

Оригинальные работы

УДК 577.21

Л.А. САХНО, Е.С. СЫТНИК, Н.Н. ЧЕРЕП,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК, В.И. КЛИМЮК

АКТИВНОСТЬ СИСТЕМЫ Spm ТРАНСПОЗОНОВ КУКУРУЗЫ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *ORYCHOPHRAGMUS VIOLACEUS* (L.) O.E.SCHULZ, ПОЛУЧЕННЫХ ПУТЕМ КАК ПРЯМОГО ПЕРЕНОСА ДНК В ПРОТОПЛАСТЫ, ТАК И АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИЕЙ КОРНЕВЫХ ЭКСПЛАНТОВ



Одним из подходов к клонированию уникальных генов является использование инсерционного мутагенеза с помощью транспозонов. Объектом исследования был *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz — дикий вид из семейства крестоцветных, представляющий интерес для практической селекции как донор улучшенного состава растительного масла. Для генетической трансформации использовали конструкцию, которая включает селективный *NPT II*-ген, репортёрный *GUS*-ген, структурный *BAR*-ген, находящийся в границах неавтономного транспозона *dSpm*, и *Spm*-транспозазу (*SpmTPase*) кукурузы. *GUS*-ген не активен, так как отделен от 35S промотора инсерцией *dSpm* элемента и становится функциональным только после *dSpm* транспозиции. Трансгенные растения *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz были получены с помощью методов прямой (обработка ПЭГ в присутствии ДНК) трансформации мезофильных протопластов, а также *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации корневых эксплантов. Встраивание в геном всех перечисленных генов и явление транспозиции подтверждено с помощью гистохимического анализа *GUS*-активности и ПЦР-анализа. Относительная эффективность трансформации при использовании протопластов составила 5,8 %.

© Л.А. САХНО, Е.С. СЫТНИК, Н.Н. ЧЕРЕП,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК, В.И. КЛИМЮК, 2002

Введение. Дикие виды являются ценным генетическим материалом в селекционной работе с культурными растениями. *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz представляет интерес для селекции рапса (*Brassica napus* L.), поскольку масло, получаемое из его семян, имеет превосходные качества. Согласно Ли с соавт. [1], оно содержит большое количество олеиновой (20,32 %), линолевой (53,17 %) и пальмитиновой (14,31 %) кислот и малое количество линоленовой (4,76 %) и эруковой (0,94 %) кислот. В то же время при половой гибридизации между рапсом и *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz происходит образование нестабильных гибридов с последующей элиминацией хромосом дикого вида [1].

Одним из подходов к клонированию уникальных генов является использование инсерционного мутагенеза с помощью транспозонов. Так, с применением транспозирующих элементов были клонированы гены кукурузы [2] и львиного зева [3] (гомологичная система транспозонов), петунии [4] и арабидопсиса [5] (гетерологичная система транспозонов). Также было показано, что гетерологичная система *Ac/Ds* кукурузы функционирует у гороха [6]. Получению трансформированных растений *Orychophragmus violaceus* с использованием гетерологичной системы транспозонов (*Spm/dSpm* система кукурузы) и изучению поведения транспозирующей системы посвящена настоящая работа. Полученные растения могут быть использованы как для клонирования уникальных генов *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz, так и для изучения системы переноса транспозирующих генов между геномами у нестабильных гибридов *O. violaceus* и *B. napus*.

Материалы и методы. В работе использовали растения *Orychophragmus violaceus* (L.) O. E. Schulz, полученные из семян (Китай) [7].

Прямая трансформация протопластов. Выделение и очистку протопластов проводили согласно методике, принятой в нашей лаборатории [7]. Для трансформации использовали растворы согласно Negruțiu et al. [8]. Непосредственно перед трансформацией протопласти ресуспендировали в 0,5 мл трансформирующего буфера при плотности 10^5 – 10^6 протопластов в 1 мл. К ним добавляли 10 мкл раствора ДНК (1 μ мкл в TE-буфере) и перемешивали. Через 2–5 мин супензию насылали на поверхность раствора ПЭГ (0,4 мл), находящегося в пробирке Flow,

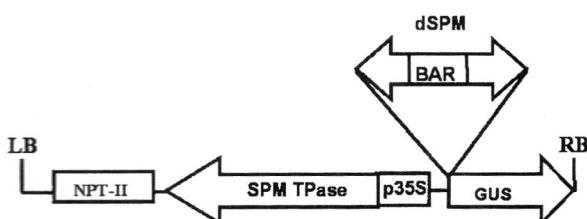


Рис. 1. Схема плазмидного вектора pIC401

как предложено Зубко и др. [9]. Пробирку центрифугировали 30 с при 800 об/мин с последующей постепенной остановкой в течение еще 30 с. В спокойном состоянии протопласты оставляли на 10 мин. В течение последующих 10 мин добавляли 10 мл раствора для отмычки от ПЭГ. Ресуспендировав протопласты во всем объеме, их затем осаждали в течение 2 мин при 1000 об/мин. Последней была отмычка протопластов средой W5 [10].

Протопласты помещали в чашку Петри со средой SW1 [11] и культивировали в темноте при 25° С. Через 6–7 дней суспензию разбавляли 1:1 средой PCN [12], еще через 7–10 дней микроколонии переносили на агаризованную среду MS [13] с 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК, 0,2 М маннитолом, 500 мг/л МЭС и 5 мг/л фосфинотрицина (PPT). Через 2 нед развивающиеся колонии переносили на среду того же состава, но с 10 мг/л PPT. Регенерирующие зеленые растения пассировали на безгормональную среду MS с 10 мг/л PPT.

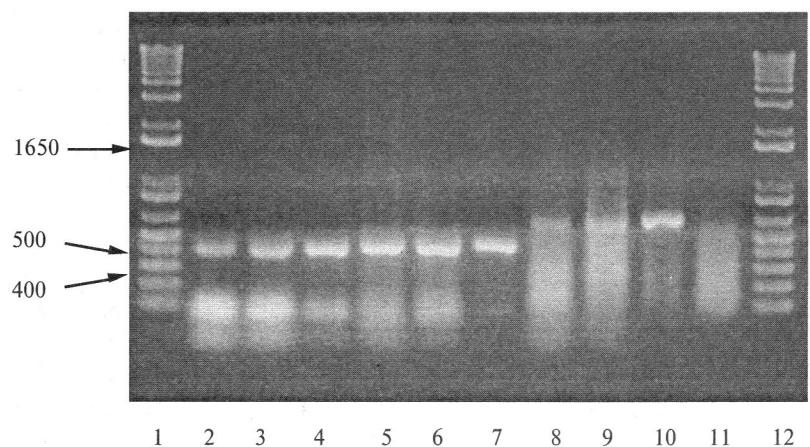
Agrobacterium tumefaciens-опосредованная трансформация. Перед проведением агробактериальной трансформации экспланты (корней, листовых пластинок и черешков) нарезали крупными частями и выдерживали 3–5 дней на твердой питательной среде MS, дополненной 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 0,2 мг/л БАП для индукции каллусообразования. Подготовленную суспензию агробактерии наливали в чашки Петри. Растительные экспланты помещали в суспензию, нарезали на мелкие части и кокультивировали в течение 1 ч. После этого экспланты подсушивали на фильтровальной бумаге и переносили на агаризованную среду MS с 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л НУК, 0,2 мг/л БАП. Кокультация на твердой среде длилась 2 дня. После отмычки эксплантов от наросшей агробактерии жидкой средой MS их переносили на свежую агаризованную среду MS с 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л

НУК, 0,2 мг/л БАП, но дополненную 500 мг/л цефотаксима. Через 3–7 дней экспланты вновь переносили на свежую среду того же состава с добавлением 5 мг/л PPT, еще через неделю пересаживали на среду для регенерации MS с 1 мг/л АБК, 0,5 мг/л БАП, 0,1 мг/л ИУК, 5 мг/л PPT и 250 мг/л цефотаксима. Следующий пассаж осуществляли на ту же среду, но с 10 мг/л PPT. В дальнейшем экспланты пересаживали на регенерационную среду того же состава (лишь уменьшая количество цефотаксима в последующих пассажах) каждые 2–3 нед до появления зеленых растений.

Плазмида и бактериальный штамм. Плазмида pIC401, состоящая из селективного NPT II-гена, репортерного GUS-гена, Spm-транспозазы (SpmTPase) и структурного гена BAR, встроенного в dSpm элемент и обеспечивающего устойчивость к фосфинотрицину (глюфозинату аммония, гербициду BASTA), представлена на рис. 1. Ночную культуру (100 мл) *Agrobacterium tumefaciens* (штамм AGL1 [14]) наращивали в жидкой среде LB [15] с 5 мг/л тетрациклина, 50 мг/л карбенициллина и 100 мг/л рифамицина. За 3–5 ч до заражения агробактерию осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10–15 мин, осадок ресуспендировали в смеси 25 мл среды LB и 25 мл жидкой среды MS и ставили на качалку. Спустя 3–5 ч суспензия агробактерии была готова для проведения экспериментов.

Анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Интеграцию чужеродных генов в растительный геном определяли с помощью ПЦР. ДНК из предположительно трансгенных растений выделяли из листовой ткани согласно методике, предложенной Cheung et al. [16]. Для реакции использовали 40 нг ДНК из каждого образца, 0,5 мКМ каждого из праймеров, 0,8 мКМ трифосфатов, 1 ед. ТаqДНК-полимеразы, 10 × ПЦР реакционный буфер, состоящий из 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 9 при 25 °C), 0,1 % Triton X-100 и 0,2 мКМ MgCl₂. Общий объем смеси составил 20 мкл. Для амплификации NPT II-гена использовали праймеры 5'-GAGGCTATTGGCTATGACTG-3' и 5'-CAAGCTCTCAGCAATATCACG-3', амплифицирующие фрагмент величиной 640 пн [17]. Для определения наличия Spm транспозазы в растениях были использованы следующие прай-

Рис. 2. Результаты ПЦР-анализа тотальной ДНК трансформированных растений *O. violaceus*. Праймеры, комплементарные гену NPT II – 8, 9, 10, гену BAR – 5, 6, 7, гену GUS – 2, 3, 4; 1, 12 – маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); 11 – отрицательный контроль, ДНК нетрансформированного растения *O. violaceus*; 4, 7, 10 – положительный контроль, плазмидный вектор pIC401; 2, 5, 8 – растения *O. violaceus*, трансформированные прямым методом; 3, 6, 9 – растения *O. violaceus*, трансформированные с помощью агробактерий



меры: 5'-GACAACACTGTCCAGCCAAGAC-3' и 5'-GCTTTGGGTATGCAGCCTAGTTC-3', амплифицирующие фрагмент величиной в 600 пн. Для амплификации GUS-гена применяли праймеры, амплифицирующие фрагмент в 423 пн: 5'-TGGTGGACGATATCACCGTGGTGA-3' и 5'-GGCCCCAATCCAGTCCATTAAATGCG-3'. Для амплификации BAR-гена использовали праймеры 5'-CCGTACCGAGCCGAGGAAC-3' и 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3', амплифицирующие фрагмент величиной 445 пн. Для амплификации фрагмента 35S-GUS величиной 440 пн, подтверждающей явление транспозиции, использовали праймеры 5'-CAAGATGCCTCTGCCGACAGTG-3' и 5'-CGCTTCCCACCAACGTCGA-3'. Изолированная ДНК из нетрансформированных растений (отрицательный контроль) и 1 нг плазмидного вектора pIC401 (положительный контроль) были амплифицированы с теми же праймерами и при тех же условиях. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик ИМ02» (фирма «ДНК-технология», Москва). Использовали следующие профили: 94 °C, 1 мин; 55 °C, 1 мин; 72 °C, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °C, 8 мин для NPTII-гена; 94 °C, 1 мин; 65 °C, 1 мин; 72 °C, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °C, 8 мин для SpmTPase; 94 °C, 1 мин; 56 °C, 1 мин; 72 °C, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °C, 8 мин для GUS-гена, 94 °C, 1 мин; 65 °C, 72 °C, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °C, 8 мин для BAR-гена и 94 °C, 1 мин, 65 °C, 1 мин, 72 °C, 3 мин, 35 циклов, в заключение 72 °C, 8 мин для подтверждения явления транспозиции. После этого продукты ПЦР

анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в Tris-фосфатной буферной системе.

β -глюкуронидазная проба. GUS-активность определяли, проводя гистохимическую реакцию по Jefferson [18]. Листья инкубировали при 37 °C в растворе, содержащем 0,5 мг/мл 5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-глюкуронид (X-gluc) в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7) и 20 % (v/v) метанол.

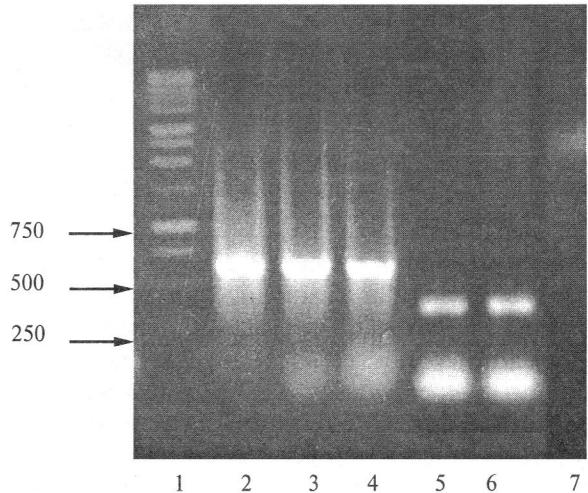


Рис. 3. Анализ продуктов амплификации тотальной ДНК трансформированных растений *O. violaceus*, подтверждающий явление транспозиции. Праймеры, комплементарные гену SpmTPase – 2–4, участку 35S-GUS – 5, 6; 1 – маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); 2 – положительный контроль, плазмидный вектор pIC401; 3, 5 – растения *O. violaceus*, трансформированные прямым методом; 4, 6 – растения *O. violaceus*, трансформированные с помощью агробактерий; 7 – отрицательный контроль, ДНК нетрансформированного растения *O. violaceus*

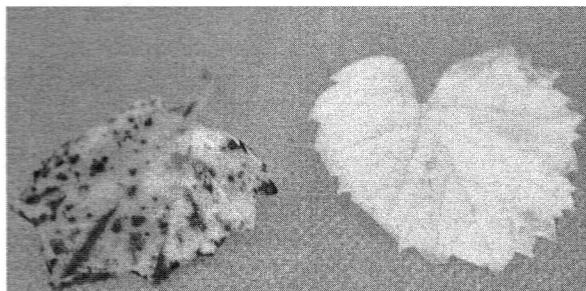


Рис. 4. Гистохимический анализ экспрессии GUS-гена в тканях листа *O. violaceus* (слева – трансформированное растение, справа – нетрансформированное)

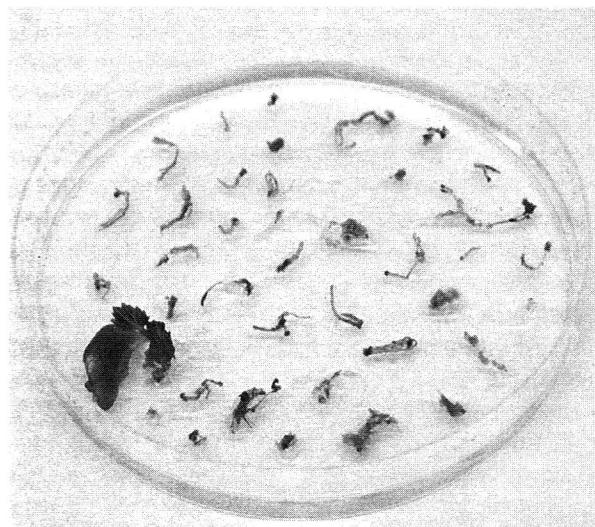


Рис. 5. Регенерация на селективной питательной среде (РРТ 10 мг/л) растений *O. violaceus* из трансформированных агробактерией корневых эксклантов

Результаты исследований и их обсуждение. В процессе культивирования протопластов *Oryzopsis violaceus*, подвергшихся прямой трансформации с помощью ПЭГ, из 190 клонов отобрано 14, развивавшихся на среде для регенерации с 10 мг/л РРТ. Из них 11 регенерировали в фенотипически нормальные растения. Первые регенеранты появились спустя приблизительно 6 нед от начала эксперимента. Относительная эффективность регенерации составила 5,8 %.

Следует отметить, что принципиальным для регенерации в условиях селективного давления фосфинотрицина оказалось наличие в среде буфера (морфолино-этан-сульфокислоты – МЭС, 500 мг/л) и проведение первого этапа селекции на рассеянном свете. Поскольку РРТ является ингибитором глютаминсингтазы,

играющей ведущую роль в ассимиляции аммиака и регуляции метаболизма азота в растении, при его применении азотный метаболизм в тканях нарушается и аммиак накапливается в токсических количествах. Аммиак продуцируется во время реакций, связанных с фотосинтетическим электронным транспортом, его накопление возрастает на свету. В этих условиях чувствительность растительных тканей к фосфинотрицину увеличивается, что может привести к быстрой гибели даже трансформированных клеток [19].

При амплификации с праймерами, специфичными для BAR-гена, показано, что все анализируемые клоны имеют BAR-ген (рис. 2).

У семи полученных клонов детектируется сигнал при амплификации с праймерами, специфичными для транспозазы (рис. 3), у шести – с праймерами, специфичными для GUS-гена (рис. 2). Следует отметить, что GUS-ген находится в конструкции (рис. 1) в нефункциональном состоянии, без промотора, и восстанавливает свою функциональность только при активации транспозона. При проведении ПЦР-анализа с праймерами, один из которых затрагивает промотор, а другой находится на структурном GUS-гене, был детектирован сигнал, что свидетельствует о происходящем явлении транспозии у шести тестируемых клонов (рис. 3).

При проведении гистохимической реакции на GUS-активность выявлено характерное окрашивание листьев у пяти растительных линий (рис. 4). Такое же поведение GUS-гена предполагалось еще в одном клоне, обладающем транспозазой, GUS-геном и характеризующимся транспозицией. Это свидетельствует о том, что Spm/dSpm система активна в полученных растениях и может быть использована для инсерционного мутагенеза. Отсутствие окрашивания говорит о молчании перенесенного гена, причин такому явлению может быть несколько [20].

Наличие NPT II-гена обнаружено у трех анализируемых клонов (рис. 2).

Наблюдаемое явление неполного переноса можно объяснить, с одной стороны, особенностями метода прямой трансформации, в процессе которой могут происходить нарушения в структуре переносимой ДНК [20], с другой – размером конструкции, который равен 20 кб. Вследствие этого данная плазмида скорее будет

подвергаться разрушению по сравнению с плазмидами меньшего размера, причем быстрее будут уходить гены, расположенные далее от правого бордера (см. рис.1 — схема конструкции) [21].

Отмечено, что эффективность трансформации увеличивается при уменьшении размеров используемой плазмидной Т-ДНК [22]. Возможно, в нашей системе можно было бы сократить величину конструкции за счет исключения NPT II-гена.

В результате экспериментов по трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 pIC401 получено четыре регенеранта, устойчивых к фосфинотрицину и канамицину. Из них три оказались трансформантами с активным транспозоном. Регенеранты из корневых эксплантов появлялись спустя 2–3 мес после заражения агробактерией.

При проведении ПЦР-анализа со всеми вариантами праймеров, описанных выше, были получены фрагменты нужных размеров (рис. 2 и 3). Также отмечено характерное окрашивание при проведении гистохимической реакции на активность гена GUS (рис. 4), что, как сказано выше, может происходить только при транспозиции. Четвертое растение не показало окрашивания в тесте на экспрессию GUS-гена, что свидетельствует об отсутствии транспозоновой активности, поэтому дальнейший анализ с помощью ПЦР с ним не проводился.

В контрольных экспериментах по проверке регенерационной способности различных эксплантов растений *O. violaceus* эффективность регенерации была высокой как у черешков, так и у листьев и корней при условии, что у корневых и листовых эксплантов вначале индуцировали каллусообразование, а затем получали регенерацию (результаты не представлены). Однако все трансформанты, полученные в экспериментах с *Agrobacterium tumefaciens*, регенерировали из корневых эксплантов (рис. 5). Из этого можно заключить, что условия обработки агробактерией в описываемых экспериментах оказались слишком жесткими для листовых и черешковых эксплантов.

Таким образом, нами получены устойчивые к фосфинотрицину растения *Orychophragmus violaceus* и показано, что у большинства трансгенных растений происходит транспозиция Spm

системы кукурузы с достаточно высокой эффективностью. Ранее эта система была разработана и использована для инсерционного мутагенеза у *Arabidopsis thaliana* [23]. В цитируемой работе получено примерно 80 % трансформантов, имеющих инсерции в различные хромосомные сайты. Наши эксперименты подтверждают возможность использования этой системы у другого вида из семейства крестоцветных.

Для последующей гибридизации с культурными видами крестоцветных отобрано пять клонов *Orychophragmus violaceus*, полученных в ходе экспериментов по трансформации мезофильных протопластов, и три клона, полученных при *Agrobacterium tumefaciens*-опосредованной трансформации корневых эксплантов. Трансгенные линии *Orychophragmus violaceus* характеризуются наличием генов BAR, GUS, транспозазы, у них подтверждено явление транспозиции. Полученные растения *Orychophragmus violaceus* позволят изучить поведение Spm системы транспозонов у нестабильных половых гибридов с сельскохозяйственно ценными видами рода *Brassica*.

SUMMARY. Transposon mediated insertional mutagenesis is one of the approaches for the unique gene cloning. A wild species of *Cruciferae* family *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz, which is of interest for practical breeding as a donor of improved plant oil, was an object of the investigation. Plasmid construction used in the experiments included selective NPT II gene, reported GUS gene serving as an excision marker, structural BAR gene located within the dSpm element and Spm transposase. The GUS gene of this plasmid had not his own promoter and became functional only after Spm-transposition. Transformed *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz. plants were obtained by direct mesophyll protoplast transformation as well as *Agrobacterium tumefaciens*-mediated root explant transformation. Gene transfer and the transposition event were confirmed by the GUS activity and the PCR analysis. Relative transformation efficiency using protoplasts was 5.8 %.

РЕЗЮМЕ. Одним з підходів до клонування унікальних генів є використання інсерційного мутагенезу за допомогою транспозонів. Об'єктом досліджень був *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz — дикий вид родини хрестоцвітих, цікавий для практичної селекції як донор поліпшеного складу рослинної олії. Для генетичної трансформації використовували конструкцію, що включає селективний NPT II-ген, репортерний GUS-ген, структурний BAR-ген, який знаходитьться в межах неавтономного транспозону dSpm, та Spm-транспозазу (SpmTPase). GUS-ген в плазміді є неактив-

ним, тому що він відокремлений від 35S промотора інсерцією dSpm елемента і стає функціональним тільки після dSpm транспозиції. Трансгенні рослини *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz були отримані за допомогою методів прямої (обробка ПЕГ в присутності ДНК) трансформації мезофільних протопластів, а також *Agrobacterium tumefaciens*-опосередкованої трансформації кореневих експлантів. Перенесення в рослинний геном всіх перелічених генів та явище транспозиції підтверджено за допомогою аналізу GUS-активності та ПЛР-аналізу. Відносна ефективність трансформації при використанні протопластів дорівнювала 5,8 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li Z., Liu H.L., Luo P. Production and cytogenetics of intergeneric hybrids between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* // Theor. Appl. Genet. – 1995. – 91, № 1. – Р. 131–136.
2. Shepherd N.S., Rhoades M.M., Dempsey E. Genetic and molecular characterisation of a-mrf-Mrh, a new mutable system of *Zea mays* // Develop. Genet. – 1989. – 10, № 6. – Р. 507–519.
3. Coen E.S., Carpenter R. A semi dominant allele, niv-5257 acts in trans to inhibit expression of its wild-type homologue in *Antirrhinum majus* // EMBO J. – 1988. – 7, № 4. – Р. 877–883.
4. Chuck G., Robbins T., Nijjar C. et al. Tagging and cloning of petunia flower color gene with the maize transposable element activator // Plant Cell. – 1993. – 5, № 4. – Р. 371–378.
5. Aarts M.G., Dirkse W.G., Stiekema W.J., Pereire A. Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis* // Nature. – 1993. – 363, № 6431. – Р. 715–718.
6. Рачек Л.И., Стороженко С.В., Кучук Н.В. Получение и молекулярно-биологический анализ трансгенных растений гороха (*Pisum sativum L.*), содержащих Ds-элемент кукурузы // Биополимеры и клетка, – 1995. – 11, № 3/4. – С. 82–87.
7. Сахно Л.А., Василенко М.Ю., Овчаренко О.А., Кучук Н.В. Ускоренная регенерация растений из мезофильных протопластов и сегментов черешка листа *Orychophragmus violaceus* (L.) O.E.Schulz // Физиология и биохимия культур. растений. – 2002. – 34, № 1. – С. 75–80.
8. Negruiti I., Shilito R., Potrycus I., Biasini G., Sala F. Hybrid genes in the analysis of transformation conditions. 1. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts // Plant Mol. Biol. – 1987. – 8. – Р. 363–373.
9. Зубко М.К., Зубко Е.И., Капранов Ф.В. Индуциция хлорофилдефектных мутантов табака – маркеров для клеточной инженерии // Биополимеры и клетка. – 1991. – 7, № 4. – С. 72–79.
10. Medgyesy P., Menczel L., Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance : chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana sylvestris* and isolation of their somatic hybrids // Mol. Gen. Genet. – 1980. – 179. – Р. 693–696.
11. Нітовська І.О. Генетична реконструкція ядра та цитоплазми *Brassica oleracea* L. за допомогою злиття протопластів : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 1997. – 24 с.
12. Dovzhenko A., Bergen U., Koop H.-U. Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts shoot formation in less than two weeks // Protoplasma. – 1998. – 204. – Р. 114–118.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – 15, № 3. – Р. 473–497.
14. Lazo G. R., Stein P. A., Ludwig R.A. A DNA transformation competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium* // Biotechnology. – 1991. – 9. – Р. 963–967.
15. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 521 с.
16. 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 Meth. Appl. – 1993. – 3. – Р. 69–70.
17. 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. – Р. 947–953.
18. Jefferson R.A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system // Plant Mol. Biol. Rep. – 1987. – 5. – Р. 387–405.
19. D'Halluin K., De Block M., Denecke J., Janssens J., Leemans J., Reynaerts A., Botterman J. The bar gene as selectable and screenable marker in plant engineering // Meth. Enzym. – 199. – 216. – Р. 415–426.
20. Hellens R., Mullineaux Ph. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors // Trends Plant Sci. – 2000. – 5, № 10. – Р. 446–451.
21. Matzke M.A., Matzke A.J.M. How and why do plants inactivate homologous (trans)genes ? // Plant Physiol. – 1995. – 107. – Р. 679–685.
22. Park S.H., Lee B.-M., Salas M.G., Srivatanakul M., Smith R.H. Shorter T-DNA or additional virulence genes improve Agrobacterium-mediated transformation // Theor. Appl. Genet. – 2000. – 101. – Р. 1015–1020.
23. Tissier A.F., Marulloonet S., Klimyuk V., Patel K., Torres M.A., Murphy G., Jones J.D.G. Multiple independent defective *Suppressor-mutator* transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics // Plant Cell. – 1999. – 11. – Р. 1841.

Ин-т клет. биологии и генет.
инженерии НАН Украины, Киев,
Icon Genetics. GmbH, Biozentrum, Halle

Поступила
13.05.02