

3. Medeyesy F., Fejes E., Maliga P. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.— 1985.— 82, N 20.— P. 6960—6964.
4. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. I. Hybrid and cybrids among the regenerates from cloned protoplast fusion products / Y. Y. Gleba, N. N. Kolesnik, I. V. Meshkene et al. // Theor. and Appl. Genet.— 1984.— 69, N 1.— P. 121—128.
5. Spangenberg H., Neuhaus G., Potrykus I. Micromanipulation of higher plant cells // Plant cell line selection / Ed. P. J. Dix.— Weinheim: VCH, 1990.— P. 87—109.
6. Koop H. U., Schweiger H. G. Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system // J. Plant Physiol.— 1986.— 121, N 3.— P. 245—257.
7. Kao K. N., Michayluk M. R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta.— 1975.— 126, N 2.— P. 105—110.
8. Cytoplasm-protoplast fusion for interspecific chloroplast transfer in *Nicotiana*; P. Maliga, H. Loerz, G. Lazar, F. Nagy // Mol. and Gen. Genet.— 1981.— 185, N 2.— P. 211—215.
9. Transmission genetics of the somatic hybridization process in *Nicotiana*. II. Plastome heterozygotes / Yu. Gleba, I. K. Komarnitsky, N. N. Kolesnik et al. // Ibid.— 1985.— 198, N 3.— P. 476—481.
10. Tilney-Bassett R. A. E. The control of plastid inheritance in *Pelargonium* // Genet. Res.— 1970.— 16, N 1.— P. 49—61.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии АН УССР,  
Киев

Получено 14.01.91

Тел. 042-1 (ЕТН), Цюрих

№ 575.22

И. В. Кучук, А. М. Шаховский, В. В. Воронин, Ю. Ю. Глеба

## ПОЛУЧЕНИЕ АСИММЕТРИЧНЫХ СОМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ В РОДЕ *MEDICAGO*

Получены асимметричные соматические гибриды между различными видами люцерны (*Medicago* sp.). Регенерированы растения в гибридной комбинации *M. sativa*+*M. varia*. Мезофильные канамицин-устойчивые протопласты *M. varia* облучали гамма-лучами в дозе 300 Гр. У них выявлен ген устойчивости к канамицину. Отбор асимметричных соматических гибридов: вели по устойчивости к канамицинсульфату. В комбинации *M. borealis*+*M. lupulina* получены клеточные линии. Канамицин-устойчивые каллусные протопласты *M. lupulina* облучали гамма-лучами в дозе 500 Гр.

**Введение.** Клеточная инженерия растений за последнее время достигла больших успехов в расшировке механизмов организации, функционирования и регулирования растительного генома, а также в конструировании новых форм растений, обладающих целым рядом хозяйственно ценных признаков. В перспективе развитие этих методов позволит выйти на новые ступени в познании живой природы, а также существенно изменит и ускорит селекционный процесс по выведению высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным факторам среды сортов культурных растений. В то же время подавляющее большинство экспериментов по клеточной инженерии растений проведено на видах из семейства пасленовых и в меньшей степени — крестоцветных. Менее изучены в этом отношении виды семейства бобовых, имеющие важное значение для сельскохозяйственного производства. К настоящему времени существует относительно мало работ, описывающих получение соматических гибридов между видами семейства бобовых, что в значительной степени связано с трудностями культивирования протопластов у этих видов.

Эксперименты по соматической гибридизации у видов из семейства бобовых проводили, главным образом, с видами рода *Medicago*. Так, авторы [1] сообщили о получении гибридных растений в результате слияния протопластов *M. sativa* с протопластами *M. falcata*. В работе

© И. В. Кучук, А. М. Шаховский, В. В. Воронин, Ю. Ю. Глеба, 1991.

не приведено никаких биохимических или цитологических доказательств гибридности полученных растений, а также не описаны способы селекции, с помощью которых они были отобраны. Авторы указали только на их измененную морфологию, что могло быть результатом соматической изменчивости в результате культивирования протопластов и образующихся из них клеточных линий. В дальнейшем было показано [2], что у таких растений рестриктивные спектры хлоропластных ДНК наследуются от обоих родителей, а спектры митохондриальной ДНК имеют характер, отличный от родительских. Доказательств гибридности полученных растений по ядерным генам в данной работе также приведено не было.

В экспериментах по слиянию протопластов *M. sativa* с протопластами *M. falcata* или *M. quasifalcata* гетерокарионы отбирали по двойной флюоресценции, используя меченные флюоресцентным красителем протопласты одного вида и мезофильные протопласты — другого. В результате экспериментов получены зеленеющие клеточные линии, анализ изоферментных спектров которых выявил их гибридность. Цитологический анализ показал, что хромосомный набор у этих линий является суммой хромосомных наборов обоих родителей [3].

Аналогичные результаты получены [4] после индукции слияния протопластов *M. sativa* с протопластами *M. arborea* с использованием электрического поля. В итоге отобраны клеточные линии, гибридность которых была доказана с помощью электрофореза белков. Так же, как и в предыдущей работе, не сообщалось о выявлении регенерантов из гибридных клеточных линий.

Авторы работы [5] сообщили о получении гибридных клеточных линий после слияния мезофильных протопластов *M. varia*, устойчивых к канамицинсульфату, с протопластами *M. sativa* из клеточной суспензии, устойчивой к фосфинотрицину. Гибридные клеточные линии, обладающие устойчивостью как к канамицинсульфату, так и к фосфинотрицину, оказались неспособными к регенерации. В то же время из протопластов *M. varia* удается получить нормальные растения. Авторы предполагают, что связанная с устойчивостью к фосфинотрицину суперпродукция глутаминсинтетазы у исходной клеточной суспензии *M. sativa* и у гибридных линий каким-то образом ингибирует регенерационную способность. Опубликованные результаты являются первым свидетельством возможности использования селективных признаков, в том числе и гена устойчивости к канамицинсульфату, для отбора соматических гибридов у видов семейства бобовых.

С использованием генетической комплементации после слияния протопластов из белых мутантных суспензионных культур *M. sativa* и *M. borealis* были получены зеленые гибридные клеточные линии [6].

Впервые в настоящей работе описано получение растений асимметричных соматических гибридов между *M. sativa* и облученной (300 Гр) *M. varia*, а также клеточных линий асимметричных соматических гибридов между *M. borealis* и облученной (500 Гр) *M. lupulina*.

**Материалы и методы.** Растительный материал. В работе использовали следующие сорта и линии люцерны: люцерна посевная, *M. sativa* L., сорт «Веселоподолянская»; люцерна северная, *M. borealis* L., линия 94, любезно предоставлена М. Н. Агафодоровой (ВНИИ кормов им. В. Р. Вильямса, Московская обл.); люцерна хмелевидная, *M. lupulina* L., линия 93, любезно предоставлена М. Н. Агафодоровой; люцерна изменчивая, *M. varia* L., устойчивая к канамицинсульфату трансгенная линия, получена из Сегедского Биологического Научного Центра (Сегед, ВНР) [7].

У вышеперечисленных видов после стерилизации семян 1%-ным раствором диазида в течение 8—10 мин и трехкратной отмывки стерильной дистиллированной водой были получены стерильные растения. Растения выращивали на безгормональной питательной среде MS [8] или B5 [9].

Генетическая трансформация *M. lupulina*, опосредованная *Agrobacterium tumefaciens*. Кусочки стеблей и листьев люцерны длиной 0,4—0,6 см суспендировали в жидкой питательной среде В5, содержащей 0,2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина или БАП, и добавляли к ним ночную культуру *A. tumefaciens pRiA4, pGA472* [10, 11]. Совместное культивирование продолжалось в течение 48 ч при постоянном перемешивании. Затем кусочки растительных тканей извлекали из среды, высушивали стерильной фильтровальной бумагой и раскладывали на плотную питательную среду В5 с 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина или БАП, содержащую 500 мг/л карбенициллина (ПО «Мосмедпрепараты», СССР) и 500 мг/л цефотаксима («Calbiochem», США). Спустя две недели растительные ткани и образующиеся клеточные линии переносили на питательную среду того же состава с 200 мг/л карбенициллина, 200 мг/л цефотаксима и 50 мг/л канамицинсульфата (СССР). Отобранные клеточные клоны *M. lupulina*, устойчивые к канамицинсульфату, в дальнейшем пассировали на питательной среде того же состава.

Выделение и культивирование протопластов люцерны и клевера, а также полученных продуктов слияния осуществляли по разработанной нами методике [12].

Слияние протопластов и отбор асимметричных соматических гибридов. Протопласты одного из партнеров предварительно облучали на установке «Исследователь», используя в качестве облучателя  $Co^{60}$  с удельной активностью 22 Р/с. Слияние протопластов проводили по методу, предложенному для слияния мезофильных протопластов растений [13].

Протопласты двух партнеров смешивали в растворе W5 в соотношении 1 : 1 и наносили в виде капли на дно пластиковой чашки Петри. Спустя 10 мин к капле добавляли раствор, состоящий из 40 %-ного полиэтиленгликоля-4000, 0,4 М маннитола, 0,1 М  $CaCl_2$ , pH 10,5, примерно в равном объеме. Через 30 мин инкубации сливающиеся протопласты отмывали раствором W5. Затем раствор W5 отбирали пастеровской пипеткой, а к оставшимся на дне чашки Петри протопластам добавляли модифицированную питательную среду КМ8р [12]. Асимметричные соматические гибриды отбирали на питательной среде В5, содержащей 50 мг/л канамицинсульфата в качестве селективного агента, а также 1 мг/л кинетина или БАП.

Активность неоминифосфотрансферазы (NPTII) анализировали по способу [14].

ДНК-ДНК гибридизация по Саузерну [15]. Растительные ДНК выделяли, как описано в работе [16]. ДНК-ДНК гибридизацию по Саузерну осуществляли по методу, изложенному в методическом руководстве фирмы «Amersham» (Англия).

**Результаты и обсуждение.** Предварительные эксперименты по выживаемости протопластов *M. varia*, облученных дозой 250 Гр, показали, что только у 1 % протопластов наблюдается первое, а иногда и второе деление, но затем дальнейшее их развитие прекращается. Таким образом, доза 250 Гр является летальной для мезофильных протопластов *M. varia*.

Выживаемость протопластов после слияния составляла 20—30 %, а количество наблюдаемых гетерокарионов достигало 5—10 % от числа выживших протопластов. После слияния протопластов *M. sativa* с протопластами *M. varia*, облученными дозой 250 Гр, были отобраны девять клеточных линий, устойчивых к канамицинсульфату, а после слияния с протопластами *M. varia*, облученными дозой 300 Гр, — 13 клеточных линий, устойчивых к этому препарату.

Отобранные канамицинустойчивые клеточные линии интенсивно зеленели на свету, в то время как клеточные линии, полученные у *M. sativa*, сорт «Веселоподолянская», обычно росли в виде светло-зеленых колоний при исходных условиях культивирования.

На рис. 1 приведены данные по определению активности NPTII у

асимметричных соматических гибридов *M. sativa*+*M. varia* (1 — контрольное растение *M. sativa*; 2—5 — канамицинустойчивые гибридные клоны). Анализ показал присутствие активности этого фермента у полученных клеточных линий. Затем последние пассировали в течение года на различных питательных средах. У линий 1, 3, 5 и 9, возникших после слияния с облученными протопластами донора (300 Гр), были индуцированы эмбриоподобные структуры (на питательной среде В5 с 0,5 мг/л кинетина, 40 мг/л аденинсульфата в присутствии 50 мг/л канамицинсульфата). После пассирования этих эмбриоподобных структур на безгормональных питательных средах у линии 5 образовывались побеги, которые в дальнейшем укоренялись (рис. 2: а — регенерация растений; б — растущие в асептических условиях соматические гибриды *M. sativa*+*M. varia*).



Рис. 1

Количество хромосом ( $2n=70-72$ ) у полученного растения было значительно выше, чем у обоих исходных форм ( $2n=32$ ). Это подтверждается данными рис. 3, где изображен хромосомный набор соматического гибрида *M. sativa*+*M. varia* ( $2n=70-72$ ).

Изучение рибосомных генов у родительских форм и гибридных линий 3 и 5 при помощи ДНК-ДНК гибридизации по Саузерну проде-

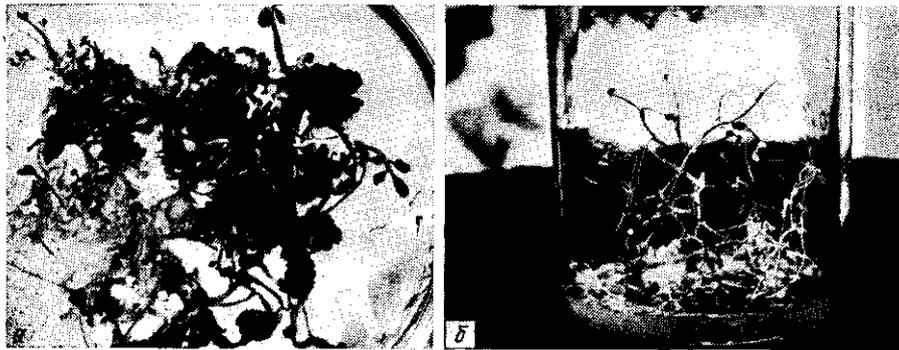


Рис. 2

монстрировало, что полосы гибридизации у родительских форм имеют одинаковую молекулярную массу. Однако у гибридной линии 3, кроме обычной для обоих родителей полосы гибридизации, появляется дополнительная полоса. На рис. 4 представлен анализ рДНК у асимметричных соматических гибридов: а — *EcoRV*-перевар ДНК (1 — родительская линия *M. varia*; 2 — гибридное растение [5] *M. sativa* с облученной в дозе 300 Гр *M. varia*; 3 — гибридная клеточная линия [3] *M. sativa* с облученной в дозе 300 Гр *M. varia*; 4 — родительская линия *M. sativa*; 5 — родительская линия *M. borealis* 94; 6 — гибридная клеточная линия *M. borealis* с облученной в дозе 500 Гр *M. lupulina*; 7 — родительская линия *M. lupulina*); б — *EcoRI*-перевар ДНК. В качестве зонда использовали 18S рДНК; маркеров молекулярных масс — *EcoRI*-перевар ДНК фага лямбда.

Асимметричные соматические гибриды также были получены после слияния мезофильных протопластов *M. borealis* с протопластами *M. lupulina*, полученными из канамицинустойчивых клеточных клонов, трансформированных *A. tumefaciens* *pRiA4*, *pGA472*. Протопласты *M. lupulina* были облучены в дозе 500 Гр. В результате проведенных опытов получены восемь клеточных линий, зеленеющих на свету в присутствии 50 мг/л канамицинсульфата. Эти клеточные клоны не образовывали побегов на испытанных питательных средах. В то же время они также не образовывали и корней, хотя у исходного генотипа *M. lupulina* в подобных условиях наблюдается активный ризогенез. На рис. 5

приведены данные по определению *NPTII* у асимметричных соматических гибридов *M. borealis*+*M. lupulina* (1—6 — канамицинустойчивые гибридные клоны).

Исследование рибосомных генов у родительских генотипов и гибридной линии 7 показало, что гибрид наследовал рибосомные гены от обоих родителей (см. рис. 4).

После слияния мезофильных протопластов *M. sativa*, сорт «Веселоподолянская», с облученными мезофильными протопластами *M. varia*, несущими ген устойчивости к канамицинусульфату, были отобраны гибридные клеточные клоны, которые, кроме устойчивости к канамицинусульфату, проявляли также способность к регенерации. У некоторых из этих клонов удалось индуцировать образование эмбриоподобных структур, а у одного из клонов (№ 5) были получены нормализованные растения. Можно предположить, что

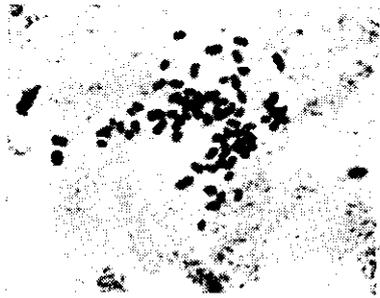


Рис. 3

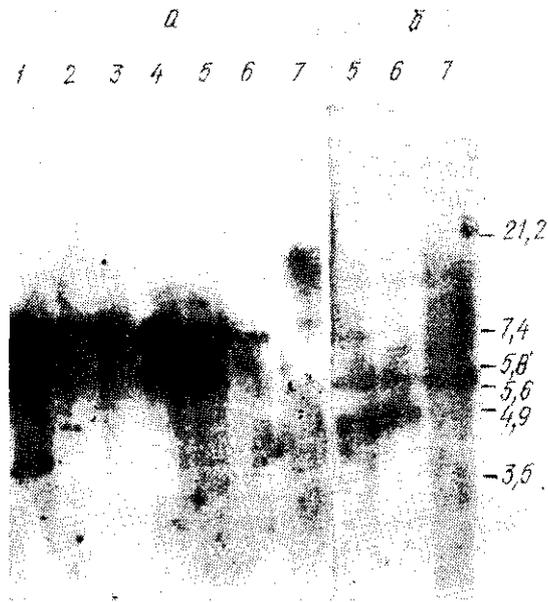


Рис. 4

гибридные клоны содержат в своем геноме гены *M. varia*, определяющие регенерационную способность. Ранее аналогичные результаты по переносу регенерационной способности были получены для асимметричных соматических гибридов томатов [17]. Проведенный хромосомный анализ показал, что такой гибрид несет октоплоидный набор с некоторым числом дополнительных хромосом. К сожалению, у люцерны трудно дифференцировать хромосомы родителей, однако имеющиеся результаты по асимметричной соматической гибридизации у видов рода *Nicotiana*, а также между *Nicotiana* и *Atropa* [18, 19] демонстрируют преимущественный отбор в таких комбинациях гибридов с удвоенным набором хромосом реципиента и некоторым числом хромосом донора. В наших экспериментах использовали родительские виды с тетраплоидным числом хромосом  $2n=32$ , что привело к получению гибрида с октоплоидным набором с добавочным количеством хромосом донора. Его морфология существенно отличается от обоих родителей. Так, большинство листьев ненормальной редуцированной формы, сильно укороченные междоузлия, затрудненное корнеобразование в культуре *in vitro*. Такой фенотип может являться результатом как определенной несовместимости геномов реципиента и облученного донора, так, возможно, и следствием длительного культивирования гибридных клеточных культур прежде чем удалось индуцировать регенерационные события.

С практической стороны более интересна вторая гибридная комбинация, полученная нами. Люцерна хмелевидная (*M. lupulina*) способна к самоопылению, что является очень полезным признаком с точки зрения селекции люцерны на повышенную семенную продуктивность. В то же время она совершенно не способна к скрещиванию с окульту-

ренными видами люцерны. Нам удалось в гибридной комбинации после слияния мезофильных протопластов *M. borealis*, линия 94, с облученными протопластами *M. lupulina*, несущими ген устойчивости к канамицину, отобрать клеточные линии. Необходимо отметить, что морфология получаемых клонов была более похожа на морфологию клеточных линий *M. borealis*. Асимметричные соматические гибриды развивались в виде зеленых клеточных линий без всяких признаков корнеобразования, что характерно для клеточных линий донора, трансформированных *pRiA4* с плазмидой *pGA472*. К сожалению, регенерировать растения из таких гибридных клеточных линий пока не удалось.

Исследование рибосомных генов у родительских форм и полученных гибридных клеточных линий между *M. borealis* и *M. lupulina* показало, что эти гены наследуются от обоих партнеров у асимметричных соматических гибридов.

Наши результаты подтверждают ранее полученные данные о наследовании рибосомных генов у асимметричных соматических гибридов между *N. plumbaginifolia* и *Atropa belladonna* [19] и *N. plumbaginifolia* и *N. sylvestris* [18]. Появление новых полос гибридизации рибосомных генов у асимметричных соматических гибридов между *M. sativa* и *M. varia* может быть объяснено возникновением новых классов рибосомных повторов у соматических гибридов. Это уже отмечалось ранее у соматических гибридов между *N. plumbaginifolia* и *A. belladonna* [20].

Таким образом, нами разработаны методы слияния протопластов у рода *Medicago* с применением инактивации одного из партнеров при помощи гамма-облучения. Кроме того, полученные нами регенеранты после слияния протопластов *M. sativa* и *M. varia* являются первыми регенерировавшими асимметричными межвидовыми соматическими гибридами в роде *Medicago*.

Наши результаты по асимметричной соматической гибридизации у видов рода *Medicago* открывают новые возможности в селекции этих важных сельскохозяйственных культур, позволяют получать новый исходный селекционный материал с полезными генами, перенесенными из родов и видов, у которых обычное скрещивание ограничено или вообще невозможно.

## Резюме

Одержані асиметричні соматичні гібриди між різними видами люцерни (*Medicago sp.*). Як донорів використовували канамициностійкі протопласти *M. varia* і *M. lupulina*.

У гібридній комбінації між *M. sativa* та опроміненою (300 Гр) *M. varia* відібрано 13 канамициностійких клітинних клонів. У одного з них одержані рослини. Кількість хромосом гібриду складала  $2n=70-72$ , що значно більше, ніж у обох батьків —  $2n=32$ . Зроблено припущення, що здатність до регенерації одержаних гібридів перейшла від опроміненого донора *M. varia*. У гібридній комбінації між *M. borealis* та опроміненою (500 Гр) *M. lupulina* відібрано вісім канамициностійких клітинних клонів. Аналіз активності неоміцинофосфотрансферази та рДНК за допомогою блот-гібридизації по Селзерну показав гібридну природу одержаних ліній в обох комбінаціях.

## Суммагу

Interspecific somatic hybrids of *Medicago* have been obtained by «gamma-fusion». Kanamycin resistant plants of *M. varia* and kanamycin resistant callus line of *M. lupulina* were used as donors. *M. sativa* and *M. borealis* were used as recipients. After fusion of gamma-irradiated (300 Gy) mesophyll protoplasts of *M. varia* with those of *M. sativa*, 13 kanamycin resistant hybrid clones were selected. We could induce the formation plant regenerants from one of the clones. Chromosome number of regenerated plants was

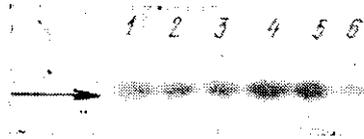


Рис. 5

70—72, thus differing from both the parents  $2n=32$  and indicating asymmetric genome constitution. Since the recipient genotype of *M. sativa* was deficient for shoot morphogenesis in culture, we think that transfer of the regeneration ability from *M. varia* to the hybrid takes place. After fusion of gamma-irradiated (500 Gy) callus protoplasts of *M. lupulina* with mesophyll ones of *M. borealis*, 8 kanamycin resistant clones were selected. Biochemical analysis involved hybrids of both species combinations. Activity of NPTII is detectable in hybrid plants as well as callus clones. Analysis of ribosomal DNA of hybrids by Southern blot hybridization demonstrated the presence of species-specific rDNA fragments of both parents.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Teoule E., Daffee Y. Recherche d'une methode fiable de culture de protoplasten, d'hybridation somatique et de regeneration chez *Medicago* // Agronomie.— 1987.— 7, N 8.— P. 575—584.
2. Mitochondrial and chloroplast DNA analysis of interspecific somatic hybrids of a Leguminosae: *Medicago (alfalfa)* / A. D'Hont, F. Quetier, E. Teoule, Y. Daffee // Plant Sci.— 1987.— 53, N 3.— P. 237—242.
3. Gilmour D. M., Davey M. R., Cocking E. C. Isolation and culture of heterokaryons following fusion of protoplasts from sexually compatible and sexually incompatible *Medicago* species // Ibid.— P. 263—270.
4. Damiani F., Pezzotti M., Arcioni S. Electric field mediated fusion of protoplasts of *Medicago sativa* L. and *Medicago arborea* L. // J. Plant Physiol.— 1988.— 132, N 4.— P. 474—479.
5. Dominant expression of a gene amplification-related herbicide resistance in *Medicago* cell hybrids / M. Deak, G. Donn, A. Feher, D. Dudits // Plant Cell Rept.— 1988.— 7, N 3.— P. 158—161.
6. Gilmour D., Davey M., Cocking E. C. Production of somatic hybrid tissues following chemical and electrical fusion of protoplasts from albino cell suspensions of *Medicago sativa* and *Medicago borealis* // Ibid.— 1989.— 8, N 1.— P. 29—32.
7. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer / M. Deak, J. B. Kiss, C. Koncz, D. Dudits // Ibid.— 1986.— 5, N 1.— P. 97—100.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.— 1962.— 15, N 3.— P. 473—497.
9. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // Exp. Cell. Res.— 1968.— 50, N 1.— P. 151—158.
10. New cloning vehicles for transformation of higher plants / G. An, B. D. Watson, S. Stachel et al. // EMBO J.— 1985.— 4, N 2.— P. 277—284.
11. Free auxin level and inheritance of introduced markers in tobacco transformed by binary vector based on *A4R1* plasmid / M. Ondrej, J. Eder, M. Hroudá et al. // Biol. Plant.— 1989.— 31, N 4.— P. 286—291.
12. Кучук Н. В. Выделение и культивирование протопластов пяти видов семейства бобовых // Физиология растений.— 1989.— 36, № 4.— С. 821—824.
13. Fusion of plant protoplasts: A study using auxotrophic mutants of *Nicotiana plumbaginifolia* / I. Negrutiu, D. de Brouwer, S. W. Watts et al. // Theor. and Appl. Genet.— 1986.— 72, N 2.— P. 279—289.
14. The use of nuclear-encoded sequences to direct the light regulated synthesis and transport of a foreign protein into plant chloroplasts / P. H. Schreier, E. A. Seftor, J. Schell, H. J. Bohnert // EMBO J.— 1985.— 4, N 1.— P. 25—32.
15. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis // J. Mol. Biol.— 1975.— 98, N 3.— P. 503—517.
16. Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. A plant DNA miniprep. Version II // Plant Mol. Biol. Rept.— 1983.— 1, N 4.— P. 19—21.
17. Wigbrandi G., Vos G. G.-M., Korneef H. Transfer of regeneration capacity from *Lycopersicon peruvianum* to *Lycopersicon esculentum* by protoplast fusion // Plant Cell, Tissue and Organ. Culture.— 1988.— 12, N 2.— P. 193—196.
18. Intrageneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Nicotiana sylvestris* obtained by «gamma-fusion» / I. Famelaer, Y. Y. Gleba, V. A. Sidorov et al. // Plant Sci.— 1989.— 61, N 2.— P. 105—117.
19. Intergeneric asymmetric hybrids between *Nicotiana plumbaginifolia* and *Atropa belladonna* obtained by «gamma-fusion» / Y. Y. Gleba, S. Hinnisdaels, V. A. Sidorov et al. // Theor. and Appl. Genet.— 1988.— 76, N 3.— P. 760—766.
20. Borisyuk N. V., Momot V. P., Gleba Y. Y. Novel class of rDNA repeat units in somatic hybrids between *Nicotiana* and *Atropa* // Ibid.— N 1.— P. 108—112.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,  
Киев

Получено 14.01.91