

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ЗЛИТТЯ ПРОТОПЛАСТІВ У КЛІТИННІЙ ІНЖЕНЕРІЇ BRASSICACEAE

О.О. ОВЧАРЕНКО *, В.А. РУДАС, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії, Національна академія наук України, вул. Заболотного, 148, Київ, 03143, Україна

E-mail: ovcharenkoo77@gmail.com

Представники родини Brassicaceae є важливими олійними, овочевими та кормовими культурами. Види Brassicaceae також використовують для фітореMediaції ґрунтів, забруднених важкими металами, або як сидерати та декоративні рослини. Розширення біорізноманіття вже існуючих сортів культивованих Brassicaceae шляхом генно-інженерних маніпуляцій може підвищити стійкість до біотичних і абіотичних стресів, підвищити продуктивність рослин і якість продукції. Метод злиття протопластів робить можливим штучне створення різноманітних соматичних гібридів між різними видами рослин. В огляді представлено досягнення у злитті протопластів культивованих видів роду Brassica та їх диких родичів; основні напрямки соматичної гібридизації у Brassicaceae; умови отримання та селекції соматичних гібридів; особливості успадкування генетичного матеріалу; інтрогресію господарсько важливих ознак до культивованих видів Brassicaceae шляхом соматичної гібридизації; ресинтез алотетраплоїдних видів; створення алоплазматичних ліній з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (ЦЧС) та соматичних гібридів для фітореMediaції забруднених важкими металами ґрунтів, а також отримання транспластомних рослин шляхом перенесення генетично змінених пластид методом злиття протопластів.

Ключові слова: Brassicaceae, культура протопластів, соматична гібридизація, цитоплазматична чоловіча стерильність, транспластомні рослини.

Вступ

Види роду Brassica утворюють важливу групу сільськогосподарських рослин, які вирощуються як олійні, овочеві та кормові культури (Jabeen, 2020). Дикі рослини та деякі культивовані види родини Brassicaceae є потенційними донорами цінних генів для збільшення генетичного різноманіття культивованих видів і сортів. Найбільше практичне значення мають 6 видів роду Brassica, три з яких мають диплоїдний набір хромосом, ще три — дигеномні алотетраплоїди, що утворилися в ре-

зультаті спонтанної гібридизації між згаданими вище диплоїдними видами (U, 1935). Капуста (*Brassica oleracea*), гірчиця чорна (*B. nigra*) і ріпа (*B. rapa* syn. *B. campestris*) є диплоїдними, тоді як ріпак (*B. napus*), гірчиця сарептська (*B. juncea*) і гірчиця абісинська (*B. carinata*) є алотетраплоїдами. *B. napus* є важливою олійною культурою в Європі та Канаді, *B. juncea* в Індії, а *B. carinata* в Африці. Клітинна інженерія, як галузь біоінженерії, може підвищити стресостійкість, продуктивність рослин і якість продукції і, таким чином, розширити біорізноманіття та екологічну пластичність уже існуючих Brassicaceae. У цьому огляді узагальнено попередні досягнення та останні результати щодо використання культури протопластів Brassicaceae у клітинній інженерії.

Основні напрямки соматичної гібридизації в родині Brassicaceae

Існує широке генетичне різноманіття диких і рудеральних видів, пов'язаних із родом Brassica. Введення нових генів і ресинтез *de novo* вже існуючих алополіплоїдних видів розширює генетичне різноманіття культивованих Brassicaceae. Інтрогресія чужорідних генів дозволяє підвищити стійкість рослин до стресових змін клімату, змінити оптимальні умови вирощування та розширити посівні площі в інших кліматичних зонах. Для вирішення цих проблем широко застосовували статево гібридизацію (Chevre et al, 1991; Inomata, 1993; Takahata et al, 1993; Inomata, 1994; Vyas et al, 1995; Rao et al, 1996; Srinivasan et al, 1998; Chrungu et al, 1999; Choudhary et al, 2000; Rieger et al, 2001; також див. огляд Kaneko Y and Bang, 2014). Однак її можливості часто обмежені через повну або часткову несумісність віддалених видів. Одним із випадків часткової несумісності є можливість отримати гібриди при прямому схрещуванні двох видів і неможливість при зворотному. Материнське успадкування цитоплазматичних органел призводить до того, що

існують обмеження на можливість поєднання певних ядерних і цитоплазматичних генів.

Соматична гібридизація культивованих видів з віддаленими родичами є одним із шляхів розширення генетичного різноманіття, оскільки дозволяє обійти низку бар'єрів, що виникають при статевому схрещуванні. Поліпшення культивованих видів можливе за такими напрямками:

1) перенесення генів, що визначають ознаки пов'язані з продуктивністю (зокрема, зміни параметрів фотосинтезу (Toriyama et al, 1987a; Kirti et al, 1992b; O'Neill et al, 1996; Yan et al, 1999), хімічний склад олії (Fahleson et al, 1994; Skarzhinskaya et al, 1996; Schröder-Pontoppidan et al, 1999; Hu et al, 2002);

2) перенесення генів стійкості до шкідників (Sikdar et al, 1990; Lelivelt, Krens, 1992) і хвороб, викликаних патогенними мікроорганізмами (Kirti et al, 1991; Nagimori et al, 1992; Kirti et al, 1992a; Kirti et al, 1992b; Narasimhulu et al, 1994; Kirti et al, 1995; Gaikwad et al, 1996; Hansen, Earle, 1997; Sigareva, Earle, 1999b; Ren et al, 2000; Bohman et al, 2002; Wang et al, 2006; Zhang et al, 2008; Du et al, 2009; Scholze et al, 2010; Du et al, 2016; Kumari et al, 2018);

3) перенесення генів стійкості до абіотичного стресу (температури (Sigareva, Earle, 1999b; Du et al, 2009; Kumari et al, 2018, 2019), дефіциту води (Sikdar et al, 1990; Begum et al, 1995),

хімічного забруднення ґрунту (Kirti et al, 1991; Brewer et al, 1999; Gleba et al, 1999));

4) створення нових алоплазматичних ліній з цитоплазматичною чоловічою стерильністю, що дозволяє отримувати гетерозисні гібриди роду *Brassica* (певна комбінація цитоплазматичних і ядерних генів важлива для індукції та підтримки чоловічої стерильності, а також відновлення фертильності) (Cameya et al, 1989; Kirti et al, 1995; Sakai et al, 1996; Chopra et al, 1996; Prakash et al, 1998; Liu-Clarke et al, 1999; Du et al, 2016);

5) ресинтез алополіплоїдів шляхом злиття протопластів диплоїдних видів з високою екологічною пластичністю (Narasimhulu et al, 1992; Hansen, Earle, 1994; Chopra et al, 1996; Heath, Earle, 1996).

Соматичні гібриди, отримані у *Brassicaceae* шляхом злиття протопластів, наведені в табл. 1. На сьогодні вже отримано міжвидові, міжродові та міжтрибні соматичні гібриди. Gleba and Hoffmann (1978, 1980) першими створили міжтрибні соматичні гібриди *B. campestris* + *A. thaliana*. Надалі можливість створення міжтрибних гібридів була неодноразово підтверджена (табл. 1). Хоча перші отримані гібриди були тератоморфними та стерильними (Gleba and Hoffmann, 1980), подальші дослідження продемонстрували можливість отримання фертильних рослин (Fahleson et al, 1994; Forsberg et al,

Таблиця 1. Міжвидові, міжродові та міжтрибні соматичні гібриди у *Brassicaceae*

Культивований вид	Дикий або культивований вид	Посилання
<i>Міжвидові</i>		
<i>Brassica oleracea</i>	<i>Brassica carinata</i>	Scholze et al, 2010
	<i>Brassica nigra</i>	Narasimhulu et al, 1992; Jourdan and Salazar, 1993; Zhang et al, 2008; Scholze et al, 2010; Wang et al, 2011
	<i>Brassica rapa</i>	Sundberg and Glimelius, 1986; Hansen and Earle, 1994; Ozminowski and Jourdan, 1994; Heath and Earle, 1996; Ren et al, 2000
<i>Brassica napus</i>	<i>Brassica juncea</i>	Scholze et al, 2010
	<i>Brassica nigra</i>	Sahno et al, 1991
	<i>Brassica oleracea</i>	Sundberg et al 1991
<i>Brassica juncea</i>	<i>Brassica tournefortii</i>	Liu Clarke et al, 1999
	<i>Brassica oleracea</i>	Arumugam et al, 1996
	<i>Brassica rapa</i>	Lian et al, 2012
<i>Brassica carinata</i>	<i>Brassica spinescens</i>	Kirti et al, 1991
	<i>Brassica tournefortii</i> × <i>Brassica oleracea</i>	Mukhopadhyay et al, 1994

Культурований вид	Дикий або культурований вид	Посилання
<i>Міжродові</i>		
<i>Brassica oleracea</i>	<i>Armoracia rusticana</i>	Navratilova, 1997
	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Scholze et al, 2010
	<i>Matthiola incana</i>	Sheng et al, 2008, Scholze et al, 2010
	<i>Moricandia arvensis</i>	Toriyama et al, 1987a; Ishikawa et al, 2003
	<i>Moricandia nitens</i>	Yan et al, 1999
	<i>Raphanus sativus</i>	Cameya et al, 1989; Hagimori et al, 1992; Scholze et al, 2010
	<i>Sinapis alba</i>	Hansen and Earle, 1997; Scholze et al, 2010
	<i>Sinapis turgida</i>	Toriyama et al, 1987b
<i>Brassica nigra</i>	<i>Raphanus sativus</i> × <i>Brassica oleracea</i>	Arumugam et al, 2002
<i>Brassica napus</i>	<i>Sinapis turgida</i>	Toriyama et al, 1987
	<i>Crambe abyssinica</i>	Wang et al, 2003
	<i>Diplotaxis harra</i>	Klimaszewska and Keller, 1988
	<i>Moricandia arvensis</i>	O'Neil et al, 1996
	<i>Orychophragmus violaceus</i>	Hu et al, 2002; Vasylenko et al, 2003; Sakhno et al, 2007; Zhao et al, 2008
	<i>Raphanus sativus</i>	Lelivelt and Krens, 1992; Sakai and Imamura, 1994; Wang et al, 2006
	<i>Sinapis alba</i>	Wang et al, 2005
	<i>Sinapis arvensis</i>	Hu et al, 2002
	<i>Diplotaxis muralis</i>	Chatterjee et al, 1988
	<i>Diplotaxis harra</i>	Begum et al, 1995
	<i>Eruca sativa</i>	Sikdar et al, 1990
	<i>Moricandia arvensis</i>	Kirti et al, 1992b
	<i>Rorippa indica</i>	Jiang et al, 2007
	<i>Sinapis alba</i>	Gaikwad et al, 1996; Kumari et al, 2018
	<i>Trachystoma ballii</i>	Kirti et al, 1992a
	<i>Diplotaxis catholica</i>	Kirti et al, 1995
<i>Raphanus sativus</i>	<i>Diplotaxis tenuifolia</i>	Ueno et al, 2003
<i>Міжтрибні</i>		
<i>Brassica campestris</i> (<i>Brassica rapa</i>)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Gleba and Hoffman, 1978
<i>Brassica nigra</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Siemens and Sacristan, 1995
	<i>Isatis indigotica</i>	Tu et al, 2008
<i>Brassica oleracea</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Nitovskaya and Shakhovskii, 1998; Yamagishi and Nakagawa, 2004
	<i>Barbarea vulgaris</i>	Scholze et al, 2010
	<i>Camelina sativa</i>	Hansen, 1998
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Scholze et al, 2010
	<i>Hesperis matronalis</i>	Scholze et al, 2010
<i>Brassica napus</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bauer-Weston et al, 1993; Forsberg et al, 1994; Yamagishi et al, 2002; Ovcharenko et al, 2005b
	<i>Barbarea vulgaris</i>	Fahleson et al, 1994
	<i>Camelina sativa</i>	Jiang et al, 2009
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	Sigareva and Earle, 1999
	<i>Lesquerella fendleri</i>	Skarzhinskaya et al, 1996; Nitovska et al, 2006
	<i>Thlaspi caerulescens</i>	Begum et al, 1995
	<i>Thlaspi perfoliatum</i>	Fahleson et al, 1994

Культурований вид	Дикий або культурований вид	Посилання
<i>Brassica juncea</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Isatis indigotica</i> <i>Thlaspi caerulescens</i>	Ovcharenko et al, 2004 Du et al, 2009 Gleba et al, 1999
<i>Brassica carinata</i>	<i>Camelina sativa</i>	Narasimhulu et al, 1994
<i>Orychophragmus violaceus</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Brassica juncea</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Lesquerella fendleri</i>	Ovcharenko et al, 2005a Ovcharenko et al, 2005a Ovcharenko et al, 2011
<i>Raphanus sativus</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Isatis indigotica</i>	Yamagishi and Glimelius, 2003 Tu et al, 2008

1994; Skarzhinskaya et al, 1996; Brewer et al, 1999; Gleba et al, 1999; Yamagishi et al, 2002; Yamagishi et al, 2003; Wang et al 2005; Tu et al, 2008; Du et al, 2009; Kumari et al, 2018). Іноді пилкок соматичних гібридів, навіть у близьких філогенетичних комбінаціях, є частково або повністю стерильним (Lian et al, 2012), але насіння можна отримати шляхом запилення пилком одного з батьківських видів (Kirti et al, 1992b; Forsberg et al, 1994; Kirti et al, 1995; Skarzhinskaya et al, 1996; Wang et al, 2005; Wang et al, 2006). Іноді навіть після запилення батьківським пилком виникають труднощі в отриманні життєздатного насіння для отримання наступного покоління від соматичних гібридів. Тоді необхідне використання техніки порятунку ембріонів *in vitro* (Scholze et al, 2010). В інших випадках фертильність пилку може становити близько 50 %, як у гібрида *B. oleracea* + *Moricandia arvensis* (Ishikawa et al, 2003), 70,5 %, як у гібрида *B. napus* + *Isatis indigotica* (Du et al, 2009), або навіть 77 %, як у гібрида *B. napus* + *S. alba* (Wang et al, 2005). У деяких випадках життєздатне насіння можна отримати шляхом зворотного схрещування соматичного гібрида не тільки з батьківським алополіплоїдним видом, але також із його диплоїдним предком. Соматичні гібриди *B. juncea* + *Sinapis alba* змогли дати насіння, запилюючись пилком як *B. juncea* так і *B. campestris* (Gaikwad et al, 1996).

Методи отримання соматичних гібридів

Для створення соматичних гібридів необхідна наявність розробленої процедури виділення протопластів. Успіх залежить від багатьох факторів, таких як джерело протопластів

(листя, гіпокотили, клітинна суспензія), вид і сорт рослини, фізіологічний стан рослини-донора, склад ферментативної суміші та період її впливу, осмотичні характеристики розчинів для виділення та інші фактори під час ізоляції протопластів (див. огляд Navrátilová, 2004).

Злиття протопластів за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) є основним методом отримання соматичних гібридів у *Brassicaceae* (Gleba and Hoffmann, 1978; Chatterjee et al, 1988; Klimaszewska and Keller, 1988; Sikdar et al, 1990; Kirti et al, 1991; Sundberg et al, 1991; Kirti et al, 1992a; Kirti et al, 1992b; Lelivelt et al, 1992; Narasimhulu et al, 1992; Sahno et al, 1992; Bauer-Weston et al, 1993; Fahleson et al, 1994; Forsberg et al, 1994; Hansen and Earle 1994; Narasimhulu et al, 1994; Begum et al, 1995; Kirti et al, 1995; O'Neil et al, 1996; Rao et al, 1996; Skarzhinskaya et al, 1996; Hansen and Earle 1997; Navratilova, 1997; Yan et al, 1999; Sigareva and Earle, 1999b; Yamagishi et al, 2002; Vasylenko et al, 2003; Sakhno et al, 2007; Ovcharenko et al, 2004; Ovcharenko et al, 2005a; Ovcharenko et al, 2005b; Nitovska et al, 2006; Vasylenko et al, 2006; Jiang et al, 2007; Zhao et al 2008; Scholze et al, 2010; Ovcharenko et al, 2011; Wang et al, 2011; Lian et al, 2012; Kumari et al, 2018). Обробка ПЕГ викликає агрегацію клітин, а подальше використання розчинів з високим рН і вмістом Ca^{2+} призводить до злиття мембран. Методи з використанням декстрану (Toriyama et al, 1987a; Toriyama et al, 1987b; Kameya et al, 1989), високого рН/ Ca^{2+} (Mukhopadhyay et al 1994; Arumugam et al, 1996) та електрозлиття (Hagimori et al, 1992; Gaikwad et al, 1996; Brewer et al, 1999; Wang et al, 2005; Jiang et al, 2009) рідше вико-

ристовували для злиття протопластів у Brassicaceae.

Після злиття протопластів зазвичай отримують суміш злитих клітин, які називають гетерокаріонами, та батьківських. Одним із найважливіших етапів отримання соматичних гібридів є відбір гібридних рослин. Селекцію соматичних гібридів можна проводити на різних етапах розвитку: від моменту закінчення злиття протопластів до регенерації рослин. Спосіб відбору та час його застосування залежать від властивостей і генетичних ознак вихідного рослинного матеріалу, а також методу обробки батьківських клітин для їх інактивації (табл. 2).

Злиття морфологічно різних протопластів (гіпокотильних/калюсних з мезофільними) до-

зволяє відбирати гетерокаріони відразу після злиття. Такий вибір може здійснюватися вручну або автоматично. В останньому випадку гіпокотильні протопласти попередньо забарвлюють 5-карбоксіфлуоресцеїндацетатом. Метод довів свою ефективність; не потребує додаткового часу для отримання генетично маркованих рослин. Трудомістка ручна селекція гетерокаріонів або необхідність дорогого обладнання у випадку потокового сортування є головними недоліками цієї системи відбору.

Іноді гібридні клітини мають кращу здатність до регенерації, ніж клітини батьківського виду. Якщо протопласти батьківського виду не здатні до клітинного поділу або регенерації рослин з вже сформованих клітин, такі умови

Таблиця 2. Методи селекції соматичних гібридів у Brassicaceae

Особливості/характеристики клітин та обробка батьківських видів	
Партнер I	Партнер II
Мезофільні протопласти	Протопласти з етиольованих гіпокотилів або калюсні
Прижиттєве фарбування протопластів	Мезофільні протопласти
Обробка протопластів йодацетатом для інгібування їх метаболізму	Протопласти не здатні регенерувати при використаних умовах
Обробка протопластів йодацетатом для інгібування їх метаболізму	Протопласти калюсних ліній з морфологічними особливостями
Обробка протопластів йодацетатом для інгібування їх метаболізму	γ -, X- чи УФ-опромінення протопластів
Необроблені мезофільні протопласти	γ -опромінення + індукція нітрозоетилсечовиною пластомних мутацій
Протопласти дикого типу	Протопласти не здатні до поділу за використаних в експерименті умов, або γ -, УФ- чи X-опромінені
Хлорофілдефектна лінія	γ -опромінення мезофільних протопластів
Хлорофілдефектна лінія з високою регенераційною здатністю	Мезофільні протопласти з поганою регенераційною здатністю
Протопласти дикого типу	Протопласти, стійкі до антибіотиків (але не здатні ділитися в застосовуваних умовах або з опроміненої лінії); протопласти з лінії, стійкої до 5-МТ і дефектної нітратредуктази
Використання комплементарних селективних маркерів	
Фізіологічна комплементация за здатністю до поділу та регенерації	

можна використовувати для культивування гетерокаріонів і регенерації соматичних гібридів. Обмеженнями цього методу селекції є непередбачуваність результатів експерименту та необхідність попереднього тестування обох батьківських видів у культурі протопластів.

Іноді протопласти виду з низькою здатністю до поділу *in vitro* зливаються з протопластами виду з високою частотою поділів (Chatterjee et al, 1988; Sikdar et al, 1990). У суміші для злиття кількість протопластів виду, що активно ділиться, має бути зменшена порівняно з кількістю протопластів виду з низькою частотою поділів. При змішуванні в такому співвідношенні, протопласти виду, з високою здатністю до поділів, утворюють гетерокаріони з високою частотою (близько 70 % від загальної

кількості клітин). Це підвищує ймовірність отримання гібридних рослин і зменшує можливість регенерації рослин з незлитих клітин виду з високою регенераційною здатністю. Гібриди відбирають за морфологічними ознаками та результатами генетичних аналізів.

Застосування комплементарних селективних маркерів (трансгенів або мутантних генів) для селекції рослин збільшує можливість отримання гібридів. Створення генетично маркованих рослин вимагає додаткових витрат часу та зусиль, але окупається в майбутньому, оскільки полегшує селекцію та аналіз гібридів.

Соматичні гібриди, хоч і з низькою частотою, можна отримати навіть за відсутності будь-якої селекції *in vitro*. Виявлення гібридів у загальній популяції рослин, регенерованих

Селекція	Посилання
Механічний ручний відбір гібридних клітин відразу після злиття або селекція за морфологією регенерантів	Gleba and Hoffmann, 1978; Kirti et al, 1991; Kirti et al, 1992a; Kirti et al, 1992b; Narasimhulu et al, 1994
Автоматичне потокове сортування гібридних клітин	Sundberg et al, 1991; Bauer-Weston et al, 1993; Fahleson et al, 1994a; Fahleson et al, 1994b; Skarzhinskaya et al, 1996; Dushenkov et al, 2002
Відновлення регенераційної здатності	Hagimori et al, 1992; Hansen and Earle, 1999; Sigareva and Earle, 1999a; Sigareva and Earle, 1999b; Hu et al, 2002
Морфологія калюсів	Klimaszewska and Keller, 1988
Відновлення здатності до поділу клітин	Sakai and Imamura, 1994; O'Neil et al, 1996; Hansen and Earle, 1997; Hu et al, 2002; Yamagishi et al, 2002; Zhao et al, 2008; Tu et al, 2008; Du et al, 2009
Відбір стрептиміцин/спектиноміцин стійких рослин	Rao et al, 1996
Морфологічні ознаки	Chatterjee et al, 1988; Sikdar et al, 1990; Lelivelt and Krens, 1992; Begum et al, 1995; Gaikwad et al, 1996; Brewer et al 1999; Gleba et al, 1999; Scholze et al, 2010
Ріст зелених колоній та здатність до регенерації	Rao et al, 1996; Ovcharenko et al, 2011
Зелені колонії здатні до регенерації	Vasylenko et al, 2003
Здатність до росту в присутності селективної речовини	Toriyama et al, 1987; Bauer-Weston et al, 1993; Ovcharenko et al, 2004; Ovcharenko et al, 2005a; Ovcharenko et al, 2005b; Sakhno et al, 2007
Відбір клітин, здатних ділитися в селективних умовах	Mukhopadhyay et al, 1994; Arumugam et al, 1996
Відбір клітин, здатних до поділу та регенерації рослин за певних умов культивування	Narasimhulu et al, 1992

після злиття, можна проводити серед рослин в умовах закритого ґрунту (Gaikwad et al, 1996). Однак цей спосіб відбору не дуже ефективний і трудомісткий.

Використання хлорофілдефектних рослин полегшує отримання асиметричних гібридів з донорною цитоплазмою, особливо якщо протопласти донора було опромінено. Обробка УФ-, рентгенівськими або γ -променями пригнічує поділ клітин, часто призводить до перебудови (Bohman et al, 2002) та/або елімінації генетичного матеріалу опромінених видів, сприяє отриманню асиметричних гібридів, а іноді покращує їх фертильність (Skarzhinskaya et al, 1996; Forsberg et al, 1998a, 1998b; Wang et al, 2003; Zhang et al, 2008; Wang et al, 2011).

У деяких випадках, використання опромінення протопластів одного виду поєднували з обробкою протопластів іншого виду токсичними сполуками, наприклад, йодацетамідом (Tu et al, 2008; Zhao et al, 2008; Du et al, 2009). Цей метод обробки отримав назву методу подвійної інактивації протопластів (Sidorov et al, 1981). Клітини обох батьківських видів втрачають здатність до поділу, і тільки взаємна комплементация призводить до відновлення поділів у гетерокаріонах.

Іноді, клітини виду, який несе селективний ген, обробляють лише йодацетамідом, а соматичні гібриди відбирають за їх здатністю рости на селективному середовищі (Sakhno et al, 2007).

Генетичний аналіз соматичних гібридів родини Brassicaceae

Успадкування ядерних геномів в соматичних гібридів. Зазвичай дослідники отримують симетричні соматичні гібриди, що мають проміжні морфологічні ознаки батьківських видів, якщо не були застосовані спеціальні методи інактивації геному одного з батьківських видів (розглянуті вище). Симетричні соматичні гібриди містять комбінацію обох повних батьківських геномів. Якщо перед соматичною гібридизацією було використано опромінення одного з батьків, можна отримати асиметричні гібриди, які мають менше число хромосом, ніж сума диплоїдних наборів вихідних батьківських видів (Chatterjee et al, 1988; Zhang et al, 2008).

Злиття протопластів віддалених видів іноді призводить до утворення асиметричних гібридів

через спонтанну втрату генетичного матеріалу одного з батьків. Показано, що часткова елімінація хромосом відбувається у ряду соматичних гібридів: *A. thaliana* + *B. campestris* (Gleba, Hoffmann F, 1978), *B. juncea* + *Eruca sativa* (Sikdar et al, 1990), *B. napus* + *B. nigra* (Sundberg, Glimelius, 1991), *B. napus* + *R. sativus* (Sundberg, Glimelius, 1991), *B. napus* + *E. sativa* (Sundberg, Glimelius, 1991), *B. napus* + *A. thaliana* (Forsberg et al, 1994; Ovcharenko et al, 2005b), *B. napus* + *L. fendleri* (Skarzhinskaya et al, 1998), *Brassica juncea* + *A. thaliana* (Ovcharenko et al, 2004), *Orychophragmus violaceus* + *A. thaliana* (Ovcharenko et al, 2005a), *R. sativus* + *A. thaliana* (Yamagishi et al, 2003). Спонтанну втрату хромосом спостерігали також у деяких соматичних гібридів родини пасльонових: *Lycopersicon peruvianum* + *Petunia hybrida* (Tabaeizadeh et al, 1985), *Nicotiana tabacum* + *Atropa belladonna* (Babiychuk et al, 1992), *L. esculentum* + *N. tabacum* (Turpin, 1986), *Nicotiana plumbaginifolia* + *Nicotiana glauca* та *N. plumbaginifolia* + *A. belladonna* (Yemets et al, 2000).

Елімінація генетичного матеріалу, викликаного УФ-опроміненням, у нащадків асиметричних соматичних гібридів цвітної капусти (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) і чорної гірчиці (*Brassica nigra*) проявлялася у вигляді широких фенотипічних варіацій. Асиметрична соматична гібридизація та інтрогресія чужорідної ДНК можуть спричинити генетичні та епігенетичні зміни, такі як зміни послідовності нуклеїнових кислот, делеції та зміни в паттернах метилювання цитозину (Wang et al, 2016). Багатоклірна флуоресцентна гібридизація *in situ* є зручним інструментом, який переконливо демонструє приналежність хромосом до відповідного генома в соматичних гібридах.

Втрата батьківських хромосом у соматичних гібридів корелювала з генетичною відстанню між видами – партнерами злиття (Sundberg, Glimelius, 1991). Злиття протопластів споріднених видів призводило до меншої втрати хромосом порівняно з поєднанням віддалених видів. Так, після злиття протопластів *B. napus*+*L. fendleri* у деяких лініях спостерігали спонтанну елімінацію 10 із 12 хромосом *L. fendleri* (без будь-яких обробок, які могли б цьому сприяти) (Skarzhinskaya et al, 1998). Однак Bauer-Weston та ін. не змогли довести повну

елімінацію ядерного генетичного матеріалу *A. thaliana* у соматичних гібридах *B. napus* + *A. thaliana* (Bauer-Weston et al, 1993).

Успадкування органел у соматичних гібридів. Для створення цінних для селекції ліній ЦЧС необхідна сумісна взаємодія мітохондріальних, пластидних і ядерних генів. У табл. 3 наведено результати аналізів геномів мітохондрій і хлоропластів ряду соматичних гібридів Brassicaceae. В результаті злиття протопластів можуть бути утворені гібриди, які містять мітохондрії одного з батьківських видів, обох видів або мітохондрії з рекомбінованими геномами (табл. 3). Як правило, гібриди

містять пластиди одного з батьківських видів, рідше їх суміш (табл. 3). Рекомбінація пластид є рідкісним явищем, але в родині Brassicaceae її спостерігали у нащадків соматичних гібридів між *оху* (пластиди *B. oxyrrhina*) і дикого типу (пластиди *B. juncea*) лініями *B. juncea* (Kirti et al, 1993), в соматичному гібриді *T. ballii* + *B. juncea* (Baldev et al, 1997) і соматичному гібриді *B. oleracea* + *R. sativus* (Kanno et al, 1997).

Дослідники часто спостерігають асиметричну сегрегацію пластид у соматичних гібридів (табл. 3) (Komarnitsky, Gleba, 1981; Lelivelt et al, 1992; Bauer-Weston et al, 1993; Forsberg et al, 1994; Skarzhinskaya et al, 1996; Ishikawa et

Таблиця 3. Успадкування органел у соматичних гібридів між віддаленими видами Brassicaceae

Соматичний гібрид	Органели								Посилання
	Культурованого виду		Дикорослого виду		Змішані		З рекомбінованим геномом		
	Хлоропласти	Мітохондрії	Хлоропласти	Мітохондрії	Хлоропласти	Мітохондрії	Хлоропласти	Мітохондрії	
<i>Arabidopsis thaliana</i> + <i>Brassica campestris</i>	+	нд	-	нд	-	нд	-	нд	Komarnitsky and Gleba, 1981
<i>Brassica napus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	нд	-	нд	-	нд	-	нд	Bauer-Weston et al, 1993
<i>Brassica napus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	Forsberg et al, 1994
<i>Brassica napus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	Yamagishi et al, 2002
<i>Brassica napus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	Leino et al, 2003
<i>Brassica napus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	Ovcharenko et al, 2005b
<i>Brassica napus</i> + <i>Isatis indigotica</i>	+	нд	+	нд	-	нд	-	нд	Du et al, 2009
<i>Brassica napus</i> + <i>Lesquerella fendleri</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	Skarzhinskaya et al, 1996
<i>Brassica napus</i> + <i>Orychophragmus violaceus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	Vasylenko et al, 2003
<i>Brassica napus</i> + <i>Orychophragmus violaceus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	Sakhno et al, 2007
<i>Brassica napus</i> + <i>Raphanus sativus</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	Lelivelt and Krens, 1992
<i>Brassica juncea</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	-	-	+	-	+	-	-	Ovcharenko et al, 2004
<i>Brassica juncea</i> + <i>Diplotaxis catholica</i>	нд	+	нд	+	нд	-	нд	-	Kirti et al, 1995
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Moricandia arvensis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	Ishikawa et al, 2003
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Raphanus sativus</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	Hagimori et al, 1992
<i>Brassica oleracea</i> + <i>Raphanus sativus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	Kanno et al, 1997
<i>Orychophragmus violaceus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	Ovcharenko et al, 2005a
<i>Raphanus sativus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i>	+	-	-	-	-	+	-	+	Yamagishi and Glimelius, 2003
<i>Trachystoma ballii</i> + <i>Brassica juncea</i>	-	нд	-	нд	-	нд	+	нд	Baldev et al, 1997

Примітка. нд – не досліджували.

al, 2003; Leino et al, 2003; Ovcharenko et al, 2004; Ovcharenko et al, 2005a; Ovcharenko et al, 2005b; Sang et al, 2019; Kumari et al, 2020b). Так, із 21 проаналізованого соматичного гібрида *B. napus* + *A. thaliana* лише одна рослина мала пластиди *A. thaliana* (Forsberg et al, 1994). Аналіз соматичних гібридів *B. oleracea* + *M. arvensis* показав, що вони успадкували пластиди та мітохондрії виключно дикого виду (*M. arvensis*), який мав більшу кількість хромосом ($2n = 28$) порівняно з *B. oleracea* ($2n = 18$) (Ishikawa et al, 2003). За даними Sundberg et al переважне успадкування пластид одного з видів залежить від плідності рослини (Sundberg, Glimelius, 1991). В експериментах зі злиття *B. napus* + *L. fendleri* лише сім рослин із 70 мали пластиди *L. fendleri* (Skarzhinskaya et al, 1996). Du та ін. також показали, що лише незначна частина соматичних гібридів *B. napus* + *I. indigotica* успадкувала пластиди виду з меншою кількістю хромосом (Du et al, 2009). Коли протопласти *B. napus* опромінювали перед злиттям з *A. thaliana* для руйнування ядерного генетичного матеріалу, цибридні рослини успадковували пластом *A. thaliana* та мітохондрії обох батьківських видів, хоча їхній ядерний геном не був гібридним і містив виключно ДНК *A. thaliana* (Yamagishi et al, 2002). У соматичних гібридів *O. violaceus* + (*B. juncea* + *A. thaliana*) було отримано поєднання хлоропластів *B. juncea* та мітохондрій *O. violaceus* або *O. violaceus* + *A. thaliana* з гібридним ядром на основі трьох батьківських видів, що підтверджує попередню гіпотезу (Ovcharenko et al, 2005a). Соматична гібридизація *B. napus*+*S. arvensis* і подальше повторне зворотне схрещування цибридів з батьківським сортом *B. napus* призвели до отримання нової *Nsa* ЦЧС лінії. Порівняльний аналіз геномів органел *Nsa* ЦЧС лінії та її батьків виявив, що *Nsa* ЦЧС мітохондріальний геном походить від асиметричного злиття батьківських ліній, але *Nsa* ЦЧС геном хлоропластів був успадкований від *B. napus* (Sang et al, 2019).

RFLP-паттерн ділянки гена великої субодиниці рибульозобісфосфаткарбоксілази показав, що хлоропластний геном лінії з ЦЧС, отриманої шляхом злиття протопластів *B. oleracea* з *R. sativus*, ідентичний до того, який виявили у редьки з чоловічою стерильністю. Це свідчило

про існування гетероплазії в хлоропластах *Brassica* у цих соматичних гібридів (Ohta et al, 2006).

Можна припустити, що у соматичних гібридів Brassicaceae сегрегація пластид більше залежить від ядерно-цитоплазматичних взаємодій, порівняно з мітохондріями.

Перенесення господарсько важливих ознак шляхом соматичної гібридизації

Дикі та деякі культивовані види можуть бути донорами генів стійкості до біотичних та абіотичних стресів для важливих сільськогосподарських видів (Li et al, 2009; Gupta and Banga, 2020; Pushkarova and Yemets, 2022). Так, соматичні гібриди *B. juncea* + *E. sativa* успадкували від *E. sativa* гени стійкості до попелиці та посухи (Sikdar et al, 1990). Соматичні гібриди *B. napus* + *R. sativus* продемонстрували високу стійкість до бурякової цистоутворюючої нематоди (*Heterodera schachtii* Schm.), успадкованої від редьки (Lelivelt et al, 1992). *R. sativus* також використовувався як донор стійкості при створенні ліній *B. oleracea*, стійких до кили (*Plasmodiophora brassicae*) (Hagimori et al, 1992). Соматичні гібриди *Brassica oleracea* та *Armoracia rusticana* також були створені для підвищення стійкості до кили (Navrátilová et al, 1997). Дослідницька група Scholze et al (2010) провела масштабну роботу по соматичній гібридизації *Brassica oleraceae* з низкою диких родичів (табл. 1). Гібриди перевіряли на стійкість проти небезпечних фітопатогенів (*Alternaria brassicicola*, *A. brassicae*, *Phoma lingam*, *Plasmodiophora brassicae* та *Turnip mosaic virus*). Випробування показали, що як симетричні, так і асиметричні, отримані в результаті злиття, генотипи показали резистентність, хоча вона була різною серед клонів. Стійкість до всіх протестованих патогенів у гібридів зустрічалася тим рідше, чим більше патогенів враховували

Міжвидові соматичні гібриди між *Brassica oleracea* var. *botrytis* і *B. nigra* представляють цінні вихідні матеріали для селекції. Рослини, отримані від цих соматичних гібридів в результаті зворотніх схрещувань з капустою, мали 2–8 хромосом, отриманих від *B. nigra*. Ці BCF_3 рослини продемонстрували подібну до цвітної капусти морфологію та високу стійкість до чорної гнилі (Wang et al, 2011).

Соматичні гібриди *B. oleracea* + *S. alba* та їхні нащадки від зворотного схрещування успадкували стійкість до *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. (збудник чорної плямистості, або альтернаріозу) від гірчиці білої (Hansen, Earle, 1997). Подібні гібриди, отримані іншою дослідницькою групою, були стійкі як до *A. brassicae*, так і до *Phoma lingam* (збудник чорної ніжки), але чутливі до *Alternaria brassicicola* (Scholze et al, 2010). Лінії BCF₄, отримані від соматичних гібридів *B. napus* + *S. alba*, показали вищу стійкість до *Sclerotinia sclerotiorum*, ніж стійкий сорт ріпаку «Zhongshuang 9» (Li et al, 2009).

Соматичні гібриди *B. juncea* + *S. alba* були створені для отримання ліній, стійких до чорної плямистості (Gaikwad et al, 1996). Інші соматичні гібриди *B. juncea* + *S. alba* були високостійкими до збудників альтернаріозу (*Alternaria brassicae*) та стеблової гнилі (*Sclerotinia sclerotiorum*) (Kumari and Singh, 2019) або *Alternaria brassicae* та теплового стресу (Kumari et al, 2020a). Популяція рослин другого покоління від зворотного схрещування соматичних гібридів *S. alba* + *B. juncea* з *B. juncea* показала значні фенотипічні варіації у стійкості до альтернаріозу, починаючи від імунних до високочутливих фенотипів, що свідчить про кількісну природу резистентності до цієї хвороби. Вперше було повідомлено про інтрогресію QTL (quantitative trait loci) резистентності до *A. brassicae* у культивованих *Brassica* від спорідненого представника Brassicaceae (Singh et al, 2021).

Camelina sativa і *Capsella bursa-pastoris* також використовували як донорів стійкості до *A. brassicicola* (Sigareva, Earle, 1999a, 1999b). Отримані соматичні гібриди *B. oleracea* + *C. sativa* успадкували стійкість до збудника завдяки здатності продукувати фітоалексин камалексин (Sigareva, Earle, 1999a). Серед гібридів *B. oleracea* + *C. bursa-pastoris* виявлено лінію, стійку до *A. brassicicola* (Sigareva and Earle, 1999b). Для створення ліній гірчиці сарептської, стійких до білої іржі (*Albugo candida*), було отримано соматичні гібриди *B. juncea* + *M. arvensis* (Kirti et al, 1992b). Стійкі до *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (збудника судинного бактеріозу) лінії *B. oleracea* були отримані шляхом соматичної гібридизації з *B. napus* (Hansen and Earle, 1995) та *B. nigra* (Zhang et al, 2008).

Для створення ліній капусти пекінської (*B. rapa* ssp. *chinensis*) та ріпаку (*B. napus*), високостійких до бактеріальної м'якої гнилі (*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*), проведено злиття протопластів стійких ліній *B. oleracea* та *B. rapa* (Ren et al, 2000). У цих експериментах були відібрані лінії синтетичного ріпаку зі стійкістю до *Erwinia*, отриманою одночасно з двох незалежних джерел. Подальше зворотне схрещування цих ліній з *B. rapa* ssp. *chinensis* призвело до отримання високостійких ліній *B. rapa*, придатних для селекційних програм.

З метою перенесення генів, що обумовлюють C₃–C₄ тип фотосинтезу у сільськогосподарські культури, покращення врожайності та вивчення процесів регуляції фотосинтезу, протопласти *B. oleracea* були злиті з протопластами *Moricandia arvensis* (Toriyama et al, 1987; Ishikawa et al, 2003) або *Moricandia nitens* (Yan et al, 1999). Види роду *Moricandia* мають проміжний C₃–C₄ тип фотосинтезу, а *B. oleracea* та *B. napus* мають C₃ тип. Отримані симетричні гібриди *B. oleracea* + *M. arvensis* успадкували C₃–C₄ тип фотосинтезу, як у *M. arvensis*, і були фертильними (Ishikawa et al, 2003). Гібриди *B. oleracea* + *M. nitens* мали проміжний тип фотосинтезу між батьківськими видами (Yan et al, 1999). Також були створені фертильні гібриди *B. napus* + *M. arvensis* C₃–C₄ типу (O'Neil et al, 1996).

Для підвищення придатності ріпакової олії для певних технічних потреб, підвищення посухостійкості та холодостійкості рослин проведено злиття протопластів *B. napus* з *L. fendleri* (Skarzhinskaya et al, 1996). У насінні нащадків соматичних гібридів *B. napus* + *L. fendleri* вміст ерукової кислоти підвищувався до 61 % порівняно з батьківським видом *B. napus* (Schröder-Pontoppidan et al, 1999). Нашадки соматичних гібридів *B. napus* + *C. abyssinica* також мали підвищений вміст ерукової кислоти (Wang et al, 2004). Соматичні гібриди від злиття *B. napus* + *S. alba* продемонстрували відмінності порівняно з батьками за вмістом пальмітинової, олеїнової, лінолевої, ейкозенової та ерукової жирних кислот. Вміст ерукової кислоти серед F₁ нащадків соматичних гібридів коливався від (11,0 до 52,1 %), що перевищувало максимальні та мінімальні значення у обох батьківських видах. Цей факт мож-

на пояснити відмінностями в гені *fae1* (елонгази жирних кислот) і кількості копій цього гена (Wang et al, 2005). Іншим видом, який використовували для покращення технічних властивостей ріпакової олії, був *Th. perfoliatum* (Fahleson et al, 1994). Соматичні гібриди містили до 3,3 % нервонової кислоти проти 1,1 % у ріпаку. Для покращення складу харчової олії використовували *O. violaceus* для соматичної гібридизації з *B. napus*, який мав високий вміст ерукової кислоти (Hu et al, 2002). Ці соматичні гібриди містили 5,9 % пальмітинової кислоти (для порівняння, ріпак – 3,1 %), 19,0 % лінолевої кислоти (ріпак – 13,7 %) та 33,2 % ерукової кислоти (менше, ніж у батьківському сорті ріпаку – 52,7%). Міжтрибні соматичні гібриди між *Brassica napus* і *Camelina sativa* мали насіння з модифікованим профілем жирних кислот і вищим рівнем ліноленової та ейкозаної кислот порівняно з *B. napus* (Jiang et al, 2009)

Колір насіння є селекційною ознакою, яка має вплив на якість олії. Для виробництва харчової олії бажано вирощувати сорти з жовтим насінням (Wang et al, 2018). Злиття протопластів *S. alba* з *B. napus* було використано для інтрогресії генів, що регулюють жовтий колір насіння та стійкість до хвороб, до культивованих сортів *Brassica* (Kumari et al, 2020b).

Соматичні гібриди ряду видів сільськогосподарських рослин (*B. napus*, *B. campestris*, *R. sativus*) з *I. indigotica* були створені для збільшення генетичного різноманіття культивованих видів як потенційних фарбувальних і лікарських рослин (Tu et al, 2008; Du et al, 2009).

Експерименти зі злиття протопластів дикого типу *B. napus*, *B. juncea* або *O. violaceus* з трансгенним *A. thaliana* призвели до отримання таких соматичних гібридів: *B. napus* + *A. thaliana*, *B. juncea* + *A. thaliana*, *O. violaceus* + *A. thaliana*, *O. Violaceus* + (*B. juncea* + *A. thaliana*). *A. thaliana* був попередньо трансформований вектором, що містив систему транспозонів кукурудзи *Spm/dSpm* з геном *bar* у межах неавтономного мобільного генетичного елемента *dSpm*. Отримані гібриди були стійкі до гербіциду BASTA (Ovcharenko et al, 2004; Ovcharenko et al, 2005a; Ovcharenko et al, 2005b). Злиття протопластів між *O. violaceus*, трансформованим згаданою раніше констру-

цією, та *B. napus* дикого типу призвело до отримання стійких до BASTA гібридів *B. napus* + *O. violaceus* (Sakhno et al, 2007).

У більшості випадків соматичної гібридизації присутність обох повних геномів батьків не є бажаною, тому отримані соматичні гібриди піддають зворотному схрещуванню з культивованим батьківським видом, щоб перенести бажані гени стійкості до біотичних та абіотичних стресових факторів на геномний фон *Brassica*. Популяція першого покоління після зворотного схрещування зазвичай має небагато очевидних фенотипових варіацій, тоді як друге покоління від зворотного схрещування демонструє значні варіації агрономічних характеристик, особливо у стійкості до хвороб (Li et al, 2009). Отримані внаслідок зворотного схрещування лінії можуть перевершувати за господарськими характеристиками батьківські види і є цінним селекційним матеріалом (Wang et al, 2013; Singh et al, 2023).

Злиття протопластів для створення алоплазматичних ліній з цитоплазматичною чоловічою стерильністю (ЦЧС)

Раніше було показано, що явище гетерозису значно підвищує врожайність сільськогосподарських культур. Гібридна сила особливо сильно проявляється в овочевих культур роду *Brassica*, і використання ефекту гетерозису є важливою частиною їх покращення. Створення гібридів обмежене відсутністю механізмів контролю процесу запилення. Комерційне виробництво гібридного насіння F_1 в овочевих *Brassica* вимагає ефективних підходів щодо створення ліній з новими типами чоловічої стерильності для контролю запилення насіння. Серед усіх відомих типів стерильності – для овочевих культур *Brassica* найчастіше використовують ЦЧС. Це успадковувана по материнській лінії нездатність рослини виробляти життєздатний пилок. Цей тип чоловічої стерильності зручний завдяки материнській спадковості та високій ефективності. На сьогоднішній день в овочевих *Brassica* найбільш широко використовують *Ogura* тип чоловічої стерильності. Відсутність біорізноманіття несе серйозний ризик епіфітотій у сортів, що містять цей тип ЦЧС. Тому існує великий попит на нові джерела ЦЧС. Перебудови в мітохон-

дріальних геномах є основною причиною ЦЧС у рослин. Вплив мітохондріальних генів на порушення розвитку пиляків при ЦЧС можна нівелювати присутністю ядерних генів, відомих як гени відновлення фертильності (*Rf*). Поєднання мітохондріального геному з генами, що індукують ЦЧС, і ядерного геному, у якому відсутні гени *Rf*, призводить до несумісності між ядерним і мітохондріальним геномом і призводить до фенотипу ЦЧС. У гібридів олійних культур роду *Brassica*, створених на

основі ліній, для яких характерна ЦЧС, наявність генів *Rf* має важливе значення для успішного отримання насіння у F_1 (Singh et al, 2019).

Можливість створення ліній з ЦЧС шляхом поєднання ядра *B. oleracea* з цитоплазмою *B. nigra* та ядра *B. campestris* з цитоплазмою *Diplotaxis muralis* була показана методом статевий гібридизації. Це призвело до створення ряду алоплазматичних ліній у *B. napus* і *B. juncea* (див. огляд Chopra et al, 1996). Проте метод соматичної гібридизації відкрив можливість

Таблиця 4. Нові типи цитоплазматичної чоловічої стерильності, створені шляхом злиття протопластів

Джерело ЦЧС	Походження нового типу ЦЧС і характеристика отриманих ліній	Посилання
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Походить від соматичного гібрида <i>B. napus</i> + <i>Arabidopsis thaliana</i> . Ріст рослин пригнічений. Жіноча фертильність нормальна. Мітохондрії з рекомбінованою ДНК. Хлоропласти від <i>B. napus</i> .	Leino et al, 2003
<i>Brassica tournefortii</i>	Походить від соматичного гібрида <i>B. napus</i> + <i>B. tournefortii</i> .	Liu Clarke et al, 1999
<i>Diplotaxis catholica</i>	Походить від соматичного гібрида <i>D. catholica</i> + <i>B. juncea</i> . Рослини життєздатні, фотосинтез не пригнічений. Пиляки тонкі, не розкриваються. Жіноча фертильність нормальна. Рослини з цим типом ЦЧС мають мітохондрії з рекомбінованою ДНК та пластиди від <i>B. juncea</i>	Chopra et al, 1996
<i>Isatis indigotica</i>	Чоловіча стерильність зумовлена перетворенням тичинок у карпелоїдні структури. Двадцять із 25 мітохондріальних генів походять від вайди (<i>I. indigotica</i>), за винятком <i>cox2-2</i> , який є рекомбінантним між <i>cox2</i> геном з вайди та <i>cox2-2</i> з ріпаку. Лінії з ядерними генами-відновлювачами фертильності вже виявлено, що дозволяє використовувати цей тип ЦЧС для отримання гібридного насіння у ріпаку.	Kang et al, 2017; Li et al, 2019
<i>Moricandia arvensis</i>	Походить від соматичного гібрида <i>M. arvensis</i> + <i>B. juncea</i> . Рослини ростуть повільно, сильно хлоротичні. Пиляки недорозвинені і не розкриваються, нектарники розвинені добре. Жіноча фертильність нормальна. Мітохондрії і хлоропласти походять від <i>M. arvensis</i>	Prakash et al, 1998
<i>Orychophragmus violaceus</i>	Походить від соматичного гібрида <i>B. napus</i> + <i>O. violaceus</i> .	Hu et al, 2002
<i>Raphanus sativus</i>	Походить від соматичного гібрида <i>R. sativus</i> + <i>B. oleracea</i> . Рослини життєздатні. Пиляки недорозвинені. Жіноча фертильність нормальна. Хлоропласти походять від <i>R. sativus</i> .	Kameya et al, 1989
<i>Sinapis alba</i>	Походить від соматичного гібрида <i>R. sativus</i> + <i>B. napus</i> . Рослини життєздатні. Жіноча фертильність нормальна.	Sakai et al, 1996
	Походить від соматичного гібрида <i>S. alba</i> + <i>B. juncea</i> . Рослини життєздатні, зеленого кольору. Квітки мають редуковані пиляки та добре розвинені нектарники. Жіноча фертильність нормальна. Мітохондрії і хлоропласти походять від <i>S. alba</i> .	Chopra et al, 1996
<i>Trachystoma ballii</i>	Походить від соматичного гібрида <i>B. napus</i> + <i>S. alba</i> . Аномальний розвиток пиляків.	Du et al, 2016
	Походить від соматичного гібрида <i>T. ballii</i> + <i>B. juncea</i> . Рослини життєздатні, зеленого кольору. Пиляки петалоїдні. Жіноча фертильність нормальна. Мітохондрії та хлоропласти рекомбінантні.	Kirti et al, 1995

отримати низку нових ліній з ЦЧС (табл. 4). Статеві гібриди обмежені ядерно-пластомною та ядерно-хондріомною несумісністю, що перешкоджає їх використанню при створенні нових систем ЦЧС. Метод соматичної гібридизації дозволяє об'єднати статево несумісні геноми таксономічно віддалених видів. Основною вимогою для успішної соматичної гібридизації є висока регенеративна здатність принаймні одного з батьківських видів.

Щоб створити лінії, придатні для селекційних програм, ядра *B. napus* або *B. juncea* були об'єднані з цитоплазмою ряду віддалених видів шляхом злиття протопластів (табл. 4). У деяких випадках нові типи ЦЧС, отримані в результаті соматичної гібридизації на основі одного з видів *Brassica*, можуть бути перенесені в інший традиційними методами селекції (див. огляд Singh et al, 2019). Створено лінії з ЦЧС, що містять нові комбінації генів ядра, мітохондрій і пластид. Іноді ядерно-цитоплазматична несумісність зустрічається і у соматичних гібридів. Це може призводити до хлорозу листя, як у *B. juncea*, що несе цитоплазму *M. arvensis* (табл. 4). У деяких випадках, лінії з ЦЧС мають знижену життєздатність через несумісність між пластидами та ядром. Соматична гібридизація шляхом злиття протопластів може подолати цю ядерно-цитоплазматичну несумісність, пов'язану з функціонуванням пластид у лініях з різними типами ЦЧС. Так, заміна пластид *R. sativus* на пластиди *B. napus* в ріпаку з *ogi* типом ЦЧС (Jarl, Bornman, 1988), пластид *M. arvensis* на пластиди *B. juncea* в лініях *B. juncea* з *mori* типом ЦЧС (Kirti et al, 1998) або рекомбінація пластид *B. juncea*–*B. oxyrrhina* в лініях гірчиці сарептської *oxy* типом ЦЧС (Kirti et al, 1993) підвищила життєздатність рослин.

Нове джерело ЦЧС у *Brassica napus (inap)* було створено на основі соматичного гібрида ріпаку з вайдою індигоносною (*Isatis indigotica*) шляхом повторного зворотного схрещування з *Brassica napus*. Фемінізований розвиток тичинок призвів до повної відсутності пилоквих зерен, яка була стабільною в різні роки та не залежала від умов середовища (Kang et al, 2017).

На основі соматичних гібридів *Brassica napus* і *S. alba* було започатковано новий тип ЦЧС та створено лінії для відновлення фер-

тильності. Отримані рослини з новим типом ЦЧС є також цінними донорами генів стійкості до хвороб (Du et al, 2016). Транскриптомне секвенування квіткових бруньок стерильних і фертильних рослин було проведено для з'ясування експресії та регуляції генів, спричинених наявністю чужорідної хромосоми *S. alba* та її цитоплазматичними органелами. Транскриптомний аналіз отриманих в результаті соматичної гібридизації ліній (з ЦЧС і лінії для відновлення фертильності) виявив ряд генів – потенційних кандидатів для створення на інших генотипах нових джерел чоловічої стерильності за допомогою методу редагування геному CRISPR/CAS9 (Du et al, 2016). Було показано, що головними причинами припинення розвитку пиляків при ЦЧС *SaNa-1A* типу були деградація тапетума та аномальний розвиток пиляків (Du et al, 2019).

Тому, хоча деякі алоплазматичні лінії мають підвищену чутливість до грибних захворювань і деякі аномалії будови квітки, збільшення різноманіття мітохондріальних генів є важливим для створення нових ліній, які характеризуються ЦЧС. Форми та сорти, створені шляхом злиття протопластів у родині Brassicaceae, вже використовують в сільськогосподарській практиці для виробництва гібридного насіння (Pelletier and Budar, 2015)

Ресинтез-алотетраплоїдних видів

B. juncea, *B. napus* і *B. carinata* є алотетраплоїдними видами природного походження з досить малим генетичним різноманіттям через обмежену кількість вихідних батьківських схрещувань. *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. campestris* як вихідні диплоїдні види мають більшу мінливість і можуть бути використані як донори цінних генів. Ресинтез *de novo* шляхом злиття протопластів може розширити генетичну пластичність культивованих алотетраплоїдних видів Brassicaceae. Такі алотетраплоїдні види, як *B. napus (B. rapa + B. oleracea)* (Sundberg and Glime-lius, 1986; Hansen and Earle, 1994; Ozminowski and Jourdan, 1994; Heath and Earle, 1996; Ren et al, 2000) та *B. carinata (B. oleracea + B. nigra)* (Narasimhulu et al, 1992; Jordan and Salazar, 1993) вже були повторно отримані шляхом злиття протопластів.

Раніше площа вирощування ріпаку була обмежена регіонами з довгою тривалістю дня та помірним кліматом (Chopra et al, 1996). Ретельний відбір донорів геному *B. oleracea* та *B. rapa* (*B. campestris*) дав змогу підвищити екологічну пластичність ресинтезованих форм *B. napus* та розширити потенційні площі вирощування ріпаку. Нові лінії зі зміненим складом жирних кислот були отримані шляхом злиття протопластів диплоїдних *Brassica* (Hansen and Earle, 1994).

Рослини ріпаку, ресинтезовані шляхом злиття протопластів і шляхом статевої гібридизації (з природним дозріванням насіння або з використанням техніки порятунку ембріонів) порівнювали в роботі Heath and Earle (1996). Авторами було досліджено морфологію рослин, фертильність та успадкування хлоропластів у гібридів. Лише спонтанні статеві гібриди мали листки, подібні до більшості існуючих різновидів *B. napus*, тоді як соматичні гібриди та статеві, які потребували порятунку ембріонів, мали подібні листки. Їх листки відрізнялися від природних форм ріпаку та мали проміжну морфологію між капустою та суріпицею. Деякі соматичні гібриди ріпаку мали більше число хромосом, ніж звичайні амфідиплоїди, що може бути пов'язано з злиттям трьох або більше батьківських протопластів. Такі рослини були абсолютно стерильними. Однак деякі соматичні гібриди зазнавали спонтанної втрати надлишкових геномів, що призводило до відновлення фертильності. Плодючість статевих гібридів у F_1 була задовільною, а в наступних поколіннях вона зростала (Heath and Earle, 1996). Збільшення кількості хромосом у ліній, отриманих шляхом злиття протопластів ріпаку також спостерігали Sundberg et al (1987). Статеві гібриди ріпаку зберігали ДНК хлоропластів капусти, тоді як соматичні гібриди переважно успадковували хлоропласти *B. rapa* ssp. *chinensis* (Heath and Earle, 1996). Хлоропласти *B. rapa* також були ідентифіковані в соматичних гібридах ріпаку, ресинтезованих Hansen & Earle (1994). Тому, хоча ресинтезовані форми дають, як правило, обмежену кількість насіння, порівняно з комерційними сортами, ці гібриди несуть нові комбінації господарсько цінних генів. Надалі фертильність таких форм можна підвищити традиційними методами селекції.

Соматичні гібриди для фітореMediaції ґрунтів, забруднених важкими металами

Сьогодні проблема забруднення ґрунтів важкими металами є дуже актуальною (Hu et al, 2019). ФітореMediaція – один із шляхів вирішення цієї проблеми. Серед культивованих видів *B. juncea* є добре відомим акумулятором свинцю. Ряд диких видів родини *Brassicaceae* (серед них *Thlaspi caerulescens*) є гіперакумуляторами цинку, нікелю та кадмію (Brewer et al, 1999; Gleba et al, 1999). На жаль, більшість із цих видів мають низьку біомасу, що перешкоджає їх ефективному використанню. Для вирішення цієї проблеми були створені соматичні гібриди *B. juncea* + *Th. caerulescens*. Гібриди поєднували високу біомасу з толерантністю до підвищених концентрацій солей Pb, Zn, Ni та здатністю до їх фітоекстракції (Gleba et al, 1999; Dushenkov et al, 2002). Отримано також гібриди *B. napus* + *Th. caerulescens* з підвищеною стійкістю до забруднення цинком (Brewer et al, 1999).

Отримання транспластомних рослин шляхом злиття протопластів

Отримання транспластомних рослин культивованих видів *Brassicaceae* можливе шляхом прямої трансформації пластид (How et al, 2003; Skarjinskaia et al, 2003; Liu et al, 2007; Schneider et al, 2015; Yu et al, 2017) або, альтернативно, шляхом «човникової» системи, коли вже трансформовані в іншому виді пластиди переносять до потрібного виду шляхом злиття протопластів (Kuchuk, 2007, 2017).

Пластиди *Lesquirella fendleri* були раніше трансформовані Skarjinskaia et al (2003) конструкцією зі злитим геном *aadA16gfp*, тому можливість їх перенесення в культивовані види становила значний інтерес. Для перенесення трансформованих пластид від *L. fendleri* до культивованих видів триби *Brassicae* проводили злиття у таких комбінаціях: *B. napus* + *L. fendleri* (Nitovska et al, 2006; Vasylenko et al, 2006), *B. juncea* + *L. fendleri*, *O. violaceus* + *L. fendleri* (Vasylenko et al, 2006; Ovcharenko et al, 2011). Для руйнування ядерного геному перед виділенням протопластів калюси *L. fendleri* опромінювали γ -променями в дозі 500 Гр. В досліджах з соматичної гібридизації між ріпаком

та транспластомною *L. fendleri* регенерацію рослини з чужорідними трансформованими пластидами було отримано з єдиного гібридного калюсу після тривалого періоду культивування (Nitovska et al, 2006). Однак, отримана рослина мала анатомічні відхилення, які знижували її життєздатність *ex vitro* (Nuzhyna et al, 2016).

Лінії *B. napus*, *B. juncea* та *O. violaceus* (дикого типу або хлорофілдефектні) використовували в експериментах зі злиття протопластів з транспластомною *L. fendleri* (Vasylenko et al, 2006; Ovcharenko et al, 2011). Соматичні гібриди регенерували лише в досліді, де використовували хлорофілдефектні рослини-реципієнти. Якщо для злиття використовували протопласти, виділені з рослин-реципієнтів дикого типу, регенерації гібридних рослин не відбувалося. В експериментах зі злиття протопластів *B. napus* або *B. juncea* дикого типу з *L. fendleri* були отримані лише калюси, нездатні до регенерації на середовищах з різними комбінаціями регуляторів росту рослин і цукрів (неопубліковані дані). Злиття протопластів хлорофілдефектного *O. violaceus* з протопластами *L. fendleri* призводило до регенерації рослини через 8–9 тижнів. Візуалізація GFP за допомогою SDS-PAGE підтвердила експресію злитого гена *aadA16gfp* у трансформованих пластидах *L. fendleri*, перенесених до *O. violaceus* (Ovcharenko et al, 2011). Таким чином, було показано, що трансгени в гетерологічних пластидах здатні до нормальної експресії в цибридах *B. napus*, *B. juncea* та *O. violaceus* родини Brassicaceae (Kuchuk, 2017).

Висновки

Злиття протопластів між видами Brassicaceae призвело до створення культивованих форм з новими, не відомими в природі комбінаціями генетичного матеріалу. Перенесення відносно великої кількості генетичного матеріалу шляхом злиття протопластів має свої переваги і недоліки. Хоча кількість робіт по злиттю протопластів зменшилася останнім часом, отримані соматичні гібриди мають не лише теоретичне, а і прикладне значення. Родина Brassicaceae є однією з небагатьох, де форми та сорти, створені шляхом соматичної гібридизації, вже увійшли в сільськогосподарську

практику. Таким чином, злиття протопластів, як один із методів клітинної інженерії, відкрило нові перспективи для вдосконалення культивованих видів родини Brassicaceae.

Конфлікт інтересів. У цій роботі немає конфлікту інтересів авторів.

Фінансування. Робота виконана за фінансової підтримки НАН України: проект № 0123U101081 «Синтез рекомбінантних фармацевтичних білків та підвищення вмісту біологічно активних природних сполук у рослинах» та проект № 0122U002115 «Механізми адаптації до стресу та створення стійких ліній рослин методами генетичної інженерії».

PROTOPLAST FUSION FOR CELLULAR ENGINEERING OF THE BRASSICACEAE

O.O. Ovcharenko*, V.A. Rudas, M.V. Kuchuk

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 148, Zabolotnogo str., Kyiv, 03143, Ukraine

E-mail: ovcharenkooo77@gmail.com

The members of the Brassicaceae family are important oilseed, vegetable and forage crops. The Brassicaceae species are also used for phytoremediation of heavy metal polluted soils, or as siderates and ornamental plants. The widening of biodiversity of already existing Brassicaceae cultivars by genetic engineering manipulations can increase tolerance to biotic and abiotic stresses, increase plant productivity and production quality. Protoplast fusion method makes possible artificial synthesis of various somatic hybrids between different plant species. The review presents advances in protoplast fusion of *Brassica* crops and their wild relatives; main directions of somatic hybridisation in Brassicaceae; the conditions for obtaining and selection of the somatic hybrids; the peculiarities of genetic material inheritance, introgression of economically important traits by somatic hybridization to cultivated Brassicaceae, resynthesis of allotetraploid species; production of cytoplasmic male sterility (CMS) alloplasmic lines, creation of somatic hybrids for phytoremediation of contaminated with heavy metals soils, and production of transplastomic plants by transfer of genetically modified plastids through protoplast fusion.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Arumugam N, Mukhopadhyay A, Gupta V et al (1996) Synthesis of hexaploid (AABBCC) somatic hybrids: a bridging material for transfer of 'tour' cytoplasmic male sterility to different *Brassica* species. Theor

- Appl Genet 92:762–768. <https://doi.org/10.1007/BF00226099>
- Arumugam N, Mukhopadhyay A, Gupta V et al (2002) Synthesis of somatic hybrids (RCBB) by fusing heat-tolerant *Raphanus sativus* (RR) and *Brassica oleracea* (CC) with *Brassica nigra* (BB). Plant Breeding 121 (2):168–170. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2002.00681.x>
- Babiychuk E, Kushnir S, Gleba YY (1992) Spontaneous extensive chromosome elimination in somatic hybrids between somatically congruent species *Nicotiana tabacum* L. and *Atropa belladonna* L. Theor Appl Genet 84:87–91. <https://doi.org/10.1007/BF00223985>
- Baldev A, Gaikwad K, Kirti P et al (1998) Recombination between chloroplast genomes of *Trachystoma ballii* and *Brassica juncea* following protoplast fusion. Mol Gen Genet 260:357–361. <https://doi.org/10.1007/s004380050904>
- Bauer-Weston B, Keller W, Webb J et al (1993) Production and characterization of asymmetric somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. Theor Appl Genet 86:150–158. <https://doi.org/10.1007/BF00222073>
- Begum F, Paul S, Bag N et al (1995) Somatic hybrids between *Brassica juncea* (L.) Czern. and *Diplotaxis harra* (Forsk.) Boiss and the generation of backcross progenies. Theor Appl Genet 91:1167–1172. <https://doi.org/10.1007/BF00223936>
- Bohman S, Wang M, Dixelius C (2002) *Arabidopsis thaliana*-derived resistance against *Leptosphaeria maculans* in a *Brassica napus* genomic background. Theor Appl Genet 105:498–504. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0885-5>
- Brewer E, Saunders J, Angle J et al (1999) Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. Theor Appl Genet 99:761–771. <https://doi.org/10.1007/s001220051295>
- Chatterjee G, Sikdar SR, Das S et al (1988) Intergeneric somatic hybrid production through protoplast fusion between *Brassica juncea* and *Diplotaxis muralis*. Theor Appl Genet 76:915–922. <https://doi.org/10.1007/BF00273681>
- Chevre AM, This P, Eber F et al (1991) Characterization of disomic addition lines *Brassica napus*-*Brassica nigra* by isozyme, fatty acid, and RFLP markers. Theor Appl Genet 81:43–49. <https://doi.org/10.1007/BF00226110>
- Chopra VL, Kirti PB, Prakash S (1996) Accessing and exploiting genes of breeding value of distant relatives of crop *Brassicaceae*. Genetica 97:305–312. <https://doi.org/10.1007/BF00055316>
- Choudhary B, Joshi P, Singh K (2000) Synthesis, morphology and cytogenetics of *Raphanofortii* (TTRR, 2n = 38): a new amphidiploid of hybrid *Brassica tournefortii* (TT, 2n = 20) × *Raphanus caudatus* (RR, 2n=18). Theor Appl Genet 101:990–999. <https://doi.org/10.1007/s001220051572>
- Chrungu B, Verma N, Mohanty A et al (1999) Production and characterization of interspecific hybrids between *Brassica maurorum* and crop brassicas. Theor Appl Genet 98:608–613. <https://doi.org/10.1007/s001220051111>
- Du K, Liu Q, Wu X et al (2016) Morphological structure and transcriptome comparison of the cytoplasmic male sterility line in *Brassica napus* (SaNa-1A) derived from somatic hybridization and its maintainer line SaNa-1B. Front Plant Sci 7:1313. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01313>
- Du K, Xiao Y, Liu Q et al (2019) Abnormal tapetum development and energy metabolism associated with sterility in SaNa-1A CMS of *Brassica napus* L. Plant Cell Rep 38:545–558. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02385-2>
- Du Xz, Ge Xh, Yao Xc et al (2009) Production and cytogenetic characterization of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Isatis indigotica* and backcross progenies. Pl Cell Rep 28:1105–1113. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0712-4>
- Dushenkov S, Skarzhinskaya M, Glimelius K et al (2002) Bioengineering of a phytoremediation plant by means of somatic hybridization. Int J Phytoremediation 4(2):117–126. <https://doi.org/10.1080/15226510208500077>
- Fahleson J, Eriksson I, Glimelius K (1994) Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Barbarea vulgaris* – production of *in vitro* plantlets. Pl Cell Rep 13:411–416. <https://doi.org/10.1007/BF00234149>
- Fahleson J, Eriksson I, Landgren M et al (1994) Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Thlaspi perfoliatum* with high content of the *T. perfoliatum*-specific nervonic acid. Theor Appl Genet 87:795–804. <https://doi.org/10.1007/BF00221131>
- Forsberg J, Dixelius C, Lagercrantz U, Glimelius K (1998a) UV dose-dependent DNA elimination in asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 131:65–76. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(97\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00242-2)
- Forsberg J, Lagercrantz U, Glimelius K (1998b) Comparison of UV light, X-ray and restriction enzyme treatment as tools in production of asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. Theor Appl Genet 96:1178–1185. <https://doi.org/10.1007/s001220050854>
- Forsberg J, Landgren M, Glimelius K (1994) Fertile somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* Plant Sci 95(2):213–223. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)90095-7)
- Gaikwad K, Kirti PB, Sharma A, Prakash S, Chopra VL

- (1996) Cytogenetical and molecular investigations on somatic hybrids of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* and their backcross progeny. *Plant Breed* 115(6):480–483. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00961.x>
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG et al (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:5973–5977. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.5973>
- Gleba YY, Hoffmann F (1978) Hybrid cell lines *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*: No evidence for specific chromosome elimination. *Mol Gen Genet* 165:257–264. <https://doi.org/10.1007/BF00332524>
- Gleba YY, Hoffmann F (1980) «Arabidobrassica»: A novel plant obtained by protoplast fusion. *Planta* 149:112–117. <https://doi.org/10.1007/BF00380870>
- Gupta M, Banga SS (2020). Exploiting alien genetic variation for germplasm enhancement in Brassica oilseeds. In *Quantitative genetics, genomics and plant breeding* (pp. 338–384). Wallingford UK: CABI. <https://doi.org/10.1079/9781789240214.0338>
- Hagimori M, Nagaoka M, Kato N et al (1992) Production and characterization of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower. *Theor Appl Genet* 84:819–824. <https://doi.org/10.1007/BF00227390>
- Hansen L, Earle E (1997) Somatic hybrids between *Brassica oleracea* L. and *Sinapis alba* L. with resistance to *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. *Theor Appl Genet* 94:1078–1085. <https://doi.org/10.1007/s001220050518>
- Hansen LN (1998) Intertribal somatic hybridization between rapid cycling *Brassica oleracea* L. and *Camelina sativa* (L.) Crantz. *Euphytica* 104:173–179. <https://doi.org/10.1023/A:1018604919488>
- Hansen LN, Earle ED (1994) Novel flowering and fatty acid characters in rapid cycling *Brassica napus* L. resynthesized by protoplast fusion. *Pl Cell Rep* 14:151–156. <https://doi.org/10.1007/BF00233780>
- Hansen LN, Earle ED (1995) Transfer of resistance to *Xanthomonas campestris* pv *campestris* into *Brassica oleracea* L. by protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 91:1293–1300. <https://doi.org/10.1007/BF00220944>
- Heath DW, Earle ED (1996) Resynthesis of rapeseed (*Brassica napus* L.): a comparison of sexual versus somatic hybridization. *Plant Breed* 115:395–401. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1996.tb00940.x>
- Hou BK, Zhou YH, Wan LH et al (2003) Chloroplast Transformation in Oilseed Rape. *Transgenic Res* 12:111–114. <https://doi.org/10.1023/A:1022180315462>
- Hu Q, Andersen S, Dixelius C et al (2002) Production of fertile intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis arvensis* for the enrichment of the rapeseed gene pool. *Pl Cell Rep* 21:147–152. <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0491-7>
- Hu Q, Hansen L, Laursen J et al (2002) Intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* containing traits of agronomic importance for oilseed rape breeding. *Theor Appl Genet* 105:834–840. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1017-y>
- Hu Z, Li J, Wang H, Ye Z et al (2019) Soil contamination with heavy metals and its impact on food security in China. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 7:168–183. <https://doi.org/10.4236/gep.2019.75015>
- Inomata N (1993) Crossability and cytology of hybrid progenies in the cross between *Brassica campestris* and three wild relatives of *B. oleracea*, *B. bourgeauii*, *B. cretica* and *B. montana*. *Euphytica* 69:7–17. <https://doi.org/10.1007/BF00021721>
- Inomata N (1994) Intergeneric hybridization between *Brassica napus* and *Sinapis pubescens*, and the cytology and crossability of their progenies. *Theor Appl Genet* 89:540–544. <https://doi.org/10.1007/BF00222445>
- Ishikawa S, Bang SW, Kaneko Y, Matsuzawa Y (2003) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 122 (3):233–238. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00813.x>
- Jabeen N (2020). Agricultural, Economic and Societal Importance of Brassicaceae Plants. In: Hasanuzzaman, M. (eds) *The Plant Family Brassicaceae*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6345-4_2
- Jarl C, Bornman C (1988) Correction of chlorophyll-defective, male-sterile winter oilseed rape (*Brassica napus*) through organelle exchange: phenotypic evaluation of progeny. *Hereditas* 108:97–102. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1988.tb00687.x>
- Jiang JJ, Zhao XX, Tian W et al (2009). Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Camelina sativa* with high linolenic acid content. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 99:91–95. <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9579-x>
- Jiang SH, Guan RZ, Tang SY et al (2007) Somatic hybrids between *Rorippa indica* (Linn.) Hiern and *Brassica napus* L. through protoplast-fusion system. *Yi Chuan* 29(6):745–750. <https://doi.org/10.1360/yc-007-0745>
- Jourdan P, Salazar E (1993) *Brassica carinata* resynthesized by protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 86:567–572. <https://doi.org/10.1007/BF00838710>
- Kameya T, Kanzaki H, Toli S, Abe T (1989) Transfer of radish (*Raphanus sativus* L.) chloroplasts into cabbage (*B. oleracea* L.) by protoplast fusion. *Jpn J Genet* 64:27–34. <https://doi.org/10.1266/jjg.64.27>

- Kaneko Y, Bang SW (2014) Interspecific and intergeneric hybridization and chromosomal engineering of Brassicaceae crops. *Breed Sci* 64(1):14–22. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.14>
- Kang L, Li, P., Wang A, Ge X, Li Z (2017) A novel cytoplasmic male sterility in *Brassica napus* (inap CMS) with carpelloid stamens via protoplast fusion with chinese woad. *Front Pl Sci*, 8:529. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00529>
- Kanno A, Kanzaki H, Kameya T (1997) Detailed analyses of chloroplast and mitochondrial DNAs from the hybrid plant generated by asymmetric protoplast fusion between radish and cabbage. *Pl Cell Rep* 16(7):479–484. <https://doi.org/10.1007/BF01092770>
- Kirti P, Narasimhulu S, Mohapatra T et al (1993). Correction of chlorophyll deficiency in alloplasmic male sterile *Brassica juncea* through recombination between chloroplast genomes. *Genet Res* 62(1):11–14. doi:10.1017/S0016672300031505
- Kirti P, Prakash S, Gaikwad K et al (1998) Chloroplast substitution overcomes leaf chlorosis in a *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterile *Brassica juncea*. *Theor Appl Genet* 97:1179–1182. <https://doi.org/10.1007/s001220051007>
- Kirti PB, Mohapatra T, Baldev A et al (1995) A stable cytoplasmic male-sterile line of *Brassica juncea* carrying restructured organelle genomes from the somatic hybrid *Trachystoma ballii* + *B. juncea*. *Plant Breed* 114(5):434–438. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00826.x>
- Kirti PB, Mohapatra T, Khanna H et al (1995) *Diplo-taxis catholica* + *Brassica juncea* somatic hybrids: molecular and cytogenetic characterization. *Pl Cell Rep* 14:593–597. <https://doi.org/10.1007/BF00231945>
- Kirti PB, Narasimhulu SB, Prakash S et al (1992a) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids of *Trachystoma ballii* and *Brassica juncea*. *Pl Cell Rep* 11:90–92. <https://doi.org/10.1007/BF00235260>
- Kirti PB, Narasimhulu SB, Prakash S et al (1992b) Somatic hybridization between *Brassica juncea* and *Moricandia arvensis* by protoplast fusion. *Plant Cell Rep* 11: 318–321. <https://doi.org/10.1007/BF00235090>
- Kirti PB, Prakash S, Chopra VL (1991) Interspecific hybridization between *Brassica juncea* and *B. spinescens* through protoplast fusion. *Pl Cell Rep* 9:639–642. <https://doi.org/10.1007/BF00231806>
- Klimaszewska K, Keller WA (1988) Regeneration and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Diplo-taxis harra*. *Plant Sci* 58(2):211–222. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90011-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90011-8)
- Komarnitsky IK, Gleba Y (1981) Fraction I protein analysis of parasexual hybrid plants *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris*. *Pl Cell Rep* 1:67–68. <https://doi.org/10.1007/BF00269275>
- Kuchuk NV (2017). Cell genetic engineering: Transmission genetics of plants. *Cytol Genet* 51(2):103–107. <https://doi.org/10.3103/S0095452717020062>
- Kuchuk NV (2007) Transgenic, transplastomic, and transient approaches to alien gene expression in plants. *Cytol Genet* 41:172–175. <https://doi.org/10.3103/S0095452707030061>
- Kumari P, Bisht DS, Bhat SR (2018) Stable, fertile somatic hybrids between *Sinapis alba* and *Brassica juncea* show resistance to *Alternaria brassicae* and heat stress. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 133:77–86. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1362-9>
- Kumari P, Singh KP (2019). Characterization of stable somatic hybrids of *Sinapis alba* and *Brassica juncea* for *Alternaria blight*, *Sclerotinia sclerotium* resistance and heat tolerance. *Indian Res J Extension Education* 19(2):99–103.
- Kumari P, Singh KP, Bisht D, Kumar S (2020a). Somatic hybrids of *Sinapis alba*+*Brassica juncea*: study of backcross progenies for morphological variations, chromosome constitution and reaction to *Alternaria brassicae*. *Euphytica* 216:1–14. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02629-3>
- Kumari P, Singh KP, Kumar S, Yadava DK (2020b). Development of a yellow-seeded stable allohexaploid brassica through inter-generic somatic hybridization with a high degree of fertility and resistance to *Sclerotinia sclerotium*. *Front Pl Sci* 11:575591. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575591>
- Leino M, Teixeira R, Landgren M et al (2003) *Brassica napus* lines with rearranged *Arabidopsis* mitochondria display CMS and a range of developmental aberrations. *Theor Appl Genet* 106:1156–1163. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1167-y>
- Lelivelt CLC, Krens FA (1992) Transfer of resistance to the beet cyst nematode (*Heterodera schachtii* Schm.) into the *Brassica napus* L. gene pool through intergeneric somatic hybridization with *Raphanus sativus* L. *Theor Appl Genet* 83:887–894. <https://doi.org/10.1007/BF00226712>
- Li A, Wei C, Jiang J et al (2009) Phenotypic variation in progenies from somatic hybrids between *Brassica napus* and *Sinapis alba*. *Euphytica* 170:289–296. <https://doi.org/10.1007/s10681-009-9979-3>
- Li P, Kang L, Wang A et al (2019) Development of a fertility restorer for inap CMS (*Isatis indigotica*) *Brassica napus* through genetic introgression of one alien addition. *Frontiers in plant science* 10:257. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00257>
- Lian YJ, Zhao XM, Lin GZ et al (2012) Protoplast isolation and culture for somatic hybridisation of rapid cycling *Brassica rapa* with ‘Anand’ CMS and *Brassica juncea* *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:565–572. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0114-0>
- Liu Clarke JH, Chuvre AM, Landgren M et al (1999)

- Characterization of sexual progenies of male-sterile somatic cybrids between *Brassica napus* and *Brassica tournefortii*. *Theor Appl Genet* 99:605–610. <https://doi.org/10.1007/s001220051275>
- Liu CW, Lin CC, Chen JJW et al (2007) Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment. *Pl Cell Rep* 26:1733–1744. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0374-z>
- Mukhopadhyay A, Arumugam N, Pradhan AK et al (1994) Somatic hybrids with substitution type genomic configuration TCBB for the transfer of nuclear and organelle genes from *Brassica tournefortii* TT to allotetraploid oilseed crop *B. carinata* BBCC. *Theor Appl Genet* 89:19–25. <https://doi.org/10.1007/BF00226977>
- Narasimhulu SB, Kirti PB, Bhatt SR et al (1994) Intergeneric protoplast fusion between *Brassica carinata* and *Camelina sativa*. *Pl Cell Rep* 13:657–660. <https://doi.org/10.1007/BF00232940>
- Narasimhulu SB, Kirti PB, Prakash S et al (1992) Resynthesis of *Brassica carinata* by protoplast fusion and recovery of a novel cytoplasmic hybrid. *Pl Cell Rep* 11:428–432. <https://doi.org/10.1007/BF00234376>
- Navrátilová B (2004). Protoplast cultures and protoplast fusion focused on Brassicaceae: A review. *Horticul Sci* 31(4):140–157.
- Navrátilová B, Bůžek J, Široký J et al (1997) Construction of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Armoracia rusticana*. *Biol Plant* 39:531–541.
- Nitovska IA, Shakhovskiy AM, Cherep NN et al (2006) Construction of the cybrid transplastomic *Brassica napus* plants containing *Lesquerella fendleri* chloroplasts. *Cytol Genet* 40(4):3–11
- Nitovskaya IA, Shakhovskii AM (1998) Original Studies-Development of asymmetric somatic hybrids between *Brassica oleracea* L and *Arabidopsis thaliana* L. *Cytol Genet* 32(4):61–68.
- Nuzhyna NV, Nitovska IO, Golubenko AV et al. (2016) Anatomical abnormalities of the intertribal cybrid between *Brassica napus* and *Lesquerella fendleri* chloroplasts. *Cytol Genet* 50:285–292. <https://doi.org/10.3103/S0095452716050078>
- Ohta Y, Hirata Y, Motegi T et al (2006). Analysis of chloroplast genome of two cytoplasmic male sterile lines derived from interspecific chimera and intergeneric somatic hybrid in Brassicaceae. *Breed Sci* 56(1):1–5. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.56.1>
- O'Neill CM, Murata T, Morgan CL et al (1996) Expression of the C₃–C₄ intermediate character in somatic hybrids between *Brassica napus* and the C₃–C₄ species *Moricandia arvensis*. *Theor Appl Genet* 93:1234–1241. <https://doi.org/10.1007/BF00223455>
- Ovcharenko O, Komarnytskyy IK, Cherep N et al (2005a) Intertribal somatic hybrids of di- and tetragenome origin: Production and usage. *Biopolym Cell* 21(1):35–41.
- Ovcharenko O, Momot V, Cherep N et al (2011) Transfer of transformed *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats. chloroplasts into *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E. Schulz by protoplast fusion. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 105:21–27. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9833-2>
- Ovcharenko OO, Komarnyts'kyi IK, Cherep MN et al (2005b) Creation and Analysis of *Brassica napus* + *Arabidopsis thaliana* Somatic Hybrids Possessing Maize *Spm/Dspm* Heterologous Transposable System. *Cytol Genet* 39(3):50–56.
- Ovcharenko OO, Komarnyts'kyi IK, Cherep MM et al (2004) Obtaining of intertribal *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana* somatic hybrids and study of transgenic trait behaviour. *Cytol Genet* 38(3):3–8.
- Ozminkowski RH, Jourdan P (1994) Comparing the resynthesis of *Brassica napus* L. by interspecific somatic and sexual hybridization. 1. Producing and identifying hybrids. *J Amer Soc Horticult Sci* 119(4):808–815. <https://doi.org/10.21273/JASHS.119.4.808>
- Pelletier G, Budar F (2015). *Brassica* Ogu-INRA cytoplasmic male sterility: an example of successful plant somatic fusion for hybrid seed production. In: Li, XQ., Donnelly, D., Jensen, T. (eds) *Somatic Genome Manipulation*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2389-2_9
- Prakash S, Kirti P, Bhat S et al (1998) A *Moricandia arvensis*-based cytoplasmic male sterility and fertility restoration system in *Brassica juncea*. *Theor Appl Genet* 97:488–492. <https://doi.org/10.1007/s001220050921>
- Pushkarova N, Yemets A (2022) Biotechnological approach for improvement of *Crambe* species as valuable oilseed plants for industrial purposes. *RSC Advances*. 12(12):7168–7178. <https://doi.org/10.1039/d2ra00422d>
- Rao GU, Lakshmikumaran M, Shivanna KR (1996) Production of hybrids, amphiploids and backcross progenies between a cold-tolerant wild species, *Erucastrum abyssinicum* and crop brassicas. *Theor Appl Genet* 92:786–790. <https://doi.org/10.1007/BF00226103>
- Ren J, Dickson M, Earle E (2000) Improved resistance to bacterial soft rot by protoplast fusion between *Brassica rapa* and *B. oleracea*. *Pl Cell Rep* 100:810–819. <https://doi.org/10.1007/s001220051356>
- Rieger M, Potter T, Preston C et al (2001) Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor Appl*

- Genet 103:555–560. <https://doi.org/10.1007/PL00002909>
- Sahno LA, Cherep NN, Skarzhynskaya MV, Gleba Y (1991) Somatic hybridization in genus *Brassica*: hybrids between rapeseed (*Brassica napus* L.) and black mustard (*Brassica nigra* L.) *Biopolymers and Cell* 7(5):62–65.
- Sakai T, Imamura J (1994) Somatic Hybridization Between Radish (*Raphanus sativus*) and Rapeseed (*Brassica napus*). In: Bajaj, Y.P.S. (eds) *Somatic Hybridization in Crop Improvement I. Biotechnology in Agriculture and Forestry* 27. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-57945-5_21
- Sakai T, Liu HJ, Iwabuchi M et al (1996) Introduction of a gene from fertility restored radish (*Raphanus sativus*) into *Brassica napus* by fusion of X-irradiated protoplasts from a radish restorer line and iodacetamide-treated protoplasts from a cytoplasmic male-sterile cybrid of *B. napus*. *Theor Appl Genet* 93:373–379. <https://doi.org/10.1007/BF00223179>
- Sakhno LO, Komarnits'kii IK, Cherep MN et al (2007) Phosphinothricin-resistant *Brassica napus* + *Orychophragmus violaceus* somatic hybrids. *Cytol Genet* 41:1–5. <https://doi.org/10.3103/S009545270701001X>
- Sang SF, Mei DS, Liu J et al (2019) Organelle genome composition and candidate gene identification for *Nsa* cytoplasmic male sterility in *Brassica napus*. *BMC Genomics* 20:813. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6187-y>
- Schneider A, Stelljes C, Adams C et al (2015) Low frequency paternal transmission of plastid genes in *Brassicaceae*. *Transgenic Res* 24:267–277. <https://doi.org/10.1007/s11248-014-9842-8>
- Scholze P, Krdmer R, Ryschka U et al (2010). Somatic hybrids of vegetable brassicas as source for new resistances to fungal and virus diseases. *Euphytica* 176 (1):1–14. <https://doi.org/10.1007/S10681-010-0205-0>
- Schröder-Pontoppidan M, Skarzhinskaya M, Dixelius C et al (1999) Very long chain and hydroxylated fatty acids in offspring of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Lesquerella fendleri*. *Theor Appl Genet* 99:108–114. <https://doi.org/10.1007/s001220051214>
- Sheng X, Liu F, Zhu Y et al (2008) Production and analysis of intergeneric somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *Matthiola incana*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 92:55–62. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9304-6>
- Sidorov VA, Menczel L, Nagy F et al (1981) Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. *Planta* 152:341–345. <https://doi.org/10.1007/BF00388259>
- Siemens J, Sacristan MD (1995) Production and characterization of somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra*. *Plant Sci* 111(1):95–106. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(95\)04221-F](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04221-F)
- Sigareva M, Earle E (1999a) Camalexin induction in intertribal somatic hybrids between *Camelina sativa* and rapid-cycling *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 98:164–170. <https://doi.org/10.1007/s001220051053>
- Sigareva M, Earle E (1999b) Regeneration of plants from protoplasts of *Capsella bursa-pastoris* and somatic hybridization with rapid cycling *Brassica oleracea*. *Pl Cell Rep* 18:412–417. <https://doi.org/10.1007/s002990050595>
- Sikdar SR, Chatterjee G, Das S et al (1990) «Erussica», the intergeneric fertile somatic hybrid developed through protoplast fusion between *Eruca sativa* Lam. and *Brassica juncea* (L.) Czern. *Theor Appl Genet* 79:561–567. <https://doi.org/10.1007/BF00226168>
- Singh KP, Kumari P, Rai PK (2023) Phenotypic characterization and resistance response to *Sclerotinia sclerotiorum* of backcross lines developed from stable allohexaploids of *Sinapis alba* + *Brassica juncea*. *Euphytica* 219:34. <https://doi.org/10.1007/s10681-023-03160-x>
- Singh KP, Kumari P, Yadava DK (2021) Introgression and QTL mapping conferring resistance for *Alternaria brassicae* in the backcross progeny of *Sinapis alba* + *Brassica juncea* somatic hybrids. *Plant Cell Rep* 40:2409–2419. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02785-3>
- Singh S, Dey SS, Bhatia R et al (2019) Current understanding of male sterility systems in vegetable *Brassicaceae* and their exploitation in hybrid breeding. *Plant Reproduction* 32:231–256. <https://doi.org/10.1007/s00497-019-00371-y>
- Skarjinskaia M, Svab Z, Maliga P (2003) Plastid transformation of *Lesquerella fendleri*, an oilseed *Brassicaceae*. *Transgenic Res* 12:115–122. <https://doi.org/10.1023/A:1022110402302>
- Skarzhinskaya M, Fahleson J, Glimelius K, Mouras A (1998) Genome organisation of *B.napus* and *L. fendleri* and analysis of their somatic hybrids using *in situ* hybridization. *Genome* 41:691–701. <https://doi.org/10.1139/g98-056>
- Skarzhinskaya M, Landgren, M, Glimelius K (1996) Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats. *Theor Appl Genet* 93:1242–1250. <https://doi.org/10.1007/BF00223456>
- Srinivasan K, Malathi V, Kirti P et al (1998) Generation and characterisation of monosomic chromosome addition lines of *Brassica campestris* – *B. oxyrrhina*. *Theor Appl Genet* 97:976–981. <https://doi.org/10.1007/s001220050979>

- Sundberg E, Glimelius K (1986) A method for production of interspecific hybrids within Brassicaceae via somatic hybridization, using resynthesis of *Brassica napus* as a model. *Plant Sci* 43:155–162. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(86\)90157-3](https://doi.org/10.1016/0168-9452(86)90157-3)
- Sundberg E, Glimelius K (1991) Effects of parental ploidy level and genetic divergence on chromosome elimination and chloroplast segregation in somatic hybrids within *Brassicaceae*. *Theor Appl Genet* 83: 81–88. <https://doi.org/10.1007/BF00229229>
- Sundberg E, Lagercrantz U, Glimelius K (1991) Effect of cell type used for fusion on chromosome elimination and chloroplast segregation in *Brassica oleracea* (+) *Brassica napus* hybrids. *Plant Sci* 78(1):89–98. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(91\)90165-5](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90165-5)
- Sundberg E, Landgren M, Glimelius K (1987) Fertility and chromosome stability in *Brassica napus* resynthesised by protoplast fusion. *Theor Appl Genet* 75:96–104. <https://doi.org/10.1007/BF00249148>
- Tabaeizadeh Z, Perennes, C, Bergounioux C (1985) Increasing the variability of *Lycopersicon peruvianum* Mill. by protoplast fusion with *Petunia hybrida* L. *Pl Cell Rep* 4:7–11. <https://doi.org/10.1007/BF00285493>
- Takahata Y, Takeda T (1990) Intergeneric (intersubtribe) hybridization between *Moricandia arvensis* and *Brassica* A and B genome species by ovary culture. *Theor Appl Genet* 80:38–42. <https://doi.org/10.1007/BF00224013>
- Takahata Y, Takeda T, Kaizuma N (1993) Wide hybridization between *Moricandia arvensis* and *Brassica* amphidiploid species (*B. napus* and *B. juncea*). *Euphytica* 69:155–160. <https://doi.org/10.1007/BF00021740>
- Toriyama K, Hinata K, Kameya T (1987a) Production of somatic hybrid plants, «Brassicomoriscandia», through protoplast fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Sci* 48(2):123–128. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(87\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0168-9452(87)90139-7)
- Toriyama K, Kameya T, Hinata K (1987b) Selection of a universal hybridizer in *Sinapis turgida* Del. and regeneration of plantlets from somatic hybrids with *Brassica* species. *Planta* 170:308–313. <https://doi.org/10.1007/BF00395021>
- Tu Y, Sun J, Liu Y et al (2008) Production and characterization of intertribal somatic hybrids of *Raphanus sativus* and *Brassica rapa* with dye and medicinal plant *Isatis indigotica*. *Pl Cell Rep* 27:873–883. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0513-1>
- Turpin C (1986) Attempt of male cytoplasmic sterility introduction by intergeneric fusion in cultivated tomato. *Acta Hort* 191:377–379. https://www.actahort.org/books/191/191_43.htm
- U N (1935) Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Jpn J Bot* 7:389–452.
- Ueno O, Bang SW, Kondo Y et al (2003) Structural and biochemical dissection of photorespiration in hybrids differing in genome constitution between *Diplotaxis tenuifolia* (C₃–C₄) and radish (C₃). *Plant Physiol* 132(3):1550–1559. <https://doi.org/10.1104/pp.103.021329>
- Vasilenko MYu, Komarnytskii IK, Sakhno LO et al (2003) Development and analysis of intergeneral somatic hybrids of *Brassica napus* and albino-type line of *Orychaphragmus violaceus*. *Cytol Genet* 37(1):3–10.
- Vasylenko M, Ovcharenko O, Gleba Y, Kuchuk N (2006). Production of cybrids in Brassicaceae species. *Plant Cell Culture Protocols* 219–232. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:219>
- Vyas P, Prakash S, Shivanna KR (1995) Production of wide hybrids and backcross progenies between *Diplotaxis erucoides* and crop brassicas. *Theor Appl Genet* 90:549–553. <https://doi.org/10.1007/BF00222002>
- Wang G-x, Lv J, Zhang J, Han S et al (2016) Genetic and epigenetic alterations of *Brassica nigra* introgression lines from somatic hybridization: A Resource for Cauliflower Improvement. *Front Plant Sci* 7:1258. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01258>
- Wang G-x, Tang Y, Yan H et al (2011) Production and characterization of interspecific somatic hybrids between *Brassica oleracea* var. *botrytis* and *B. nigra* and their progenies for the selection of advanced pre-breeding materials. *Plant Cell Rep* 30:1811–1821. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1088-9>
- Wang J, Jiang J and Wan Y (2013) Protoplast fusion for crop improvement and breeding in China. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 112:131–142. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0221-y>
- Wang Y, Meng G, Chen S et al (2018) Correlation Analysis of Phenolic Contents and Antioxidation in Yellow- and Black-Seeded *Brassica napus*. *Molecules* 23(7):1815. <https://doi.org/10.3390/molecules2307181>
- Wang YP, Snowdon RJ, Rudloff E et al (2004) Cytogenetic characterization and *fae1* gene variation in progenies from asymmetric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. *Genome* 47(4):724–731. <https://doi.org/10.1139/g04-024>
- Wang YP, Sonntag K, Rudloff E (2003) Development of rapeseed with high erucic acid content by asymmetric somatic hybridization between *Brassica napus* and *Crambe abyssinica*. *Theor Appl Genet* 106:1147–1155. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-1176-x>
- Wang YP, Sonntag K, Rudloff E et al (2005) Intergeneric somatic hybridization between *Brassica napus* L. and *Sinapis alba* L. *J Integrat Plant Biol* 47(1):84–91. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00009.x>

- Wang YP, Sonntag K, Rudloff E et al (2006) Production and characterization of somatic hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus sativus*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 86:279–283. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9118-y>
- Yamagishi H, Glimelius K (2003) Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*). *Pl Cell Rep* 22:52–58. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0655-0>
- Yamagishi H, Landgren M, Forsberg J et al (2002) Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system. *Theor Appl Genet* 104: 959–964. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0881-9>
- Yamagishi H, Nakagawa S (2004) Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cabbage (*Brassica oleracea*). *J Japan Soc Hort Sci* 73(4):319–323. <https://doi.org/10.2503/jjshs.73.319>
- Yan Z, Tian Z, Huang B, Meng J (1999) Production of somatic hybrids between *Brassica oleracea* and the C₃-C₄ intermediate species *Moricandia nitens* *Theor Appl Genet* 99(7–8):1281–1286. <https://doi.org/10.1007/s001220051334>
- Yemets A, Kundel'chuk O, Smertenko A et al (2000) Transfer of amiprofosmethyl resistance from a *Nicotiana plumbaginifolia* mutant by somatic hybridisation. *Theor Appl Genet* 100:847–857. <https://doi.org/10.1007/s001220051361>
- Yu Q, Lutz KA, Maliga P (2017) Efficient Plastid Transformation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 175 (1):186–193. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00857>
- Zhang L, Zhao H, Liu F (2008) Identification and analysis of asymmetric somatic hybrids between *B. oleracea* and *B. nigra*. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 41(4):265–274
- Zhao ZG, Hu TT, Ge XH et al (2008) Production and characterization of intergeneric somatic hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* and their backcrossing progenies. *Pl Cell Rep* 27:1611–1621. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0582-1>

Надійшла в редакцію 02.05.23
Після доопрацювання 30.05.23
Прийнята до друку 18.09.23