

О.О. ОВЧАРЕНКО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ,
М.М. ЧЕРЕП, Ю.Ю. ГЛЕБА, М.В. КУЧУК

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ

**ОТРИМАННЯ І АНАЛІЗ
СОМАТИЧНИХ ГІБРИДІВ
BRASSICA NAPUS + ARABIDOPSIS
THALIANA, ЩО МІСТЯТЬ
ГЕТЕРОЛОГІЧНУ СИСТЕМУ
ТРАНСПОЗОНІВ КУКУРУДЗИ
*Spm/dSpm***



В результаті міжтрибної соматичної гібридизації Brassica napus і трансгенного Arabidopsis thaliana були отримані функціонально асиметричні гібридні рослини, які містили гетерологічну систему транспозонів Spm/dSpm. Мобільні генетичні елементи активно транспозувались в геномі гібридів. Повної елімінації геному A. thaliana не спостерігали.

© О.О. ОВЧАРЕНКО, І.К. КОМАРНИЦЬКИЙ,
М.М. ЧЕРЕП, Ю.Ю. ГЛЕБА, М.В. КУЧУК, 2005

Вступ. Мобільні генетичні елементи рослин широко використовували в генетичних та генно-інженерних дослідженнях для мічення та клонування генів [1–3], створення серій трансгенних ліній з різним геномним розташуванням трансгенів [4], отримання безмаркерних трансгенних рослин, що не несуть генів стійкості до антибіотиків [5, 6]. Раніше було показано, що в межах одного геному є можливою транспозиція мобільного елемента з однієї хромосоми на іншу [7]. Однак транспозиція мобільних елементів між різними геномами досі ще не виявлена. Для дослідження цього процесу необхідно створити гібриди, які містять хромосоми двох чи більше видів, один з яких буде донором транспозона. Для виду, який буде використаний як донор мобільного елемента, повинна існувати надійна система генетичної трансформації.

Представник родини *Brassicaceae* триби *Sisymbrieae Arabidopsis thaliana* L. є модельним об'єктом для генетичних досліджень, одним з двох видів рослин, чий геном секвеновано. Рослини цього виду легко трансформувати як *in vitro*, так і *in vivo*. Статева гібридизація між *A. thaliana* та представниками триби *Brassicae*, до якої належить більшість культивованих видів, не була успішною через значну філогенетичну віддаленість між ними. В той же час існує ряд повідомлень про успішну соматичну гібридизацію. Так, на сьогодні є повідомлення про отримання соматичних гібридів *A. thaliana* з *Brassica campestris* [8], *B. nigra* [9], *B. oleracea* [10], *B. napus* [11–13], *B. juncea* [14], *Raphanus sativus* [15]. В роботах Глеби [8] та Yamagishi [15] при соматичній гібридизації культурних видів триби *Brassicaceae* з *A. thaliana* спостерігали часткову елімінацію батьківських хромосом у ряду гібридних клонів. Тому використання методів соматичної гібридизації може бути корисним при створенні систем, придатних для вивчення міжгеномних перемішень транспозонів. При віддаленій соматичній гібридизації можлива транспозиція мобільного елемента з одного геному на інший та наступна втрата хромосоми вида-донора з сайтом первинної інтеграції транспозона. Переміщення мобільного елемента можна буде простежити за збереженням в геномі реципієнта трансгена, оточеного послідовностями мобільного елемента і здатного до транспозиції, та за відсутністю інших трансгенів, які будуть залишатися в геномі виду-донора.

Метою нашого дослідження було отримати соматичні гібриди між *B. napus* і трансгенним *A. thaliana*, який ніс гетерологічну систему транспозонів *Spm/dSpm*, проаналізувати ядерний, пластидний і мітохондріальний геноми гібридів та перевірити у них активність мобільного генетичного елемента кукурудзи *Spm*.

Матеріали і методи. *Рослинний матеріал.* В роботі були використані вирощені *in vitro* рослини ярого ріпаку (*Brassica napus* L.) сортів Westar (отримані з двох різних джерел) та Калинівський. Насіння трансгенного *Arabidopsis thaliana* L., трансформованого плазмідом pIC401, було люб'язно надане фірмою Icon Genetics GmbH (Halle, Biozentrum, Germany). Схема плазмиди pIC401 наведена раніше [14]. Рослини культивували на середовищі B5 при температурі 25 °C, 16-годинному світловому фотоперіоді та освітленості 3000–4000 лк. Рослини ріпаку та отримані гібриди розмножували живцюванням.

Виділення протопластів та соматична гібридизація. Мезофільні протопласти виділяли з листків 28-денних рослин. Методика виділення, злиття протопластів та регенерації гібридних рослин наведена в нашій попередній роботі [14].

Гістохімічне виявлення активності гена GUS. Для виявлення активності гена GUS експланти рослин, що регенерували, аналізували за методикою Jefferson [16]. Наявність експресії продукту гена GUS визначали під біокулярним мікроскопом при збільшенні в 32 рази.

ПЛР-ПДРФ аналіз гібридних ліній. Тотальну

рослинну ДНК виділяли з рослинного матеріалу за методикою Cheung [17]. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили, використовуючи ряд праймерів (табл. 1), за методикою, прийнятою у нашій лабораторії [18].

Внутрішній транскрибований спейсер (ITS) ядерної рибосомної ДНК та ампліфікований фрагмент гена мітохондріальної НАД-дегідрогенази *ndh4* гідролізували рестрикційною ендонуклеазою *MvaI*. Спейсерний фрагмент між хлоропластними генами *atpB-rbcL* гідролізували рестрикційною ендонуклеазою *Clal*.

Аналіз множинних молекулярних форм ферментів. Для підтвердження гібридної природи отриманих рослин аналізували множинні молекулярні форми ферментів амілази та естерази за стандартною методикою [24].

Результати досліджень та їх обговорення. Отримані після злиття протопластів ріпаку та трансгенного арабідопсису мікроколонії були висіяні на селективне агаризоване поживне середовище з 10 мг/л фосфінотрицину. Умови культивування протопластів сприяли поділу клітин ріпаку та гібридів, але не *A. thaliana*. При культивуванні контрольних протопластів *A. thaliana* поділ клітин не було відзначено. Використання фосфінотрицину в летальній для клітин нетрансгенного ріпаку концентрації дозволяло з високою ймовірністю відібрати гібридні колонії. В результаті було відібрано 382 калуси в комбінації злиття *B. napus* cv. Westar + *A. thaliana* та 78 калусів в комбінації *B. napus* cv. Калинівський + *A. thaliana*, стійких

Таблиця 1

Праймери, використані при проведенні ПЛР-аналізів

Фрагмент, що синтезується	Праймери	Посилання
ITS	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' і 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	[19]
Мікросателітна ДНК	(TCC)×5	—
ДНК теломерних послідовностей	(TTTAGGG)×3	[20]
<i>gus</i>	5'-TGGGTGGACGATATCACCGTGGTGA-3' і 5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3'	[18]
<i>nptII</i>	5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' і 5'-CAAGCTCTTCAGCAATATCACG-3'	[21]
<i>bar</i>	5'-CCGTACCGAGCCGCGAGGAAC-3' і 5'-AGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3'	[18]
<i>SpmTPase</i>	5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3' і 5'-GCTTTTGGGTATGCAGCCTAGTTC-3'	[18]
<i>atpB-rbcL</i>	5'-GAAGTAGTAGGATTGATTCTC-3' і 5'-TACAGTTGTCCATGTACCAG-3'	[22]
<i>ndh4</i>	5'-CAGTGGGTTGGTCTGGTATG-3' і 5'-TCATATGGGCTACTGAGGAG-3'	[23]
IF-2r		

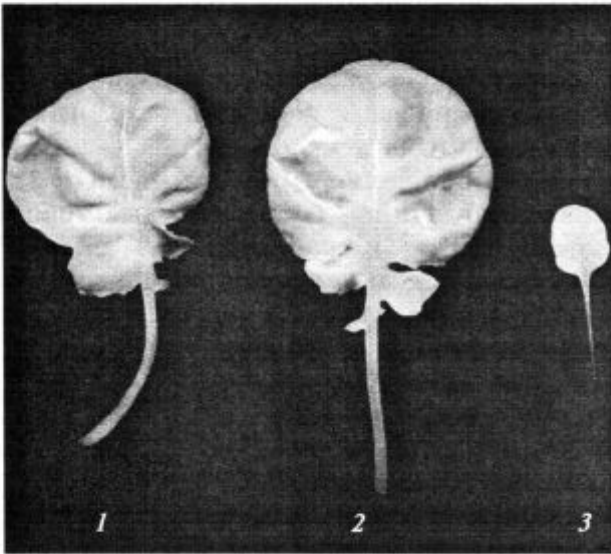


Рис. 1. Морфологія листків ріпаку сорту Westar (1), гібридної рослини (2) та *A. thaliana* (3)

до вказаної концентрації селективного агента. В подальшому з них вдалося регенерувати 34 пагони в першій комбінації та 8 пагонів — у другій.

В процесі культивування отриманих пагонів на безгормональному середовищі вони були здатні спонтанно укорінюватись. Форма листків отриманих рослин цілком була подібною до ріпаку (рис. 1). Регенеровані пагони мали прості нерозгалужені трихоми, як у *Brassica*, а не трійчасто розгалужені, як у *A. thaliana*. Морфологія трихом широко використовується в таксономії хрестоцвітних [25].

Для перевірки можливості втрати неавтономного мобільного елемента разом з *bar* геном під час транспозиції клони були розмножені і культивовані на середовищі як з фосфінотрицином, так і без нього. При цьому протягом року культивування частина клонів сорту Westar та всі клони сорту Калинівський загинули незалежно від присутності в культуральному середовищі селективного агента. Це вказує на те, що загибель рослин не була пов'язана з дією фосфінотрицину, а отже, і втратою транспозону. Подібне явище спостерігали у регенерантів, отриманих після злиття протопластів *A. thaliana* + *R. sativus* [15]. Можливо, загибель цих клонів обумовлена присутністю більшої кількості генетичного матеріалу *A. thaliana*, який не здатний до тривалого росту *in vitro* [15].

Важливими завданнями, що стояли перед нами у цій роботі, було виявити, чи можлива активність гетерологічної системи транспозонів кукурудзи у міждрибному гібриді *B. napus* + *A. thaliana*, та перевірити, наскільки буде зберігатися генетичний матеріал *A. thaliana*, зокрема маркований сайт первинної інтеграції плазмиди pIC401. Нами був проведений тест на гістохімічне виявлення активності β-глюкуронідази, продукту гена *gusA*. Експресія гена є можливою лише за умови транспозиції *dSpm* і є маркером ексцизії. Було проаналізовано 18 рослин, 13 з яких мали характерне плямисте забарвлення. Зональна активність β-глюкуронідази підтвердила, що процес транспозиції триває. Стійкість отриманих рослин до фосфінотрицину вказувала на те, що відбувалася успішна реінтеграція фланкованого *dSpm* послідовностями *bar* гена. Таким чином, нами було показано можливість ефективної транспозиції мобільного генетичного елемента однодольних (*Spm/dSpm*) у міждрибному гібриді, що відноситься до класу дводольних.

Експресія *npt II* гена, який не здатний до транспозиції, була необхідною на етапі відбору трансформантів у *A. thaliana*, але не гібридів. Однак при дослідженні гібридних рослин всі вони виявились стійкими і росли на 100 мг/л канаміцин-сульфату. Цей факт додатково підтверджує збереження ядерного генетичного матеріалу *A. thaliana* у гібридах.

ПЛР аналіз показав присутність *bar*, *npt II* та *gusA* в усіх досліджених гібридних рослинах. *Spm*-транспозаза була відсутня у однієї з проаналізованих рослин (клон W2). Виявлення всіх трансгенів плазмиди pIC401 опосередковано вказує на збереження принаймні тієї хромосоми *A. thaliana*, яка несе сайт первинної інсерції плазмиди. Ці аналізи проводили через два роки після отримання гібридів, що вказує на тривале збереження генетичного матеріалу *A. thaliana*. Його присутність перешкоджає виявленню ймовірних подій транспозиції *dSpm* з *bar* геном на хромосоми ріпаку.

Первинний скринінг активності β-глюкуронідази показав ексцизію *dSpm* елемента, а отже, і процес активної транспозиції у клоні W2. При повторному гістохімічному аналізі цього клону, проведеному після отримання результатів ПЛР, активності β-глюкуронідази

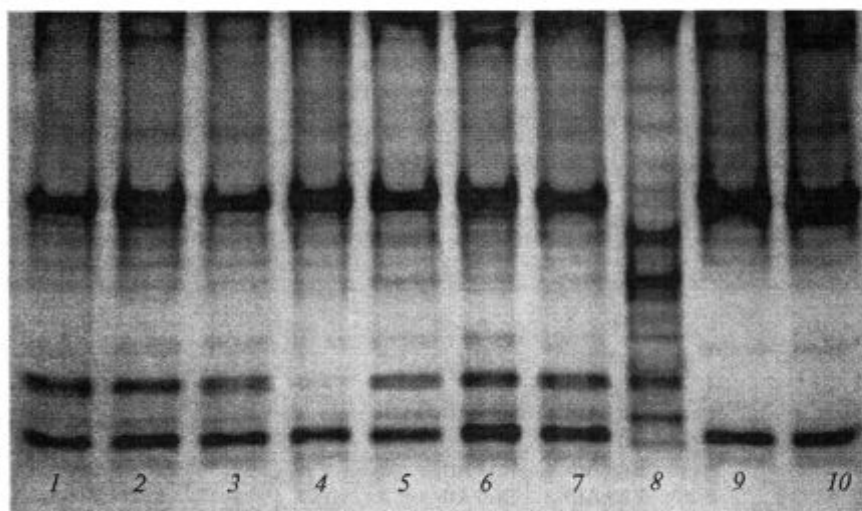


Рис. 2. Ізозимний спектр естерази гібридних ліній *B. napus* + *A. thaliana*: R2, R3, R4, K4, K6, K8, W2 (1–7), *A. thaliana* (8) і *B. napus* (9, 10)

вже не було виявлено. Тому можливою причиною відсутності *Spm*-транспозази в цьому клоні є делеція цього гена протягом періоду культивування.

Для оцінки присутності генетичного матеріалу *A. thaliana* був проведений ізоферментний аналіз отриманих рослин. Ізозимний спектр естерази показав присутність ізоформ, характерних як для ріпаку, так і для *A. thaliana*, що доводить їх гібридну природу (рис. 2). Активність ізозимних полос естерази, видоспецифічних для *A. thaliana*, в одній з проаналізованих рослин була значно нижчою, ніж у батьківського виду та інших гібридів. При аналізі амілазної активності присутність полос *A. thaliana* було виявлено у 5 з 7 проаналізованих рослин. Їх активність була набагато слабшою порівняно з *A. thaliana*. Послаблення активності ізоформ арабідописису, можливо, пов'язане зі зміною експресії генів у гібридних рослин.

Був проведений ПЛР-ПДРФ аналіз мікросателітної ДНК, теломерних повторів та ITS послідовностей ядерної рибосомної ДНК гібридів. *MvaI* гідроліз ампліфікованої ITS послідовності підтвердив гібридність отриманих рослин. Використання праймерів (TTC)×5 показало, що розмір ампліфікованої мікросателітної ДНК досліджуваних рослин відповідав такому у ріпаку. Праймери (TTTAGGG)×3 дозволили ампліфікувати у *A. thaliana* фрагмент ДНК теломерних повторів, розмір якого збігався з розміром одного з фрагментів, що синтезувався у ріпаку, тому у отриманих гіб-

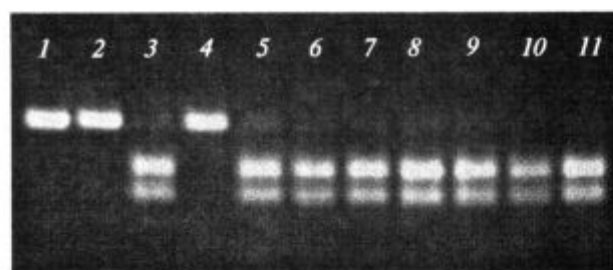


Рис. 3. *Clal* гідроліз спейсера *atpB-rbcL*. Негідролізовані (1, 2) і гідролізовані (3 та 4) ампліфіковані фрагменти *B. napus* та *A. thaliana* відповідно; 5–11 — гідролізовані ПЛР-продукти гібридних ліній (R2, R3, R4, K4, K6, K8, W2)

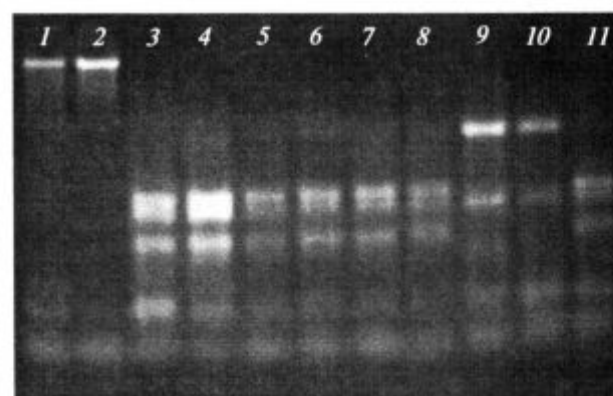


Рис. 4. *MvaI* гідроліз ампліфікованого фрагмента гена *ndh4*. Негідролізовані (1, 2) і гідролізовані (10, 11) ампліфіковані фрагменти *A. thaliana* та *B. napus* відповідно; 3–9 — гідролізовані ПЛР-продукти гібридних ліній (R2, R3, R4, K4, K6, K8, W2)

Біохімічна та молекулярно-біологічна характеристика соматичних гібридів

Гібридний номер	GUS аналіз	Ізоферментний аналіз		ПЛР аналіз				ПЛР-ПДРФ аналіз				
		естераза	фамілаза	<i>bar</i>	<i>nptII</i>	<i>SpmTPase</i>	<i>gusA</i>	ITS	Мікросателіт-на ДНК	Фрагменти ДНК теломерних повторів	<i>ndh4</i>	<i>atpB-rbcL</i>
<i>B. napus</i>	-	Bn	Bn	-	-	-	-	Bn	Bn	Bn	Bn	Bn
<i>A. thaliana</i>	+	Ath	Ath	+	+	+	+	Ath	Ath	Ath	Ath	Ath
R2	+	Bn+Ath	Bn	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Ath	Bn	Bn
R3	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Bn*	Bn	Bn
R4	+	Bn+Ath	Bn	+	+	+	+	Не визн.	Не визн.	Не визн.	Bn	Bn
K4	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Ath	Bn	Bn
K6	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Bn+Ath	Bn	Ath	Bn	Bn
K8	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	+	+	Не визн.	Не визн.	Не визн.	Bn	Bn
W2	+	Bn+Ath	Bn+Ath	+	+	-	+	Bn+Ath	Bn	Bn*	Ath	Bn

Примітки. «+», «-» — позитивна або негативна реакція; Ath — походить від *A. thaliana*; Bn — походить від *B. napus*; * Bn або Bn+Ath, оскільки один з фрагментів *A. thaliana* перекривається фрагментом від *B. napus*.

ридних рослин неможливо чітко визначити приналежність ампліфікованої ділянки.

Метод селекції гібридів полягав у відборі стійких до фосфінотрицину регенерантів, оскільки в наших умовах протопласти арабідопсису не були здатні до поділу. Таким чином, існував певний селективний тиск, направлений на збереження ядерного генетичного матеріалу арабідопсису, який, однак, не контролював процес успадкування цитоплазми. Для більш повної характеристики отриманих гібридів був проведений аналіз їх пластоми і мітохондріону. Аналіз спейсерної ділянки між генами *atpB-rbcL* хлоропластного геному показав присутність пластоми *B. napus* (рис. 3) в усіх досліджених рослинах. У роботах по міжтрибній гібридизації представників роду *Brassica* з *Arabidopsis thaliana* [26], *Brassica* з *Thlaspi perfoliatum* [27], *Brassica* з *Lesquerella fendleri* [28] також було показано наслідування хлоропластного геному від ріпаку. У досліджах Bauer-Weston [26] були отримані гібридні рослини як з використанням опромінення для інактивації ядерного геному, так і без нього. В обох випадках сегрегація пластид проходила на користь хлоропластів культурного виду, який мав більшу кількість хромосом. Автори вважають, що спрямована сегрегація пластид може бути обумовлена рядом чинників,

пов'язаних з міжвидовою взаємодією, станом диференціації тканини джерела протопластів та комплексом ядерно-цитоплазматичних відносин. Ними, однак, було висловлене припущення про те, що через малу вибірку (у досліді без опромінення) така сегрегація хлоропластів могла бути зумовлена і γ -опроміненням. У цьому та проведених нами раніше дослідях, незважаючи на відсутність опромінення, результати сегрегації пластид — подібні [14, 29]. Тому можна припустити, що спрямована сегрегація пластид у цій гібридній комбінації залежить більшою мірою від комплексу ядерно-цитоплазматичних відносин, ніж від елімінації ядерного геному внаслідок опромінення. Таким чином, ми припускаємо, що при соматичній гібридизації у родині *Brassicaceae* за умови відсутності спеціальних експериментальних впливів гібриди успадковують пластом того з батьків, який має більшу кількість хромосом.

При дослідженні мітохондріального гена *ndh4* виявилось, що його рестриктний спектр у більшості гібридів відповідав *B. napus* і лише у однієї рослини збігався з *A. thaliana* (рис. 4). Ці факти вказують на те, що успадкування мітохондрій відбувається випадковим чином і відповідають нашим попереднім дослідженням [29].

Отже, при соматичній гібридизації в родині *Brassicaceae* успадкування пластид визначається ядерно-цитоплазматичними взаємодіями, в той час як мітохондрії успадковуються випадковим чином.

Таким чином, на основі морфології та за допомогою біохімічних і молекулярно-біологічних методів аналізу нами було доведено присутність трансгенів та генетичного матеріалу обох батьківських видів (з переважанням *B. napus*) в отриманих рослинах (табл. 2). Повної елімінації генетичного матеріалу *A. thaliana* не відбувалося протягом двох років. Збереження генетичного матеріалу *A. thaliana* та трансгенів при тривалому розмноженні отриманих пагонів шляхом живцювання виключає їх химерне походження і доводить гібридну природу. В рослинах відбувався активний процес транспозиції *dSpm* елемента з *bar* геном. Присутність генетичного матеріалу *A. thaliana* з сайтом первинної інтеграції ускладнює виявлення сайту реінсерції мобільного елемента в геном ріпаку. Результати цього дослідження цілком збігаються з попередніми, отриманими при гібридизації *B. juncea* + *A. thaliana* [14].

Отже, нами була створена система для вивчення міжгеномної транспозиції, що включає частину генома *A. thaliana* та геном *B. napus*.

SUMMARY. Functionally asymmetric somatic hybrids possessing heterologous transposable element *Spm/dSpm* were obtained following intertribal somatic hybridization between *Brassica napus* and transgenic *Arabidopsis thaliana*. Mobile genetic elements actively transposed in the hybrid genomes. Complete elimination of *A. thaliana* genome was not observed.

РЕЗЮМЕ. В результате межтрибной соматической гибридизации *Brassica napus* и трансгенного *Arabidopsis thaliana* были получены функционально асимметричные гибридные растения, несущие гетерологическую систему транспозонов *Spm/dSpm*. Мобильные генетические элементы активно транспозировались в геноме гибридов. Полной элиминации генома *A. thaliana* не наблюдалось.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aarts M.G.M., Dirkse W.G., Stiekema W.J., Pereira A. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis thaliana* // Nature. — 1993. — 363, № 6431. — P. 715–718.
2. Cardon G.H., Frey M., Saedler H., Gierl A. Definition and characterization of an artificial *En/Spm*-based transposon tagging system in transgenic tobacco // Plant Mol. Biol. — 1993. — 23, № 1. — P. 157–178.
3. Majira A., Domin M., Grandjean O., Gofron K., Houba-Herlin N. Seedling lethality in *Nicotiana plumbaginifolia* conferred by Ds transposable element insertion into a plant-specific gene // Plant Mol. Biol. — 2002. — 50. — P. 551–562.
4. Goldsborough A.P., Lastrella C.N., Yoder J.I. Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato // Biotechnology. — 1993. — 11. — P. 1286–1292.
5. Yoder J.I., Goldsborough A.P. Transformation systems for generating marker-free transgenic plants // Biotechnology. — 1994. — 12, № 3. — P. 263–267.
6. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamacado M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopen-tenyl transferase gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1997. — 94. — P. 2117–2121.
7. Briza J., Niedermeierova H., Pavingerova D., Thomas C.M., Klimyuk V., Jones J.D.G. Transposition patterns of unlinked transposed Ds elements from two T-DNA loci on tomato chromosomes 7 and 8 // Mol. Genet. Gen. — 2002. — 266. — P. 882–890.
8. Gleba Yu.Yu., Hoffmann F. «Arabidobrassica»: a novel plant obtained by protoplast fusion // Planta. — 1980. — 149. — P. 112–117.
9. Siemens J., Sacristan M.D. Production and characterization of somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* // Plant Sci. — 1995. — 111, № 1. — P. 95–106.
10. Німовська І.О. Генетична реконструкція ядра та цитоплазми *Brassica oleracea* L. за допомогою злиття протопластів : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. — Київ, 1997. — 24 с.
11. Bauer-Weston B.J., Keller W., Webb J., Gleddie S. Production and characterization of asymmetric somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* // Theor. Appl. Genet. — 1993. — 86. — P. 150–158.
12. Forsberg J., Landgren M., Glimelius K. Fertile somatic hybrids between *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* // Plant Sci. — 1994. — 95. — P. 213–223.
13. Yamagishi H., Landgren M., Forsberg J., Glimelius K. Production of asymmetric hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* utilizing an efficient protoplast culture system // Theor. Appl. Genet. — 2002. — 104. — P. 959–964.
14. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Черен М.М., Глеба Ю.Ю., Кучук М.В. Отримання міжтрибних соматичних гібридів *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana* та дослідження поведінки трансгенних ознак // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 3. — С. 3–8.
15. Yamagishi H., Glimelius K. Somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and cytoplasmic male-sterile radish (*Raphanus sativus*) // Plant Cell Rep. — 2003. — 22. — P. 52–58.
16. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol. Biol. Report. — 1987. — 5. — P. 387–405.
17. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // PCR Meths. Appl. — 1993. — 3. — P. 69–70.
18. Сахно Л.А., Сытник Е.С., Черен Н.Н., Комарницький І.К., Кучук Н.В., Климык В.И. Активность системы

- Spm* транспозонов кукурузу у трансгенних рослин *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Shultz, отриманих шляхом прямого переносу ДНК в протопласти, так і агробактеріальною трансформацією корневих експлантів // Цитологія і генетика. — 2002. — 36, № 6. — С. 3—8.
19. White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // PCR protocols: a guide to methods and applications / Eds M. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.G. White — San Diego: Acad. press, 1990. — P. 315—322.
 20. Cox A., Bennett S., Parokonny A., Kenton A., Callimassia M., Bennett M. Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe // Ann. Bot. — 1993. — 72. — P. 239—247.
 21. Demeke T., Huel P., Baga M., Caswell K., Leung N., Chibbar R.N. Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat // Theor. Appl. Genet. — 1999. — 99, № 9. — P. 947—953.
 22. Savolainen V., Corbar R., Moncousin C., Spricher R., Manen J.-F. Chloroplast DNA variation and parentage analysis in 55 apples // Theor. Appl. Genet. — 1995. — 90. — P. 1138—1141.
 23. Demasure B., Sodji N., Petit R.J. A set universal primers for amplification of polymorphic non-coding region of mitochondrial and chloroplast DNA in plant // Mol. Ecol. — 1995. — 4. — P. 129 — 131.
 24. Борисюк Н.В., Климюк В.И., Пароконный А.С., Самойлов А.М., Череп Н.Н., Шаховский А.М., Шлумуков Л.Р. Биохимический анализ в клеточной инженерии растений. — Киев, 1988. — 49 с. (Препринт / АН УССР, Институт ботаники; 88.1).
 25. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. — Киев: Наук. думка, 1982. — 103 с.
 26. Bauer-Weston B.J., Keller W., Webb J., Gleddie S. Production and characterization of asymmetric somatic hybrids between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* // Theor. Appl. Genet. — 1993. — 86. — P. 150—158.
 27. Fahleson J., Eriksson I., Landgren M., Stymne S., Glimelius K. Intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* and *Thlaspi perfoliatum* with high content of the *T. perfoliatum*-specific nervonic acid // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 87, № 7. — P. 795—804.
 28. Skarzhinskaya M., Landgren M., Glimelius K. Production of intertribal somatic hybrids between *Brassica napus* L. and *Lesquerella fendleri* (Gray) Wats. // Theor. Appl. Genet. — 1996. — 93, № 8 — P. 1242—1250.
 29. Овчаренко О.О., Комарницький І.К., Череп М.М., Рудас В.А., Кучук М.В. Отримання міжтрибних соматичних гібридів дигеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Arabidopsis thaliana*) та тетрагеномного (*Orychophragmus violaceus* + *Brassica juncea* + *Arabidopsis thaliana*) походження та їх використання для вивчення поведінки гетерологічної системи транспозонів *Spm/dSpm* // Біополімери і клітка. — 2005. — 21, № 1. — С. 35—41.

Надійшла 10.01.05