 1975. — **126**. — P. 105–110.
19. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // *PCR Meths. Appl.* — 1993. — **3**. — P. 69–70.
20. Savolainen V., Corbar R., Moncousin C., Spichiger R., Manen J. F. Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples // *Theor. and Appl. Genet.* — 1995. — **90**. — P. 1138–1141.
21. Demesure B., Sodri N., Petit R.J. A set universal primers for amplification of polymorphic non-coding region of mitochondrial and chloroplast DNA in plant // *Mol. Ecol.* — 1995. — **4**. — P. 129–131.
22. Yong X., Hong D., Chen Sh. Isolation and characterization of six rice telomere-associated sequences // 5th Int. Congr. Plant Mol. Biol. — Singapore, 1997.
23. Cox A., Bennett S., Parokonny A., Kenton A., Callimassia M., Bennett M. Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe // *Ann. Bot.* — 1993. — **72**. — P. 239–247.
24. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications*/ Eds M. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.G. White. — San Diego : Acad. press, 1990. — P. 315–322.
25. *Handbook of Plant Cell Culture* / Eds. D.A.Evans et al. — New York, London : McMillan Publ. Co., 1981. — **1**. — 970 p.
26. Gleba Yu.Yu., Hoffmann F. «Arabidobrassica»: A novel plant obtained by protoplast fusion // *Planta*. — 1980. — **149**. — P. 112–117.
27. Gleba Yu.Yu., Momot V.P., Cherep N.N., Skarzhinskaya M. Intertribal hybrid cell lines of Atropa belladonna + Nicotiana chinensis obtained by cloning individual protoplast fusion products // *Theor. and Appl. Genet.* — 1982. — **62**. — P. 75–79.
28. Sidorov V., Maliga P. Fusion-complementation analysis of auxotrophic and chlorophyll-deficient lines isolated in haploid Nicotiana plumbaginifolia protoplast cultures // *Mol. and Gen. Genet.* — 1982. — **186**. — P. 328–332.
29. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование in vitro // *Биополимеры и клетка*. — 1997. — **13**. — С. 362–369.
30. Morgan A., Maliga P. Rapid chloroplast segregation and recombination of mitochondrial DNA in Brassica cybrids // *Mol. Gen. Genet.* — 1987. — **209**. — P. 240–246.
31. Thomzik J.E., Hain R. Transfer and segregation of triazine tolerant chloroplasts in Brassica napus L. // *Theor. and Appl. Genet.* — 1988. — **76**. — P. 165–171.
32. Глеба Ю.Ю., Пивень Н.М., Комарницкий И.К., Сытник К.М. Парасексуальные соматические гибриды (цибриды) Nicotiana tabacum + N. debneyi, полученные слиянием протопластов // *Докл. АН СССР*. — 1978. — **240**. — С. 225–227.
33. Gressel J., Cohel N., Binding H. Somatic hybridization of an atrazine resistant biotype of Solanum nigrum with S.tuberosum. 2. Segregation of plastomes // *Theor. and Appl. Genet.* — 1983. — **67**. — P. 18–25.
34. Shepard J.F., Bidney D., Barby T., Kemble A. Genetic transfer in plants through interspecific protoplast fusion // *Science*. — 1983. — **219**. — P. 683–688.
35. Landgren M., Glimelius K. Analysis of chloroplast and mitochondrial segregation in three different combinations of somatic hybrids produced within Brassicaceae // *Theor. and Appl. Genet.* — 1990. — **80**. — P. 776–784.
36. Nagy F., Lazar G., Menczel L., Maliga P. A heteroplasmic state induced by protoplast fusion is a necessary condition for detecting rearrangements in Nicotiana mitochondrial DNA // *Theor. and Appl. Genet.* — 1983. — **66**. — P. 203–207.
37. Hoffmann F., Adachi T. Arabidobrassica: chromosomal recombination and morphogenesis in asymmetric intergeneric hybrid cells // *Planta*. — 1981. — **153**. — P. 586–593.

Поступила 10.10.02