

Реконструкция цитоплазмы картофеля путем переноса хлоропластов из дикого вида *Solanum* и регенерация цибридных форм растений

Д. П. Евтушенко, А. М. Шаховский, В. А. Сидоров

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 148, Киев, 03143, Украина

Хлоропласты Solanum microdontum Bitt. перенесены в хлорофиллдефектный пластомный мутант S. tuberosum L. и созданы цибридные растения картофеля, содержащие чужеродные органеллы. Селекция цибридных клонов была основана на восстановлении фотосинтетической активности клеточных колоний, растущих на среде с низким содержанием источников углеводного питания. Рестрикционный анализ хлДНК, изучение кариотипа и изоферментный анализ эстераз показали присутствие в полученных цибридах пластид S. microdontum Bitt. и ядра культурного картофеля. Ядерно-органельная совместимость созданных цибридов картофеля дает возможность улучшить исходные характеристики генотипа S. tuberosum L.

Введение. Картофель занимает четвертое место в мире среди растений, составляющих главные источники питания человека [1]. В то же время эффективных и коротких путей генетического улучшения сортов картофеля практически не существует. Это связано с малым разнообразием генотипа, высокогетерозиготным состоянием большинства сортов, что приводит к расщеплению ценных признаков в половом потомстве, а также со значительными трудностями при скрещивании картофеля с другими представителями рода *Solanum*.

Одним из направлений современной биотехнологии, позволяющих преодолеть барьеры половой несовместимости при межвидовых скрещиваниях и вовлечь в селекционный процесс филогенетически отдаленные виды, является соматическая гибридизация путем слияния протопластов. Особый интерес представляет получение цибридов (цитоплазматических гибридов) — растений, содержащих ядро одного из партнеров и органеллы (пластиды, митохондрии) другого, что позволяет сохранить гетерозиготность исходного сорта и перенести в культурный картофель хозяйственно ценные при-

знаки, кодируемые органельными ДНК других видов *Solanum*. Цибриды также служат удобной модельной системой для изучения взаимоотношений ядра и органелл клетки, дают возможность идентифицировать признаки, контролируемые цитоплазмомом, предоставляют информацию о филогении видов и т. д.

Большинство генотипов культурного картофеля имеет хлДНК, характерную для *Solanum tuberosum ssp. tuberosum* — так называемый Т-тип пластома, что обусловлено однородительским, материнским наследованием пластид у растений этой культуры [2] и происхождением от одного общего предка [3].

Дикие виды *Solanum* обладают видоспецифичным пластомом. На сегодня известно, что органелльные ДНК могут контролировать интенсивность фотосинтеза, устойчивость к патотоксинам, гербицидам, толерантность к низким и высоким температурам, цитоплазматическую мужскую стерильность и др. [4]. Следовательно, получение цибридов картофеля позволит вовлечь в селекционно-генетические исследования потенциал плазмфонда диких видов *Solanum*, который до настоящего времени практически не использовался.

Материалы и методы. *Растительный мате-*

риал и условия культивирования. В работе использовали: 1) дикий клубненосный вид *S. microdontum* Bitt., диплоид ($2n = 2x = 24$), устойчив к раку, фиофторозу, макроспориозу, парше, спонгспоры, вирусам А, У, колорадскому жуку, эпипляне; имеет повышенное содержание сырого белка в клубнях [5]; 2) хлорофиллдефектный пластомный мутант культурного картофеля *S. tuberosum* L., сорт Зарев, линия Z-3. Тетраплоид ($2n = 4x = 48$).

Растения выращивали в асептических условиях на твердой безгормональной среде, содержащей соли среды MS [6], витамины Мореля [7], 0,5—3 %-ю сахарозу, 0,5—0,7%-й агар; либо на твердой питательной среде ST-3 [8]. Растения культивировали при 16-ч световом фотопериоде, освещенности 3000—4000 лк и температуре 23—25 °С. Размножали черенкованием.

Выделение протопластов. Перед экспериментом растения выдерживали в течение суток в темноте при 4—8 °С. Полностью развернувшиеся молодые листья 4—6-недельных растений (1—2 г сырой массы) нарезали узкими полосками шириной 0,5—1 мм и помещали на поверхность ферментного раствора. Для *S. microdontum* Bitt. ферментный раствор содержал 0,6 % Onozuka R-10 («Serva», ФРГ), 0,6 % Macerozyme R-10 («Serva»), 0,2 % Cellulisin («Calbiochem», США), 0,4 М сахарозу, 0,1 М глицин, 10 мМ CaCl₂ и 10 мМ 2-(N-морфолин)этансульфоновую кислоту (МЭС), pH 5,6. Для хлорофиллдефектных пластомных мутантов культурного картофеля концентрация ферментов в осмотически стабильном растворе была уменьшена в 1,5 раза. Инкубировали в течение 14—16 ч в темноте при температуре 26 °С. Жизнеспособные протопласты очищали от дебриса по стандартной методике [8]. Количество протопластов в среде подсчитывали с использованием камеры Фукса—Розенталя, при необходимости плотность суспензии протопластов доводили до требуемой.

Свежевыделенные протопласты *S. microdontum* Bitt., служившего донором цитоплазмы, облучали дозами 1000 Гр (9 Гр·мин⁻¹, ⁶⁰Co). После облучения протопласты отмывали в 15 мл среды W5 для удаления токсичных веществ, образовавшихся в среде под действием ионизирующего излучения [9].

Слияние протопластов и их культивирование. Слияние мезофильных протопластов проводили по методике «полиэтиленгликоль (ПЭГ) — высокое значение pH — высокая концентрация ионов Ca²⁺». Основной методикой служил протокол по Менцелю [8, 10], модифицированный применительно к условиям эксперимента.

Протопласты и продукты слияния культивиро-

вали в жидкой питательной среде SW [11] одним из трех способов: 1) культивирование в тонком слое жидкой питательной среды; 2) платирование в агарозные блоки и культивирование их в жидкой среде («agarose bead culture»); 3) иммобилизация в альгинат кальция и культивирование в жидкой среде.

Первые два способа описаны ранее [12], третий представим подробнее. В основе способа лежит свойство альгинатного раствора формировать гель в присутствии ионов кальция [13]. Раствор альгината готовили, растворяя 2,8 г альгината натрия («Low viscosity», «Sigma», США) в 100 мл раствора, содержащего 0,4 М глюкозу, гормоны питательной среды SW и 10 мМ МЭС-буфер (pH 5,8); стерилизовали автоклавированием и хранили в темноте при 4 °С.

Через 1—2 дня после слияния и культивирования в темноте при 24—26 °С протопласты иммобилизовали в альгинат кальция. К ресуспендированым в жидкой среде SW клеткам ($2 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл среды) по каплям добавляли равный объем раствора альгината, аккуратно ресуспендировали и переносили в чашки Петри с агаризованной средой, содержащей 50 мМ CaCl₂, 0,4 М глюкозу, 0,7 % агара Difco, распределяя тонким слоем на поверхности среды (5 мл суспензии клеток в альгинате на чашку Петри диаметром 9 см). Оставляли на 20—25 мин. В течение этого времени альгинатный раствор формировал гель вследствие диффузии ионов кальция из агаризованной среды. Полученную альгинатную пленку с иммобилизованными клетками переносили в чашку Петри с 15 мл жидкой питательной среды SW. Культивировали в темноте при температуре 24—26 °С. Через 5—6 дней, когда начинались массовые деления клеток, к культуре добавляли по 3 мл (в расчете на чашку Петри диаметром 9 см) свежей питательной среды ST-1 [12], предварительно отобрав такой же объем ранее использованной. Эффективность высевы протопластов подсчитывали как соотношение количества клеток, образовавшихся микроколонии на 10—12-й день культивирования к общему числу культивируемых клеток.

Культивирование продолжали на рассеянном свете (100—400 лк) при 16-ч световом фотопериоде. Замену части старой среды на равный объем свежей осуществляли через каждые 7—8 дней, постепенно увеличивая количество добавляемой среды ST-1 до 5—7 мл. Через 2—3 недели после начала культивирования чашки с образовавшимися микроколониями помещали в условия более высокой освещенности (2000 лк).

После образования из иммобилизованных кле-

ток индивидуальных колоний диаметром 1—1,5 мм (4—5 недель культивирования) их высвобождали из Са-альгината, растворяя альгинатный гель в 15—20 мл Na_3 -цитратного буфера (100 мМ цитрата натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0,2 М маннит, рН 5,8), затем отмывали 3—4 раза раствором 0,2 М маннита. При растворении Са-альгината и отмывке колоний важно, чтобы в применяемых растворах отсутствовали мультивалентные ионы (Ca^{2+} , Mg^{2+} и др.), иначе снова произойдет формирование альгинатного геля.

Селекция цибридных колоний и регенерация из них растений. Селекция цибридных колоний основана на восстановлении ими фотосинтетической активности при культивировании на твердой среде ST-1, содержащей низкую концентрацию источников углеводного питания. Отобранные ярко-зеленые колонии переносили на свежую среду того же состава и культивировали в течение 15—20 дней. Колонии, достигшие размеров 2—3 мм в диаметре, помещали на среду для индукции органогенеза.

Для регенерации растений из отобранных цибридных клонов использовали агаризованную среду ST-2 [8], дополненную 0,05 мг/л гибберелловой кислоты (ГК_3) и 5 мМ МЭС. Необходимыми условиями для регенерации служили освещенность 2000—3000 лк, 16-ч световой фотопериод и температура, не превышающая 24 °С (22—24 °С). На свежую регенерационную среду колонии пассировали каждые две недели. При пересадке важно не нарушать полярности положения колоний на среде. Частоту регенерации растений подсчитывали как соотношение регенерировавших клонов к общему числу перенесенных на регенерационную среду колоний. Образовавшиеся побеги длиной 1—1,5 см отделяли от каллусной ткани и переносили для укоренения на безгормональную среду ST-3 [8].

Рестрикционный анализ хлоропластной ДНК. ХлДНК из листьев растений выделяли, используя известные методы [14, 15]. Рестрикцию ДНК (1—2 мкг) эндонуклеазой *BamHI* проводили согласно рекомендациям фирмы — изготовителя ферментов («Boehringer Mannheim», ФРГ). Фрагменты ДНК разделяли методом электрофореза в горизонтальном 0,8—1 %-м агарозном геле в течение 16—18 ч при напряжении 20 В. Использовали трис-ацетатный буфер [16]. После электрофореза гель окрашивали в растворе бромистого этидия (0,15 мкг/мл, 30 мин) и фотографировали при ультрафиолетовом освещении.

Анализ множественных молекулярных форм эстераз. Экстракцию и электрофорез белков проводили в соответствии с описанными методами [8]. Для определения активности эстераз гель окраши-

вали в 0,1 М фосфатном буфере (рН 6,0), содержащем 400 мг/л соли прочного синего РР и 200 мг/л α -нафтилацетата.

Цитогенетический анализ. Для подсчета числа хромосом в клетках цибридных и родительских растений использовали метод давленных препаратов. Молодые корешки длиной 0,5—1 см обрабатывали 0,03 %-м раствором колхицина в течение 1 ч. Фиксирование, мацерацию и окрашивание материала проводили по стандартной методике [17].

Результаты и обсуждение. Для получения цибридных форм растений применяли метод слияния протопластов по схеме «реципиент + донор». В качестве реципиента чужеродных органелл использовали хлорофиллдефектный пластомный мутант *S. tuberosum* L. сорта Зарево линии Z-3. Данный мутант получен в нашей лаборатории ранее [18], и пластомная природа его пигментодефектности установлена с помощью комплементационного анализа слиянием протопластов. Донором пластид служил дикий клубненосный вид *S. microdontum* Bitt.

Мезофильные протопласты *S. microdontum* Bitt. подвергали γ -облучению (1000 Гр, 9 Гр·мин⁻¹) для инактивации ядра донора и сливали с протопластами реципиента в соотношении 1 : 1, 10⁶ клеток в 1 мл. Частота слияния протопластов составляла 20—25 % (результаты шести независимых экспериментов).

Показано значительное преимущество заправки протопластов в альгинат кальция для успешного культивирования продуктов слияния: эффективность высева иммобилизованных протопластов составляла $67,6 \pm 8,2$, и была приблизительно в три раза выше, чем эффективность высева протопластов при общепринятом способе культивирования в жидкой среде.

Более того, показатель эффективности высева протопластов в Са-альгинате превышал таковой для протопластов, платированных в низкоплавкую агарозу ($50,4 \pm 7,3$ %), хотя использование «*agarose bead culture*» считается лучшим способом культивирования протопластов для повышения их выживаемости и эффективности деления.

Данный эффект может быть связан как со свойствами альгинатного геля, так и с условиями, в которых находится иммобилизованная клетка. Важнейшими из них являются сохранение полярности растительной клетки, замедленный отток веществ из клетки в среду и образование вокруг нее микросреды — «оболочки» из физиологически активных клеточных метаболитов, а также защищенность иммобилизованной клетки от резких изменений условий окружающей среды (рН, ионный баланс, осмотическое давление и т. д.). Кроме того,

механическая опора геля при делении клеток в альгинате способствовала формированию компактных и плотных колоний, что являлось важным условием для успешной регенерации растений картофеля.

Селекция цибридных клонов была основана на восстановлении фотосинтетической активности колоний и их способности зеленеть на среде ST-1 с низким содержанием источников углеводного питания. В каждом опыте по слиянию протопластов хлорофиллдефектного картофеля и дикого вида *Solanum* было получено от 200 до 700 фотосинтезирующих колоний.

Регенерация растений из отобранных ярко-зеленых колоний происходила в течение 1—6 месяцев культивирования на среде для индукции органогебеза. При этом после первого месяца культивирования количество регенерировавших клонов составляло $2,1 \pm 0,3$ %, 2-го — $5,3 \pm 0,8$ %, 3-го — $13,7 \pm 1,9$ %, 4-го — $36,9 \pm 5,1$ %, 5-го — $78,2 \pm 8,3$ %, 6-го и последующих месяцев — достигало 90 % и более. В целом частота регенерации растений из цибридных колоний составляла $81,5 \pm$

$\pm 10,4$ % и соответствовала таковой растений из колоний мезофильных протопластов немутантной линии реципиента (сорт Зарево) в контрольных опытах — $83,7 \pm 8,6$ %. Причем на каждой колонии формировалось от одного до нескольких побегов (рис. 1). В наших исследованиях не установлена зависимость регенерационной способности клеточных колоний от присутствия чужеродных пластид, хотя индукция побегообразования из цибридных клонов происходила в среднем на один месяц позже, чем обычно для генотипа реципиента.

Из каждого эксперимента отобрали по 4—6 растений-регенерантов с нормальной морфологией, размножили *in vitro* и использовали для последующего анализа. Биохимический анализ регенерированных растений был применен в основном для характеристики генетического материала хлоропластов. Рестрикционный анализ хлДНК с использованием эндонуклеазы *BamHI* позволил выявить регенеранты, содержащие чужеродные пластиды *S. microdontum* Bitt. (рис. 2). Частота образования цибридных клонов в среднем составляла $2,4 \cdot 10^{-4}$.

При исследовании пластома полученных растений мы не обнаружили признаков рекомбинации хлДНК реципиента с хлДНК донора, хотя в литературе отмечается возможность возникновения таких рекомбинантов [19, 20]. По-видимому, рекомбинация пластома (в отличие от хондриома) — чрезвычайно редкое событие, и появление таких форм растений является скорее исключением, чем правилом. Среди регенерантов не выявлено и растений, в которых присутствовали бы одновременно пластиды реципиентного и донорского типов. Таким образом, одновременное функционирование в продуктах слияния протопластов пластид обоих родителей — явление временное, и пластиды одного из партнеров элиминируют, скорее всего, на стадии микроколоний в течение первых недель культивирования.

Среди регенерантов наряду с цибридными формами были выявлены фотосинтезирующие растения, содержащие пластом реципиентного типа. Изучение реципиентной формы картофеля показало, что появление таких растений-ревертантов не связано с химерностью линии Z-3, а обусловлено, по-видимому, обратной мутацией в хлДНК от мутантного (пигментодефектного) к дикому типу пластид. Отсюда следует, что пластоменная мутация хлорофиллдефектности в реципиентной линии Z-3 не связана, по крайней мере, с делецией.

При исследовании ядерной конституции полученных цибридов у всех морфологически нормальных растений число хромосом составляло 48, что соответствует тетраплоидному набору хромо-

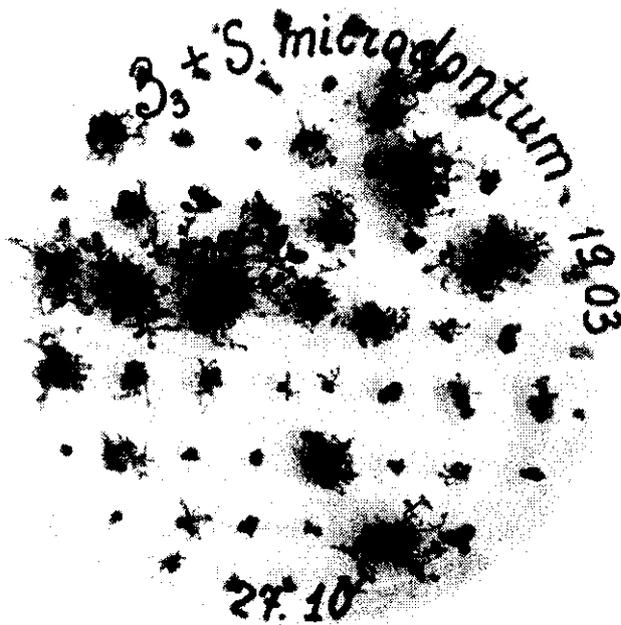


Рис. 1. Регенерация растений из цибридных клонов, отобранных на селективной среде после слияния протопластов «*S. tuberosum* L., сорт Зарево + *S. microdontum* Bitt.»

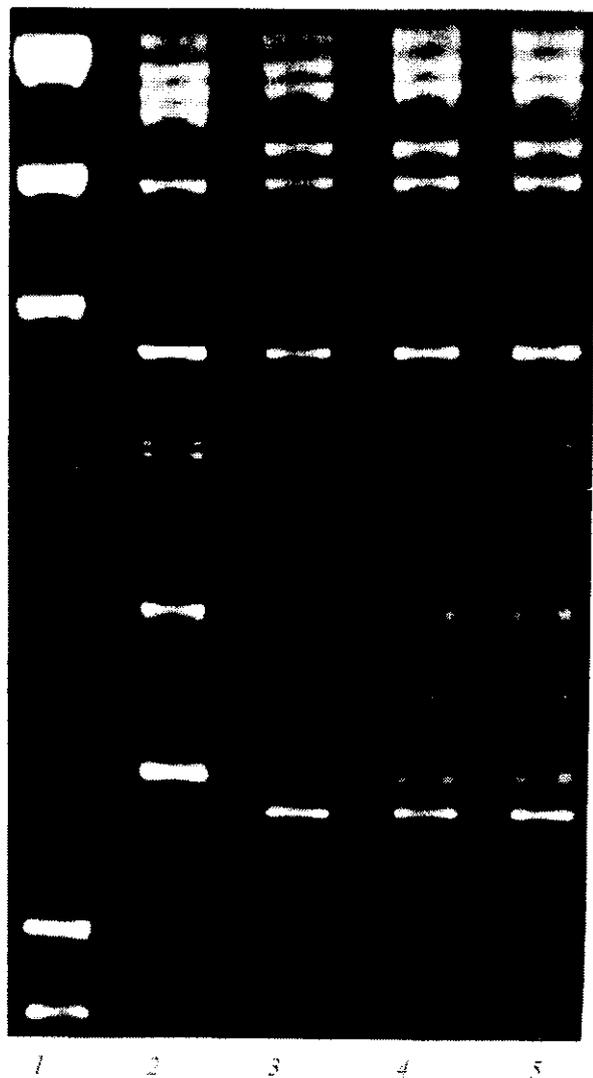


Рис. 2. Результаты рестрикционного анализа хлоропластной ДНК исходных видов и цибридов картофеля с использованием эндонуклеазы *Bam*HI: 1 — ДНК фага λ (*Hind*III-фрагменты); 2 — *S. tuberosum* L., сорт Зарево; 3, 4 — цибридные линии *Smd9*, *Smd11* соответственно; 5 — *S. microdontum* Bitt. Стрелками указаны видоспецифичные фрагменты

сом реципиента ($2n = 4x = 48$) (рис. 3). В то же время среди регенерантов были обнаружены формы с анеуплоидным числом хромосом. Эти растения характеризовались различными аномалиями морфологии: нетипичная форма и размеры листовой пластинки, нарушения апикального доминирования, низкая жизнеспособность и т. д. Появление

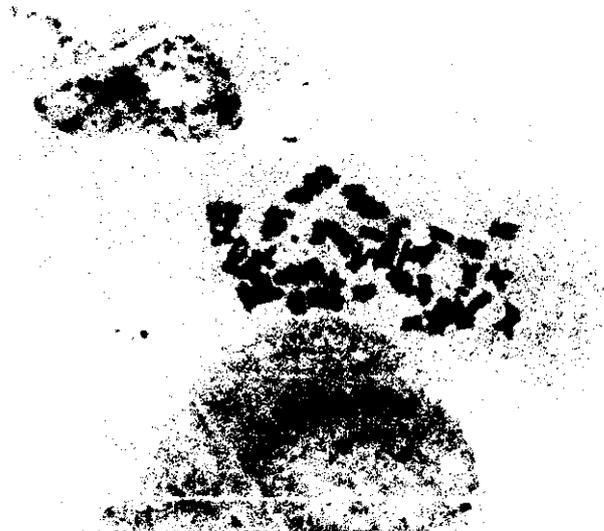


Рис. 3. Тетраплоидный набор хромосом ($2n = 4x = 48$) в меристематической клетке корешка цибридной линии *Smd16*, $\times 1000$

таких растений отмечали в каждом эксперименте по слиянию протопластов, однако их количество не превышало 10 % от общего числа регенерированных растений. По-видимому, возникновение регенерантов с измененным числом хромосом и, как следствие, с аномалиями в развитии растений обусловлено соматклональной изменчивостью, наблюдаемой в культуре *in vitro* [21—24].

У растений с нормальной морфологией, имеющих тетраплоидный набор хромосом и содержащих чужеродные пластиды, исследовали множественные молекулярные формы эстераз. Показано, что полученные в результате слияния растения имеют видоспецифичные формы изоферментов, характерные для сорта Зарево культивируемого картофеля. Данные результаты указывают на сохранение видоспецифичности генома *S. tuberosum* L. у созданных форм цибридных растений.

Морфологию цибридов изучали после переноса растительного материала из пробирок в почву и полной адаптации растений к условиям окружающей среды. Все цибридные линии имели фенотип, типичный для немутантной линии культурного картофеля данного сорта.

Таким образом, в наших исследованиях путем слияния протопластов пластомного хлорофиллдефектного мутанта *S. tuberosum* L. и дикого вида *Solanum* созданы цибридные формы картофеля с хлоропластами *S. microdontum* Bitt. Среди всех регенерантов идентифицированы цибридные расте-



Рис. 4. Внешний вид гибридных растений, содержащих чужеродные хлоропласты, и их исходных родительских форм: 1 — хлорофиллдефектный пластомный мутант *S. tuberosum* L., сорт Зарево, линия Z-3; 2, 3 — гибридные линии *Smd9*, *Smd11* соответственно; 4 — дикий вид *S. microdontum* Bitt.

ния с нормальным фенотипом и окраской, что свидетельствует о совместимости пластома дикого вида картофеля с геномом *S. tuberosum* L. (рис. 4). Важно отметить, что этот вид — донор органелл принадлежит к другой таксономической серии и группе рода *Solanum* L., отличается уровнем плоидности и несовместим с культурным картофелем при гибридизации половым путем.

Известно, что в большинстве случаев существует прямая корреляция между совместимостью ядра одного вида с органеллами другого и филогенией этих видов. Так, к настоящему времени получены функциональные межвидовые цибриды в родах *Nicotiana* [25], *Brassica* [26], *Citrus* [27], *Daucus* [28] и *Solanum* [29]. Кроме того, путем слияния протопластов получено несколько межродовых цибридов [30—31] и в ряде случаев показана ядерноцитоплазматическая совместимость даже

между отдаленными видами. В то же время имеются сообщения [32] о том, что получение растений *S. tuberosum* L. с хлоропластами/митохондриями некоторых диких видов (*S. brevidens*, *S. etuberosum*, *S. commersonii*) приводит к дефектам пигментации (от светло-зеленой до почти белой окраски) и мужской стерильности цибридов.

В данной работе мы не наблюдали признаков ядерно-пластомной несовместимости у полученных цибридов, по крайней мере, на уровне фенотипа растений. Следовательно, результаты экспериментов доказывают возможность реконструкции цитоплазмы культурного картофеля путем слияния протопластов и создания морфологически нормальных растений, содержащих ядро *S. tuberosum* L. и пластиды дикого клубненосного вида *S. microdontum* Bitt. Практическая ценность полученных растений заключается в том, что цибриды могут быть

непосредственно использованы в растениеводстве: без дополнительных рекуррентных скрещиваний, поскольку ядерный материал реципиента, а значит и все сортоспецифические признаки культурного картофеля остаются без изменений. В дальнейшем сравнительное изучение созданных аллоплазматических линий картофеля позволит идентифицировать ценные признаки, кодируемые хлДНК, установить эффекты взаимодействия ядерных и оргanelльных генов, изучить влияние чужеродной цитоплазмы на признаки и свойства растений, а также оценить возможность использования цибридов в селекции для сортоулучшения картофеля.

Д. П. Євтушенко, А. М. Шаховський, В. А. Сидоров

Реконструкція цитоплазми картоплі шляхом перенесення хлоропластів із дикого виду *Solanum* та регенерація цибридних форм рослин

Резюме

Хлоропласти *Solanum microdontum* Bitt. перенесено в хлорофілдефектний пластомний мутант *S. tuberosum* L. і створено цибридні рослини картоплі, що містять чужорідні оргanelли. Селекція цибридних клонів ґрунтувалася на відновленні фотосинтетичної активності клітинних колоній, які росли на середовищі з низьким вмістом джерел вуглеводного живлення. Рестрикційний аналіз хлДНК, вивчення каріотипу та ізоферментний аналіз естераз показали присутність в отриманих цибридах пластид *S. microdontum* Bitt. і ядра культурної картоплі. Ядерно-органельна сумісність створених цибридів картоплі дає можливість поліпшити вихідні характеристики генотипу *S. tuberosum* L.

D. P. Yevtushenko, A. M. Shakhovsky, V. A. Sidorov

Potato cytoplasm reconstruction by chloroplast transfer from a wild *Solanum* species and regeneration of cybrid plants

Summary

Protoplast fusion was used to transfer *Solanum microdontum* Bitt. chloroplasts into chlorophyll-deficient plastome mutant of *S. tuberosum* L. and produce potato cybrid plants with alien organelles. The selection procedure was based on restoration of photosynthetic ability in the cybrid colonies growing onto a nutrient medium with low level of carbon sources. Chromosome counting, isozyme analyses for esterase and restriction analysis of chDNA revealed the presence of *S. microdontum* Bitt. plastids and potato nuclei in the fusion-derived cybrids. Phenotype of the cybrid plants was similar to the cultivated potato. Nuclear-organelle compatibility of the potato cybrids provides potential for improvement of *S. tuberosum* L. genotype.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Рейвн П., Эверт Р., Айхорн С. Современная ботаника.— М.: Мир, 1990.—Т. 2.—344 с.
2. Kirk J. T. O., Tilney-Bassett R. A. E. The plastids: the chemistry, structure, growth and inheritance.—New-York, Amsterdam: Elsevier North Holland, 1978.—960 p.
3. Hosaka K., Hanneman R. E. J. The origin of the cultivated tetraploid potato based on chloroplast DNA // Theor. and Appl. Genet.—1988.—76, N 2.—P. 172—176.
4. Medgyesy P. Selection and analysis of cytoplasmic hybrids // Plant cell line selection / Ed. P. J. Dix.—Weinheim, New-York, 1990.—P. 287—316.
5. Камераз А. Я. Межвидовая и внутривидовая гибридизация картофеля // Генетика картофеля.—М.: Наука, 1973.—С. 104—121.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. plant.—1962.—15, N 3.—P. 473—497.
7. Morel G., Wetmore R. H. Fern callus tissue culture // Amer. J. Bot.—1951.—38.—P. 141—143.
8. Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация пасленовых.—Киев: Наук. думка, 1985.—132 с.
9. Howland G. P., Hart R. W. Radiation biology of cultured plant cells // Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture.—Berlin etc.: Springer, 1977.—P. 731—756.
10. Menczel L., Nagy F., Kiss Z. R., Maliga P. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: correlation of resistance to *N. tabacum* plastid // Theor. and Appl. Genet.—1981.—59, N 2.—P. 191—195.
11. Sidorov V. A., Zubko M. K., Kuchko A. A., Komarnitsky I. K., Gleba Y. Y. Somatic hybridization in potato: use of γ -irradiated protoplasts of *Solanum pinnatisectum* in genetic reconstruction // Theor. and Appl. Genet.—1987.—74.—P. 364—368.
12. Shillito R. D., Paszkowski J., Potrykus I. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species // Plant Cell Reports.—1983.—2.—P. 244—247.
13. Drageit K. I., Myhre S., Skjak-Brik G., Ostgaard K. Regeneration, cultivation and differentiation of plant protoplasts immobilized in Ca-alginate beads // Plant Physiol.—1988.—132.—P. 552—556.
14. Wilson A. J., Chourey P. S. A rapid inexpensive method for the isolation of restrictable mitochondrial DNA from various plant sources // Plant Cell Reports.—1984.—3, N 6.—P. 237—239.
15. Bookjans G., Stummann B. M., Hennigsen K. W. Preparation of chloroplast DNA from *Pea* plastids isolated in a medium of high ionic strength // Anal. Biochem.—1984.—141.—P. 244—247.
16. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual.—New-York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
17. Дарлингтон С. Д., ла Кур Л. Ф. Хромосомы, методы работы.—М.: Атомиздат, 1980.—182 с.
18. Сидоров В. А., Самойлов В. М., Дубинич В. Л. Селекция *in vitro* цитоплазматических мутантов картофеля // Генетика.—1990.—26.—С. 84—90.
19. Medgyesy P., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1985.—82, N 20.—P. 6960—6964.
20. Thanh N. D., Medgyesy P. Limited chloroplast gene transfer via recombination overcomes plastome — genome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum* // Plant Mol. Biol.—1989.—12, N 1.—P. 87—97.
21. Shepard J. F., Bidney D., Shanin E. Potato protoplasts in crop improvement // Science.—1980.—208, N 4439.—P. 17—24.
22. Thomas B. R., Pratt D. Isolation of paraquat-tolerant mutants from tomato cell cultures // Theor. and Appl. Genet.—1982.—63.—P. 169—176.

23. Lorz H., Scowcroft W. R. Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum* // Theor. and Appl. Genet.—1983.—66, N 1.—P. 67—75.
24. Сидоров В. А., Сидорова Н. В. Соматональная изменчивость — источник генетического разнообразия у растений // Цитология и генетика.—1987.—21, № 3.—С. 230—237.
25. Zelcer A., Aviv D., Galun E. Interspecific transfer of cytoplasmic male sterility by fusion between protoplasts of normal *Nicotiana sylvestris* and X-ray irradiated protoplasts of male sterile *N. tabacum* // Z. Pflanzen. Physiol.—1978.—90.—P. 397—408.
26. Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rousselle R., Renard M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion // Mol. and Gen. Genet.—1983.—191.—P. 244—250.
27. Vardi A., Breiman A., Galun E. Citrus cybrids: production by the donor-recipient protoplast-fusion and verification by mitochondrial-DNA restriction profiles // Theor. and Appl. Genet.—1987.—75.—P. 51—58.
28. Ichikawa H., Tanno-Suenaga L., Imamura J. Selection of *Daucus* cybrids based on metabolic complementation between X-irradiated *D. capillifolius* and iodacetamide-treated *D. carota* by somatic cell fusion // Theor. and Appl. Genet.—1987.—74.—P. 746—752.
29. Сидоров В. А., Самойлов В. М., Самойлов А. М., Глагоцкая Т. Ц., Глеба Ю. Ю. Цибриды картофеля с цитоплазмой различных видов пасленовых // Докл. АН СССР.—1989.—308, № 3.—С. 741—743.
30. Glimelius K., Bonnett H. T. *Nicotiana* cybrids with *Petunia* chloroplasts // Theor. and Appl. Genet.—1986.—72, N 6.—P. 794—798.
31. Kushnir S. G., Shlumukov L. R., Pogrebnyak N. J., Gleba Y. Y. Functional cybrid plants possessing a *Nicotiana* genome and a *Atropa* plastome // Mol. and Gen. Genet.—1987.—209.—P. 159—163.
32. Perl A., Aviv D., Galun E. Nuclear-organelle interaction in *Solanum*: Interspecific cybridizations and their correlation with a plastome dendrogram // Mol. and Gen. Genet.—1991.—228.—P. 193—200.

УДК 575.222.7+582.951.4
Поступила в редакцию 19.10.98