

# Определение типа цитоплазмы у растений семейства Капустные (Brassicaceae Burnett) с помощью ДНК маркеров

Е.А. Домблидес, А.С. Домблидес, Т.В. Заячковская, Л.Л. Бондарева

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства овощных культур, Московская область, Одинцовский р-н, пос. ВНИИССОК, Россия

Идентификация типа цитоплазмы с использованием молекулярных маркеров позволяет упростить отбор пар для скрещивания при создании гибридов на основе цитоплазматической мужской стерильности (ЦМС). На 40 образцах семейства Капустные (Brassicaceae Burnett) для определения типа цитоплазмы протестированы 22 пары уже известных праймеров, отобранных из литературных источников. С использованием стандартной и мультиплексной ПЦР были идентифицированы 7 различных типов цитоплазмы (*Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad*, *ole*) у коллекционных образцов. Расшифровка нуклеотидной последовательности продуктов, дифференцирующих различные типы стерильности цитоплазмы, подтвердила наличие в митохондриальной ДНК (мтДНК) исследуемых стерильных образцов локусов генов *orf138*, *orf222*, *orf224*, связанных с проявлением признака ЦМС. У стерильного образца капусты пекинской в мтДНК присутствовало сразу два гена, *orf138* и *orf222*, что соответствовало типу *Ogu-NWSUAF*. У всех образцов, несущих цитоплазму *Ogura*, в мтДНК присутствовал участок 417 п. н., на 100 % гомологичный с митохондриальным геном *orf138*-тип А (всего ранее выделяли 9 типов гена *orf138* – от А до I). Исключение составил образец капусты белокочанной F1 Tekila, у которого был выявлен новый аллельный вариант гена *orf138*, характеризующийся наличием делеции в 39 п. н., но в отличие от *orf138*-тип F, для которого также характерна делеция в 39 п. н., у него присутствовали две несинонимичные замены: А→Т по 95-й позиции и G→А по 99-й позиции.

Ключевые слова: Brassicaceae Burnett; митохондриальная ДНК (мтДНК); цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС); ЦМС *Ogura*; ЦМС *Ogu-NWSUAF*; *orf138*; ПЦР.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Домблидес Е.А., Домблидес А.С., Заячковская Т.В., Бондарева Л.Л. Определение типа цитоплазмы у растений семейства Капустные (Brassicaceae Burnett) с помощью ДНК маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(5):529-537. DOI 10.18699/VJ15.069

## HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Domblides E.A., Domblides A.S., Zayachkovskaya T.V., Bondareva L.L. Identification of cytoplasm types in accessions of the family Brassicaceae (Brassicaceae Burnett) with DNA markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(5):529-537. DOI 10.18699/VJ15.069

УДК 581.16:577.21:582.683.2  
Поступила в редакцию 02.04.2015 г.  
Принята к публикации 09.09.2015 г.  
© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: edomblides@mail.ru

## Identification of cytoplasm types in accessions of the family Brassicaceae (Brassicaceae Burnett) with DNA markers

E.A. Domblides, A.S. Domblides, T.V. Zayachkovskaya, L.L. Bondareva

All-Russian Research Institute of Vegetable Breeding and Seed Production, Moscow oblast, Odintsovo region, VNIISOK, Russia

Identification of cytoplasm types with the use of molecular markers enables to simplify the parent line pair selection for hybrid development based on CMS. Forty accessions of the family Brassicaceae (Brassicaceae Burnett) were analyzed with 22 pairs of PCR primers taken from previous research. Seven types of cytoplasm (*Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad*, *ole*) were observed among breeding accessions using standard and multiplex PCR technique. The sequence of PCR products that differentiated different types of sterile cytoplasm confirmed the presence of three genes, *orf138*, *orf222*, and *orf224*, in mitochondrial DNA associated with exhibition of CMS. The accession of Nappa cabbage (*Brassica rapa* Pekinensis Group) had two genes, *orf138* and *orf222*, which corresponded to cytoplasm *Ogu-NWSUAF*. All accessions carrying *Ogura* cytoplasm had the 417 bp fragment, which was 100 % identical to the mitochondrial *orf138* gene sequence corresponding to Type A (formerly nine sequence Types, from A to I, had been identified). An exception was the accession of white head cabbage Tekila F1 with a new allelic variant of *orf138* gene, which combined the 39-bp deletion typical of the Type F *orf138* sequence and two nonsynonymous substitutions, A→T and G→A, at positions 95 and 99, respectively.

Key words: Brassicaceae Burnett; mitochondrial DNA (mtDNA); cytoplasmic male sterility (CMS); CMS *Ogura*; CMS *Ogu-NWSUAF*; *orf138*; PCR.

Цитоплазматическая мужская стерильность (ЦМС) – это наследуемый по материнской линии признак, кодируемый митохондриальной ДНК, при котором растение не может производить жизнеспособную пыльцу, а фертильность женского гаметофита сохраняется. Этот признак широко используется в селекции при создании гибридов первого поколения, поскольку позволяет контролировать процесс опыления пыльцой отцовских форм. На данный момент нет четкой классификации основных типов цитоплазмы, определяющих мужскую стерильность важнейших культивируемых видов растений семейства Капустные (Brassicaceae Burnett). Наиболее полная классификация предложена Т. Shiga в 1980 г. на основе обобщения исследований разных авторов (Shiga, 1980; Бунин, 2002). ЦМС-формы, относящиеся к определенному типу стерильности, характеризуются своим типом мтДНК и системой ядерного генетического контроля. Большинство митохондриальных генов, обуславливающих ЦМС у капустных культур, имеет химерную природу и создает новые открытые рамки считывания, такие как *orf222*, *orf224*, *orf138*, *orf125*, *orf263*, кодирующие цитотоксические белки (Tanaka et al., 2012). В зависимости от генетического происхождения стерильности, выделяют: 1) внутривидовые вариации (спонтанные мутации в митохондриальном геноме, обнаруженные *de novo*); 2) аллоплазматические стерильности, образовавшиеся в результате межвидовых и межродовых скрещиваний; 3) ЦМС, индуцированные слиянием соматических клеток (Yamagishi, Bhat, 2014). Основные, описанные в литературе, типы цитоплазмы, встречающиеся при различных типах ЦМС у культурных растений семейства Brassicaceae Burnett, – *Ogura* (несколько типов), *nap*, *pol*, *cam*, *rad/rap*, *tour/jun*.

ЦМС типа *Ogura* является одной из самых распространенных и наиболее часто используемых для производства гибридов F<sub>1</sub> у сельскохозяйственных культур семейства Brassicaceae во всем мире. Этот тип ЦМС был описан Х. Огурой (Ogura, 1968) у неидентифицированного сорта японского подвида *R. sativus* L. – дайкона. Было установлено, что данный тип стерильности индуцируется при взаимодействии гомозиготного ядерного гена *rf<sub>og</sub>rf<sub>og</sub>* и стерильной цитоплазмы *Ogura* (*ogu*). Сорта дайкона, распространенные в Японии, отличаются от этой стерильной формы не только наличием нормальной цитоплазмы (*rad* или *rap*), но и отсутствием доминантных генов-восстановителей фертильности (*Rf<sub>og</sub>Rf<sub>og</sub>*), в отличие от европейских сортов *R. sativus*, в которых они часто встречаются (Бунин, 2002). Позже была проведена целая серия скрещиваний стерильного дайкона с редисами, относящимися к европейскому подвиду *R. sativus*, позволившая получить гибриды редиса F<sub>1</sub> на основе цитоплазмы *Ogura* (Bonnet, 1977). Кроме того, цитоплазма *Ogura* была успешно перенесена в растения рода *Brassica*, относящиеся к видам *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*, *B. juncea*, посредством межродовых скрещиваний и серий последующих беккроссов (Bannerot et al., 1974; Неун, 1976). Методом слияния протопластов были получены гибриды с улучшенными характеристиками ЦМС (*ogu-INRA*), у которых отсутствовали недостатки хлорофилла и низкая секреция нектара (Pelletier et al., 1983). В результате изучения гена *orf138*, ответственного

за проявление стерильности *Ogura*, было выделено 9 его вариантов, обозначенных от А до I (англ.), включая *orf138*-тип F, для которого характерна делеция 39 п. н. Этот тип еще называют *Kosena* (по названию сорта редиса, из которого выделили стерильную линию *kos CMS*) (Yamagishi, Terachi, 2001). Рапс с цитоплазмой *Kosena* был получен из гибридов между *R. sativus kos CMS* и *B. napus* сорта Wester (Sakai, Imamura, 1994).

Еще одним распространенным типом ЦМС у капустных культур является *Polima*-ЦМС (*pol CMS*). Этот тип стерильности был обнаружен и описан у одноименного польского сорта рапса в 1972 г. (Fu, 1981). *Pol CMS* стерильные линии по чувствительности проявления мужской стерильности к температуре делят на три типа: высокотемпературные, низкотемпературные и стабильные ЦМС-линии. В соответствии с этим для получения гетерозисных гибридов на основе *pol*-цитоплазмы используют как трехлинейную, так и двухлинейную схему (Yang et al., 1995). Тип *Shaan 2A CMS*, обнаруженный в 1976 г. в потомстве от скрещиваний селекционных линий рапса китайского происхождения (Li, 1980), в отличие от описанной ранее *pol CMS*, характеризовался стабильным проявлением полной мужской стерильности. Последующее молекулярное изучение подтвердило идентичность цитоплазмы *Shaan 2A* и *Polima*. У обоих типов выделялся ассоциированный с ЦМС *orf224/atp6* локус мтДНК, отличающийся только одним нуклеотидом по 398-й позиции (A→G) и, соответственно, одной аминокислотой (Asn→Ser) (Wang et al., 2002). Использование метода слияния протопластов позволило перенести цитоплазму *Polima* от стерильных растений рапса в брокколи (Yaragow et al., 1990), а посредством межвидовых скрещиваний – в капусту китайскую *B. rapa* L. ssp. *chinensis* (L.) Hanelt (Hu, 1997).

*Nap*-ЦМС известна еще как Shiga–Thompson ЦМС система, названная так по фамилиям авторов, описавших ее в потомстве сортовой популяции европейского (Thompson, 1972) и японского рапса (Shiga, Baba, 1973). Большинство сортов рапса содержат *nap*-цитоплазму, но они фертильны, так как несут ген-восстановитель для *nap*-ЦМС. Стерильные растения при повышенной температуре воздуха (более 30 °C) и на поздних этапах цветения могут формировать жизнеспособную пыльцу, что ограничивает широкое использование этой системы ЦМС. Проявление этого типа цитоплазмы связано с экспрессией *orf222/nad5c/orf139* региона мтДНК. Расшифровка нуклеотидной последовательности *orf222* показала 79 % сходства с *orf224*, однако расположение в мтДНК этих двух локусов различается (L'Homme et al., 1997).

У рапса был описан тип стерильности *Ogu-NWSUAF*, характеризующийся присутствием в мтДНК сразу двух маркерных генов, *orf138* и *orf222*. Этот тип отличается большой стабильностью проявления ЦМС, отсутствием хлороза и хорошей завязываемостью семян (Zhao et al., 2010).

Еще один тип, вызывающий ЦМС у представителей семейства Капустные, – цитоплазма *tour*. Иногда его называют *jun*-цитоплазма или *Anand*-цитоплазма. Эта встречающаяся в природе аллоплазматическая ЦМС произошла от вида *B. tournefortii* (Pradhan et al., 1991) и впервые была описана у *B. juncea* (Rawat, Anand, 1979).

Растения при типе ЦМС *tour* имеют в мтДНК открытую рамку считывания (*orf263*) в 3' регионе гена *atp6* (Landgren et al., 1996).

Кроме типов цитоплазмы, вызывающих стерильность, выделяют и типы цитоплазмы, характерные для фертильных образцов различных видов, такие как *cam*, *rad/rap*, *ole*. Эти типы необходимо диагностировать для правильного подбора пар для скрещивания при создании гетерозисных гибридов на основе ЦМС.

Классическим методом определения типа цитоплазмы у капустных культур является проведение анализирующих скрещиваний (тест-кроссы) в течение нескольких лет. Развитие методов ДНК маркирования позволило сделать процесс идентификации более точным и быстрым, поэтому целью исследований являлся подбор маркеров ДНК для эффективного метода ПЦР определения основных типов цитоплазмы в генетической коллекции капустных культур при получении гибридов на основе ЦМС.

## Материалы и методы

**Растительный материал.** Исследование проводилось на фертильных и стерильных образцах семейства Капустные (табл. 1).

**Выделение ДНК.** Из молодых листьев и/или бутонов экстрагировали ДНК с использованием набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» («Синтол», Россия). ДНК выделялась из индивидуальных растений, кроме фертильных образцов, представляющих собой сортопопуляции, для которых составлялась выборка, объединяющая ДНК, полученную из 8–10 индивидуальных растений каждого образца в равных количествах (суммарный препарат ДНК).

**Аmplификация ДНК.** Использовали метод стандартной и мультиплексной ПЦР. Из литературных источников было отобрано 22 пары праймеров (табл. 2). Все праймеры синтезированы компанией «Синтол» (Россия).

ПЦР проводилась в объеме 25  $\mu$ л, включая 1  $\times$  ПЦР буфер Б, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM каждого dNTP, 0,3  $\mu$ M каждого праймера, 1,5 единиц SynTaq ДНК-полимеразы («Синтол», Россия) и 3  $\mu$ л ДНК. Первоначально ПЦР выполняли при условиях, описанных в литературных источниках (табл. 2), на амплификаторе BioRad C1000 Touch («BioRad», США). Для некоторых праймеров изменяли T<sub>отж</sub>, чтобы освободиться от неспецифических продуктов амплификации.

Продукты амплификации разделяли в 1,7 %-м агарозном геле в 0,5  $\times$  TBE-буфере. Полученные гели окрашивали раствором бромистого этидия и фотографировали с помощью системы гель-документации «ChemIDoc XRS+» («BioRad», США). Размеры амплифицированных фрагментов определяли в сравнении с маркером молекулярных масс GeneRuler100 bp Plus DNA Ladder («Thermo scientific»).

**Секвенирование продуктов амплификации,** полученных с праймерами Orf138-F2 и OrfB-R1, P11 и P12, P21 и P22, P21 и P32, пар-5 и пар-3, TRNAFM-F и TRNAFM-R, TRNAFM-F и Orf138-R, проводили в научно-производственной компании «Синтол» (Москва, Россия). Для этого фрагменты геля с характерными видимыми полосами вырезали, ДНК из них элюировали, очищали и использовали в качестве матрицы для реамплификации. Нуклеотидные

последовательности определяли на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130XL» («Applied Biosystems Inc.», США). Сравнительный анализ и поиск гомологичных последовательностей проводили по базе NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

## Результаты и обсуждение

Для внутреннего контроля присутствия в суммарных препаратах ДНК митохондриальной ДНК использовали пару праймеров – *atp9-5'* и *atp9-3'*. Эти праймеры являются специфичными для гена *atp9*, который присутствует в митохондриальном геноме у всех видов растений семейства Brassicaceae (Motegi et al., 2003). Ампликоны размером 200 п. н. присутствовали во всех образцах, подтверждая наличие мтДНК в суммарных препаратах ДНК.

### Тип цитоплазмы *Ogura*

Для идентификации цитоплазмы типа *Ogura* использовали 13 пар праймеров (табл. 2). Маркерные фрагменты присутствовали у стерильных образцов капусты белокочанной, брокколи, капусты пекинской, капусты китайской, редиса и стерильного образца дайкона (используется в скрещиваниях в качестве донора стерильности *Ogura*). Необходимо отметить, что у фертильных образцов редиса гибридного происхождения, полученных при скрещивании со стерильными материнскими формами, маркерные фрагменты цитоплазмы *Ogura* амплифицировались с такой же интенсивностью, как и у стерильных образцов. Это свидетельствует о наличии у образцов цитоплазмы *Ogura* (табл. 1), однако отсутствие внешнего проявления стерильности обусловлено присутствием в ядерном геноме генов-восстановителей фертильности (*Rf*), которые достаточно часто встречаются у сортов европейского подвида редиса.

В основной конфигурации митохондриального генома *orf138* локализован между генами *tRNAFM* и *orfB* (Bellaoui et al., 1998). В связи с этим мы включили в исследование и протестировали праймеры, амплифицирующие данные участки мтДНК. Праймеры TRNAFM-F и TRNAFM-R амплифицируют фрагмент 398 п. н. локуса гена *tRNAFM*, а праймеры *orfBF* и *orfBR*, *orfBF'* и *orfBR*<sub>2</sub>, P<sub>6</sub><sup>+</sup>(*orfB*) и P<sub>6</sub><sup>-</sup>(*orfB*) амплифицируют участок митохондриального генома, несущего ген *orfB* (*atp8*). У всех исследуемых образцов амплификация с праймерами *orfBF* и *orfBR* прошла с одинаковой интенсивностью, соответственно, этот ген присутствует и в фертильных, и в стерильных растениях. При амплификации с парой праймеров *orfBF'* и *orfBR*<sub>2</sub> продукт 520 п. н. не обнаружен, однако выявлены различия между образцами, относящимися к разным родам. У всех образцов рода *Brassica* (фертильных и стерильных) выявлялся фрагмент размером около 400 п. н., отсутствующий у всех образцов рода *Raphanus*.

В литературе опубликована пара праймеров P<sub>6</sub><sup>+</sup>(*orfB*) и P<sub>6</sub><sup>-</sup>(*orfB*), амплифицирующих участок мтДНК гена *orfB*, различающийся по размеру у стерильных растений капусты цветной (фрагмент размером 300 п. н.) и у линии-закрепителя стерильности НКС-В (фрагмент размером 600 п. н.) (Wang et al., 2006). Маркерный фрагмент 300 п. н. присутствовал у тестируемых образцов с цитоплазмой *Ogura*, однако фрагмент размером 600 п. н.

**Таблица 1.** Идентифицированный тип цитоплазмы образцов семейства *Brassicaceae* Burnett

Латинское название	№	Название образца	Происхождение	Кол-во растений		Диагностированный тип цитоплазмы
				S	F	
<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>Capitata</i> (L.) Alef. var. <i>capitata</i> L. f. <i>alba</i> DC	1	Слава 1305	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>ole</i>
	2	Амагер 611	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>ole</i>
	3	Стахановка 1513	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>ole</i>
	4	Парус	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>ole</i>
	5	Tekila F1	к/о, Syngenta	2	0	<i>Ogura, orf138/orf125*</i>
	6	S-1	с/о, ВНИИССОК	3	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	7	s-4	с/о, ВНИИССОК	3	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	8	s-10	с/о, ВНИИССОК	3	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	9	182-13	г/к, ВНИИССОК	3	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	10	241-13	г/к, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	11	261-1	г/к, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	12	51-10	г/к, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	13	323-10	г/к, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	14	30-13	г/к, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
<i>B. oleracea</i> L. convar. <i>botrytis</i> (L.) Alef. var. <i>italica</i> Plenck.	15	Тонус	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>ole</i>
	16	1703-2	с/о, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	17	1707-1	с/о, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
<i>B. rapa</i> L. ssp. <i>chinensis</i> (L.) Hanelt	18	1709-1	с/о, ВНИИССОК	1	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	19	Ласточка	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>cam</i>
	20	Веснянка	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>cam</i>
<i>B. rapa</i> L. em Metzg. ssp. <i>pekinensis</i> (Lour.) Hanelt	21	4-13	с/о, ВНИИССОК	3	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	22	Хибинская	к/о, ГНУ ВИР	0	сум	<i>cam</i>
	23	9-07	с/о, ВНИИССОК	3	0	<i>Ogu-NWSUAF, orf138-тип A, orf222</i>
<i>B. juncea</i> (L.) Czern.	24	Волнушка	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>cam</i>
	25	Прима	к/о, ГНУ ВИР	0	сум	<i>cam</i>
<i>B. napus</i> ssp. <i>Oleifera</i> Metzg. f. <i>annua</i>	26	к-4512 Tira MS	к/о, ГНУ ВИР	0	5	<i>napus, orf222</i>
	27	BC1 (Regent A×V 36-13)	к/о, ГНУ ВИР	1	4	F – <i>napus, orf222</i> S – <i>polima, orf224</i>
	28	к-5099 Line Rf	к/о, ГНУ ВИР	0	5	<i>polima, orf224</i>
<i>R. sativus</i> L. ssp. <i>acanthiformis</i> (Morel) Stankev	29	MS-Gensuke	к/о, Япония	4	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	30	Ushiki-Gensuke	к/о, Япония	0	4	<i>rad</i>
<i>R. sativus</i> L. convar. <i>radicula</i> (Pers.) Sazonova	31	Ария	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>rad</i>
	32	Фея	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>rad</i>
	33	Моховский	сорт ВНИИССОК	0	сум	<i>rad</i>
	34	Donar F1	к/о, Syngenta	3	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	35	Tarzan F1	к/о, Enza Zaden	3	0	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	36	118-10	г/к, ВНИИССОК	3	3	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	37	145-10	г/к, ВНИИССОК	2	2	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	38	486-11	г/к, ВНИИССОК	3	3	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	39	444-13	г/к, ВНИИССОК	2	2	<i>Ogura, orf138-тип A</i>
	40	D-68-13	г/к, ВНИИССОК	2	2	<i>Ogura, orf138-тип A</i>

S – стерильные растения, F – фертильные растения, с/о – селекционный образец, г/к – гибридная комбинация, к/о – коллекционный образец, сум – суммарный препарат ДНК, *orf138/orf125\** – новый аллельный вариант.

**Таблица 2.** Тестируемые праймеры

Название праймера	T <sub>отж</sub> (°C)/T <sub>отж</sub> (°C)	Размер ампликона	Тип цитоплазмы	Литературный источник
138Xba 138Eco	60	~ 300	<i>Ogura</i>	Yamagishi, Glimelius, 2003
Orf138-F1 Orf138-R	58	512	<i>Ogura</i>	Giancola et al., 2007
Orf138-F2 OrfB-R1	51/58*	788	<i>Ogura</i>	Giancola et al., 2007
ogu-5' ogu-3'	52/60*	600	<i>Ogura</i>	Motegi et al., 2003
orf138-5' orf138-3'	60	517	<i>Ogura</i>	Motegi et al., 2003
Og-1 Og-2	46/58*	~ 520	<i>Ogura</i>	Карлов, 2010
F R	57	780	<i>Ogura</i>	Niemela et al., 2010
P11 P12	54	465	<i>Ogura</i>	Zhao et al., 2010
orfBF orfBR	58	~ 1 000	<i>Ogura</i>	Yamagishi, Glimelius, 2003
orfBF' orfBR2	52/55*	520	<i>Ogura</i>	Giancola et al., 2007
P <sub>6</sub> <sup>+</sup> (orfB) P <sub>6</sub> <sup>-</sup> (orfB)	53/55*	300-s 600-m	<i>Ogura</i>	Wang et al., 2006
TRNAFM-F TRNAFM-R	54	398	<i>Ogura</i>	Giancola et al., 2007
TRNAFM-F Orf138-R	54	800	<i>Ogura</i>	Giancola et al., 2007
nap-5 nap-3	52/60*	500	<i>napus</i>	Motegi et al., 2003
P21 P22	54	1,102	<i>napus</i>	Zhao et al., 2010; Wei et al., 2005
pol-5' pol-3'	52/55*	550	<i>polima</i>	Motegi et al., 2003
Orf224f Orf224r	60/58*	600	<i>polima</i>	Wang et al., 2006
P21 P32	54	747	<i>polima</i>	Zhao et al., 2010; Wei et al., 2005
rad-5' rad-3'	60	500	Нормальный редис	Motegi et al., 2003
FATP6 RORF263	53	866 1 021-m	<i>tour/jun</i>	Dieterich, 2002
FORF263 RORF263	53	350	<i>tour/jun</i>	Dieterich, 2002
atp9-5' atp9-3'	60	200	Контроль мтДНК	Motegi et al., 2003

T<sub>отж</sub> – температура отжига; \* – подобранная нами температура отжига праймера; s – у стерильной формы; m – у закрепителя.

отсутствовал у закрепителя стерильности дайкона образца Ushiki-Gensuke.

Таким образом, из 13 протестированных пар праймеров только 11 можно рекомендовать для идентификации типа цитоплазмы *Ogura* у образцов семейства Brassicaceae,

выбирая наиболее удобную пару (по T<sub>отж</sub> и размеру амплифицированного фрагмента).

Как уже упоминалось, митохондриальный ген *orf138* известен как маркерный ген цитоплазмы типа *Ogura* и используется для характеристики этого типа ЦМС.

		20		40		60	
AB055435_orf138A	ATGATTACCT	TTTTCGAAAA	ATTGTCCTACT	TTTTGTCATA	ATCTCACTCC	TACTGAATGT	AAAGTTAGTG 70
Tekila_F1	ATGATTACCT	TTTTCGAAAA	ATTGTCCTACT	TTTTGTCATA	ATCTCACTCC	TACTGAATGT	AAAGTTAGTG 70
AB055440.1_orf138F	ATGATTACCT	TTTTCGAAAA	ATTGTCCTACT	TTTTGTCATA	ATCTCACTCC	TACTGAATGT	AAAGTTAGTG 70
		80		100		120	
AB055435_orf138A	TAATAAGTTT	CTTTCTTTTA	GCTTTT*TTTAC	TAATGGCCCA	TATTTGGCTA	AGCTGGTTTT	СТААСААССА 140
Tekila_F1	TAATAAGTTT	CTTTCTTTTA	GCTTTT*TTTAC	TAATGGCCCA	TATTTGGCTA	AGCTGGTTTT	СТААСААССА 140
AB055440.1_orf138F	TAATAAGTTT	CTTTCTTTTA	GCTTATTTGC	TAATGGCCCA	TATTTGGCTA	AGCTGGTTTT	СТААСААССА 140
		160		180		200	
AB055435_orf138A	ACATTGTTTA	CGAACCATGA	GACATCTAGA	GAAGTTAAAA	ATTCCATATG	AATTTTCAGTA	TGGGTGGCTA 210
Tekila_F1	ACATTGTTTA	CGAACCATGA	GACATCTAGA	GAAGTTAAAA	ATTCCATATG	AATTTTCAGTA	TGGGTGGCTA 210
AB055440.1_orf138F	ACATTGTTTA	CGAACCATGA	GACATCTAGA	GAAGTTAAAA	ATTCCATATG	AATTTTCAGTA	TGGGTGGCTA 210
		220		240		260	
AB055435_orf138A	GGTGTCAAAA	TTACAATAAA	ATCAAAATGTA	CCTAACGATG	AAGTGACGAA	AAAAGTCTCA	CCTATCATTА 280
Tekila_F1	GGTGTCAAAA	TTACAATAAA	ATCAAAATGTA	CCTAACGATG	AAGTGACGAA	AAAAGTCTCA	CCTATCATTА 280
AB055440.1_orf138F	GGTGTCAAAA	TTACAATAAA	ATCAAAATGTA	CCTAACGATG	AAGTGACGAA	AAAAGTCTCA	CCTATCATTА 280
		300		320		340	
AB055435_orf138A	AAGGGGAAAT	AGAGGGGAAA	GAGGAAAAAA	AAGAGGGGAA	AGGGGAAATA	GAGGGGAAAG	AGGAAAAAAA 350
Tekila_F1	AAGGGGAAAT	AGAGGGGAAA	GAGGAAAAAA	AAGAGGGGAA	AGGGGAAATA	GAGGGGAAAG	AGGAAAAAAA 350
AB055440.1_orf138F	AAGGGGAAAT	AGAGGGGAAA	GAGGAAAAAA	AAGAGGGGAA	AGGGGAAATA	GAGGGGAAAG	AGGAAAAAAA 350
		360		380		400	
AB055435_orf138A	AGAGGGGAAA	GGGGAAATAG	AGGGGAAAGA	GGAAAAAAA	GAGGTGGAAA	ATGGACCGAG	AAAATAA 417
Tekila_F1	AGAGG ëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ATGGACCGAG	AAAATAA 378
AB055440.1_orf138F	AGAGG ëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ëëëëëëëëëëë	ATGGACCGAG	AAAATAA 378

Рис. 1. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена *orf138*-тип А (AB055435 база данных NCBI) и *orf138*-тип F (AB055440.1 база данных NCBI) с образцом капусты белокочанной F1 Текила. Позиции нуклеотидов 95 и 99 отмечены звездочками.

Ранее было выделено 9 типов гена *orf138*, обозначаемых от А до I (англ.) у образцов *R. sativus* (Yamagishi, Terachi, 2001). Нами была произведена расшифровка последовательности продуктов размером 788 п. н. (полученных с праймерами Orf138-F2 и OrfB-R1), 465 п. н. (полученных с праймерами P11 и P12) у стерильных образцов редиса, дайкона, капусты белокочанной, брокколи, капусты пекинской, которая подтвердила наличие в них участка 417 п. н. на 100 % гомологичного с митохондриальным геном *orf138*-тип А (база данных NCBI [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov)). Несмотря на то, что имеющиеся в нашей коллекции образцы имели стерильность разного происхождения (обнаруженная спонтанно в популяции – образцы 6, 7, 8, 21, 23; переданная в результате скрещиваний между разновидностями – образцы 16, 17, 18, 36, 37, 38 и внутривидовых скрещиваний – образцы 9, 10, 11, 12, 13, 14, 39, 40, а также коллекционных образцов зарубежной селекции – образцы 29, 34, 35), у всех исследованных стерильных образцов эта последовательность была абсолютно идентичной, за исключением образца № 5 капусты белокочанной F1 Текила. У этого образца данная нуклеотидная последовательность имела делецию в 39 п. н. Близкий к этому типу тип стерильности *Kosena* (*kos*CMS) имеет митохондриальный ген *orf125*, являющийся аналогом *orf138*-тип F с делецией в 39 п. н., однако у образца капусты белокочанной F1 Текила был *orf138*-тип А, но с делецией в 39 п. н., т. е. было отличие по двум нуклеотидам в 95-й и 99-й позиции (рис. 1). Это можно рассматривать как новый аллельный вариант гена *orf138*.

#### Тип цитоплазмы *Napus* (*nap*)

Для идентификации цитоплазмы типа *Napus* использовали две пары праймеров, пар-5 и пар-3, а также P21 и P22. При амплификации ДНК с парой праймеров, пар-5 и пар-3,

которая является специфичной для митохондриального гена *atp6* при *nap*-ЦМС (*B. napus*) типе цитоплазмы (Motegi et al., 2003) во всех образцах (как стерильных, так и фертильных), относящихся к роду *Brassica*, синтезировался описанный фрагмент размером около 550 п. н. У образцов, относящихся к *R. sativus*, данный фрагмент отсутствовал. Поскольку фрагмент 550 п. н. обнаруживался как у стерильных, так и фертильных образцов рода *Brassica*, то он не может рассматриваться как достоверный при определении типа стерильности, что согласуется с данными, полученными Г.И. Карловым (2010), и его можно рассматривать только как родоспецифичный маркер.

Пара праймеров P21 и P22 является специфичной для гена *orf222* (Wei et al., 2005). Маркерный фрагмент размером 1 102 п. н. был обнаружен у стерильных растений капусты пекинской образца № 23, у всех растений рапса образца № 26 и у всех фертильных растений рапса образца № 27. У всех остальных тестируемых образцов наблюдался фрагмент размером 500 п. н., присутствующий при типах *ogu*-ЦМС, *pol*-ЦМС, *cam*-, *ole*- и *rad*-цитоплазме. Для дифференцировки всех этих типов необходимо использовать еще дополнительные маркеры.

Произведенная расшифровка продукта размером 1 102 п. н., полученного с праймерами P21 и P22, подтвердила присутствие *orf222* в изученных стерильных растениях капусты пекинской образца № 23, растениях рапса образца № 26 и у фертильных растений рапса образца № 27.

Отметим также, что поскольку у капусты пекинской образца № 23 в митохондриальном геноме присутствует сразу два митохондриальных гена, *orf138* и *orf222*, то это будет соответствовать типу стерильности *Ogu-NWSUAF*, а тип цитоплазмы *nap* был идентифицирован лишь у образца рапса № 26 и у фертильных растений образца № 27 (табл. 1).

### Тип цитоплазмы *Polima*

Для идентификации цитоплазмы типа *Polima* использовали три пары праймеров: *pol-5'* и *pol-3'*, *Orf224f* и *Orf224r*, *P21* и *P32*.

При описанных в литературе условиях амплификации для пары праймеров *pol-5'* и *pol-3'*, которая является специфичной для митохондриального гена *atp6* при *pol*-ЦМС типе цитоплазмы (Motegi et al., 2003), фрагмент ДНК размером 550 п. н. амплифицировался только у стерильного растения образца рапса № 27 и у всех растений образца рапса № 28. Соответственно, изучаемые растения имеют тип цитоплазмы *Polima*. Отсутствие внешнего проявления стерильности у растений рапса образца № 28 объясняется присутствием в их ядерном геноме генов-восстановителей фертильности *RfpRfp*, а присутствие фертильных растений у рапса образца № 27 (ранее мы у них диагностировали тип цитоплазмы *napus*), возможно, связано с невыравненностью образца и загрязнением селекционного материала. У всех остальных образцов, относящихся к роду *Brassica*, с этой парой праймеров амплифицировался минорный фрагмент размером 600 п. н.

Праймеры *P21* и *P32*, которые являются специфичными для гена *orf224*, обуславливающего *Polima*-ЦМС (Wei et al., 2005; Wang et al., 2006), амплифицировали фрагмент 747 п. н. у тех же образцов, что и праймеры *pol-5'* и *pol-3'*, подтверждая тип цитоплазмы *Polima*.

Не было обнаружено продуктов при амплификации ДНК всех исследуемых растений с праймерами *Orf224f* и *Orf224r* при температуре отжига 60 °С, однако при температуре 58 °С у всех образцов, относящихся к роду *Brassica*, с этой парой праймеров амплифицировался фрагмент размером 600 п. н. То есть использование данной пары праймеров для диагностики типа цитоплазмы *Polima* невозможно.

В соответствии с расшифровкой нуклеотидной последовательности фрагмента, полученного с праймерами *P21* и *P32* размером 747 п. н., был выявлен участок размером 675 п. н., полностью гомологичный *orf224* (GenBank accession number for *orf224 Polima CMS EU254235*), что подтвердило тип цитоплазмы *Polima* у растений рапса образца № 28 и стерильного растения рапса образца № 27.

### Тип цитоплазмы *tour*

Праймеры *FORF263* и *RORF263*, *FATP6* и *RORF263* были сконструированы на основе опубликованной в базе данных последовательности *orf263* и использовались при изучении различных типов стерильной цитоплазмы у *B. napus* (Dieterich, 2002). Несмотря на то что в нашей коллекции не было стерильных растений горчицы, для которых мог быть характерен тип стерильности цитоплазмы *tour*, мы протестировали эти праймеры на наших образцах, куда включили и два сорта горчицы сарептской. Фрагмент размером 350 п. н. присутствовал у всех образцов, а фрагмент 866 п. н. обнаруживался только у фертильных образцов рода *Raphanus*. Фрагмент 1021 п. н., характерный для закрепителя стерильности при типе ЦМС *tour* (Dieterich, 2002), у образцов отсутствовал. Данные праймеры оказались неинформативными для диагностики типа цитоплазмы.

### Тип цитоплазмы *rad*

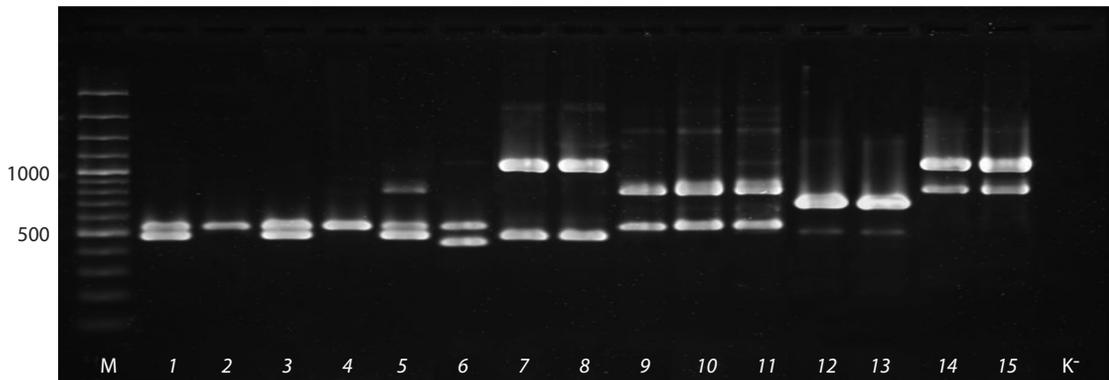
Для ПЦР-анализа на тип цитоплазмы *rad* нормального редиса использовали пару праймеров *rad-5'* и *rad-3'* (Motegi et al., 2003). Известно, что тип ЦМС *Ogura* был передан культурным видам рода *Brassica* и европейскому редису от дайкона. У стерильных образцов с ЦМС *Ogura* рода *Raphanus* было обнаружено отличие по генам мтДНК от образцов с нормальным типом цитоплазмы, выявляемое праймерами *rad-5'* и *rad-3'* (Motegi et al., 2003). У образцов с нормальным типом цитоплазмы обнаруживался фрагмент размером 500 п. н., отсутствующий у стерильных образцов с ЦМС *Ogura*. В нашем эксперименте данный фрагмент присутствовал у фертильного образца дайкона (закрепителя стерильности) и отсутствовал у стерильного. У образцов редиса такой четкой закономерности не наблюдалось, так как у некоторых стерильных образцов данный фрагмент также обнаруживался. У фертильных и стерильных образцов, относящихся к роду *Brassica*, данного фрагмента обнаружено не было. Этот маркер оказался родоспецифичным для образцов *Raphanus*.

### Тип цитоплазмы *ole*

Этот тип цитоплазмы характерен для фертильных растений, относящихся к *B. oleraceae*. Нам не удалось найти в литературе специфических праймеров на тип цитоплазмы *ole*. Однако его наличие можно предположить у тех фертильных образцов (табл. 1), у которых будут отсутствовать маркеры на типы цитоплазмы *Ogura*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad/rap* и будут присутствовать описанные нами родоспецифичные для *Brassica* маркеры с праймерами *par-5* и *par-3* (550 п. н.), *pol-5'* и *pol-3'* (600 п. н.), *Orf224f* и *Orf224r* (600 п. н.).

### Мультиплексная ПЦР

В 2010 г. Zhao с коллегами предложили способ идентификации типа цитоплазмы у образцов рапса с использованием мультиплексной ПЦР. Этот метод позволял идентифицировать у *B. napus* сразу 5 типов цитоплазмы: *Ogura*, *Ogu-NWSUAF*, *Nap*, *Pol*, *Cam*. Комбинация продуктов, полученных с использованием одновременно трех пар праймеров (*P11* и *P12*, *P21* и *P22*, *P21* и *P32*) размером 465 и 500 п. н., была специфична для образцов с типом цитоплазмы *Ogura*, 747 и 500 п. н. – для типа цитоплазмы *Polima*, 1102 и 800 п. н. – для типа цитоплазмы *Napus*, 800 и 500 п. н. – для типа цитоплазмы *Cam*, а 465 и 1102 п. н. – для типа *Ogu-NWSUAF* (Zhao et al., 2010). При использовании мультиплексной ПЦР был идентифицирован тип стерильности *Ogura* ЦМС у стерильных образцов капусты белокочанной, капусты китайской, дайкона, редиса и тип ЦМС *Ogura-NWSUAF* – у стерильного образца № 9-07 капусты пекинской (рис. 2). У фертильных образцов капусты пекинской, капусты китайской, горчицы был определен тип цитоплазмы *cam*. У фертильных образцов рапса № 26 и 27 был тип цитоплазмы *nap*, а у рапса № 28 и стерильного растения образца рапса № 27 был диагностирован тип цитоплазмы *pol*. Эти данные подтвердили идентифицированные ранее типы у образцов с использованием стандартной ПЦР и позволили выделить образцы с типом цитоплазмы *cam* (табл. 1). Таким образом, ранее разработанная для рапса мультиплексная



**Рис. 2.** Мультиплексная ПЦР. Образцы: 1 – MS-Gensuke; 2 – Ushiki-Gensuke; 3 – Donar F1; 4 – Ariya; 5 – 4-13; 6 – Tekila F1; 7 – 9-07; 8 – 9-07; 9 – Khibinskaya; 10 – Lastochka; 11 – Volnushka; 12 – BC1 (Regent A×V 36-13)-sterile; 13 – κ-5099 Line Rf; 14 – BC1 (Regent A×V 36-13)-fertile; 15 – κ-4512 Tira (MS); K<sup>-</sup> – отрицательный контроль.

ПЦР подходит для диагностики типа цитоплазмы и для других видов семейства Капустные.

В результате проведенной работы у тестируемых образцов семейства Brassicaceae были определены 7 различных типов цитоплазмы: *Ogura*, *Ogura-NWSUAF*, *nap*, *pol*, *cam*, *rad/rap*, *ole*. Расшифровка нуклеотидной последовательности продуктов, полученных с праймерами Orf138-F2 и OrfB-R1 и P11 и P12, показала, что у всех стерильных образцов с типом ЦМС *Ogura* в мтДНК присутствовал фрагмент 417 п. н., соответствующий гену *orf138*-тип А, за исключением образца капусты белокочанной F1 Tekila, у которого имелась делеция в 39 п. н. Этот тип гена *orf138* ранее не был описан в литературе, поскольку делеция в 39 п. н. наблюдалась при типе стерильности *Kosena* (*kos* CMS), а ассоциированный с ним митохондриальный ген *orf125* (или *orf138*-тип F) являлся аналогом *orf138*-тип С, а не *orf138*-тип А, как в расшифрованной новой последовательности, т. е. имеется отличие по двум нуклеотидам: А→Т по 95-й позиции и G→А по 99-й позиции. Создание новых стерильных линий на основе этого типа цитоплазмы представляет селекционный интерес также и потому, что образец капусты белокочанной F1 Tekila является еще и донором устойчивости к киле *Plasmodiophora brassicae* Wogonin. У стерильного образца капусты пекинской выявлен тип цитоплазмы *Ogura-NWSUAF*, который характеризуется присутствием в мтДНК одновременно двух химерных генов – *orf138* и *orf222*. Использование этого типа цитоплазмы и передача его посредством межвидовой и внутривидовой гибридизации другим видам и разновидностям позволят обогатить генетический потенциал источников для создания гибридов. Необходимо вовлекать в селекционный процесс образцы с различными типами цитоплазмы, так как известно, что создание гибридов на основе только одного типа стерильности может приводить к снижению устойчивости к болезням и вредителям и, как следствие, – к снижению урожайности (Aldrich et al., 1977; Liu et al., 2012).

Анализ полученных результатов, а также данных, опубликованных другими исследователями, свидетельствует о сложной природе наследования и проявления признака ЦМС и о целесообразности дальнейших исследований по

разработке современных методов на основе ПЦР, которые позволят помочь селекционерам проводить качественный отбор селекционного материала для создания гибридов на основе ЦМС. Для первоначального скрининга имеющегося селекционного материала капустных культур мы предлагаем использовать метод мультиплексной ПЦР. Далее для подтверждения определенного типа цитоплазмы можно проводить стандартную ПЦР с одной парой праймеров на обнаруженный тип цитоплазмы с последующей расшифровкой маркерного фрагмента для более точного определения подтипа. Кроме определения типа цитоплазмы, необходимы молекулярные маркеры для идентификации ядерных генов-восстановителей фертильности (*Rf*), в этом случае удастся создать эффективную схему отбора стерильных линий, линии-закрепителя стерильности и линии-восстановителя фертильности на основе ПЦР для капустных культур.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Бунин М.С. Новые овощные культуры России. М.: Росинформ-агротех, 2002.
- Карлов Г.И. Молекулярно-генетические и молекулярно-цитогенетические подходы для ускоренного создания селекционного материала растений с заданными свойствами: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2010.
- Aldrich H.C., Gracen V.E., York D., Earle E.D., Yoder O.C. Ultrastructural effects of Helminthosporium maydis race T toxin on mitochondria of corn roots and protoplasts. Tissue Cell. 1977;9(1):167-177.
- Bannerot H., Bouldard Y., Temp J. Transfer of cytoplasmic male sterility from *Raphanus sativus* to Brassica oleraceae. Proc. EUCARPIA Meeting Cruciferae. Dundee, 1974.
- Bellaoui M., Martin-Canadell A., Pelletier G., Budar F. Low-copy number molecules are produced by recombination, actively maintained and can be amplified in the mitochondrial genome of Brassicaceae: relationship to reversion of the male sterile phenotype in some cybrids. Mol. Gen. Genet. 1998;257:177-185.
- Bonnet A. Breeding in France of a radish hybrid obtained by use of cytoplasmic male sterility. Eucarpia Cruciferae Newslett. 1977;2:5-6.
- Dieterich J.-H. Mitochondriale genom- und expressionsanalysen zur charakterisierung der CMS-systeme tournefortii, juncea und toku-

- masu des raps (*Brassica napus* L.). Dissertation Universität Hannover, 2002.
- Fu T.D. Production and research on rapeseed in the Peoples Republic in China. *Cruciferae Newslett.* 1981;6:6-7.
- Giancola S., Rao Y., Chaillou S., Hiard S., Martin-Canadell A., Pelletier G., Budar F. Cytoplasmic suppression of Ogura cytoplasmic male sterility in European natural populations of *Raphanus raphanistrum*. *Theor. Appl. Genet.* 2007;114(8):1333-1343.
- Hu B. Sterility and variation resulting from the transfer of polima cytoplasmic male sterility from *Brassica napus* into *Brassica chinensis*. *J. Agricult. Sci.* 1997;128:299-301.
- Heyn F.W. Transfer of restorer genes from *Raphanus* to cytoplasmic male sterile *Brassica napus*. *Cruciferae Newslett.* 1976;1:15-16.
- L'Homme Y., Stahl R.J., Li X.-Q., Hameed A., Brown G.G. *Brassica napus* cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the polCMS associated orf224 gene. *Curr. Genet.* 1997;31:325-335.
- Landgren M., Zetterstrand M., Sundberg E., Glimelius K. Alloplasmic male-sterile *Brassica* lines containing *B. tournefortii* mitochondria express an ORF 3' of the *atp6* gene and a 32 kDa protein. *Plant Mol. Biol.* 1996;32:879-890.
- Liu Z., Liu P., Long F., Hong D., He Q., Yang G. Fine mapping and candidate gene analysis of the nuclear restorer gene Rfp for pol CMS in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2012;125:773-779.
- Li D. Preliminary report on breeding of male sterile, maintainer and restorer lines in *Brassica napus* L. Shaanxi J. Agricultural Sci. 1980; 1:26-29.
- Motegi T., Nou I.S., Zhou J., Kanno A., Kameya T., Hirata Y. Obtaining an Ogura-type CMS line from asymmetrical protoplast fusion between cabbage (fertile) and radish (fertile). *Euphytica.* 2003;129:319-323.
- Niemela T., Jauhiainen S.L., Tulisalo U. Transfer of the Kosena Rfk1 gene, required in hybrid seed production, from oilseed rape to turnip rape. *Euphytica.* 2010;175:1-12.
- Ogura H. Studies on the new male-sterility in Japanese radish, with special reference to the utilization of this sterility towards the practical raising of hybrid seeds. *Mem. Fac. Agric. Kagoshima Univ.* 1968;6:39-78.
- Pradhan A., Mukhopadhyay A., Pental D. Identification of the putative cytoplasmic donor of a CMS system in *Brassica juncea*. *Plant Breeding.* 1991;106:204-208.
- Pelletier G., Primard C., Vedel F., Chetrit P., Remy R., Rouselle P., Renard M. Intergeneric cytoplasmic hybridization in Cruciferae by protoplast fusion. *Mol. Gen. Genet.* 1983;191:244-250.
- Rawat D.S., Anand I.J. Male sterility in Indian mustard. *Indian J. Genet. Plant Breeding.* 1979;39:412-414.
- Sakai T., Imamura J. Somatic Hybridization Between Radish (*Raphanus sativus*) and Rapeseed (*Brassica napus*). *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Hybridization in Crop Improvement I.* Ed. Y.P.S. Dajaj. Berlin Heidelberg, 1994;27:320-333.
- Shiga T. Male sterility and cytoplasmic differentiation. *Brassica Crops and Wild Allies-Biology and Breeding.* Tokyo: Jap. Sci. Soc. Press, 1980.
- Shiga T., Baba S. Cytoplasmic male sterility in oilseed rape, *B. napus* L. and its utilization to breeding. *Jap. J. Breed.* 1973;23:187-197.
- Tanaka Y., Tsuda M., Yasumoto K., Yamagishi H., Terachi T. A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics.* 2012;13:352-352. DOI: 10.1186/1471-2164-13-352
- Thompson K.F. Cytoplasmic male sterility in oilseed rape. *Heredity.* 1972;29:253-257.
- Wang C., Chen X., Lan T., Li H., Song W. Cloning and transcript analyses of the chimeric gene associated with cytoplasmic male sterility in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*). *Euphytica.* 2006;151:111-119.
- Wang Y., Ma S., Wang M., Zheng X., Gu M., Hu S. sequence analysis of the gene correlated with cytoplasmic male sterility (CMS) in rapeseed (*Brassica napus*) Polima and Shaan 2A. *Chin. Sci. Bull.* 2002;47(2):124-128.
- Wei W.L., Wang H.Z., Liu G.H. Molecular identification of the sterile cytoplasm of NCa of a cytoplasmic male sterile line in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Sci. Agric. Sin.* 2005;38:1965-1972.
- Yamagishi H., Bhat S.R. Cytoplasmic male sterility in Brassicaceae crops. *Breeding Sci.* 2014;64:38-47. DOI: 10.1270/jsbbs.64.38
- Yamagishi H., Glimelius K. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*). *Plant Cell Rep.* 2003;22:52-58.
- Yamagishi H., Terachi T. Intra-and inter-specific variations in the mitochondrial gene orf138 of Ogura-type male sterile cytoplasm from *Raphanus sativus* and *Raphanus raphanistrum*. *Theor. Appl. Genet.* 2001;103:725-732.
- Yang G.S., Fu T.D., Yang X.N. Studies on the ecotypical male sterile line of *Brassica napus* L. *Acta Agronomica Sinica.* 1995;21(2): 129-135.
- Yarrow S.A., Burnett L.A., Wildeman R.P., Kemble R.J. The transfer of «Polima» cytoplasmic male sterility from oilseed rape (*Brassica napus*) to broccoli (*B. oleracea*) by protoplast fusion. *Plant Cell Rep.* 1990;9:185-188.
- Zhao H.X., Li Z.J., Hu S.W., Sun G.L., Chang J.J., Zhang Z.H. Identification of cytoplasm types in rapeseed (*Brassica napus* L.) accessions by multiplex PCR assay. *Theor. Appl. Genet.* 2010;121:643-650.