УДК 575.222.7:581.1

Н.А. МАТВЕЕВА, А.М. ШАХОВСКИЙ, Н.В. КУЧУК
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
03143, Киев, ул. Акад. Заболотного, 148
E-mail: joyna@i.com.ua

СОМАТИЧЕСКИЕ ГИБРИДЫ МЕЖДУ ТРАНСГЕННЫМИ РАСТЕНИЯМИ КАРТОФЕЛЯ *SOLANUM TUBEROSUM* И ТРАНСПЛАСТОМНЫМИ РАСТЕНИЯМИ *SOLANUM RICKII*

Проведены эксперименты по слиянию мезофильных протопластов Solanum tuberosum (сортов Луговской и Славянка) с геном nptII в ядерной ДНК и полученного нами ранее трансластомного растения Solanum rickii с геном aadA. На селективной среде, содержавшей антибиотики канамицин, спектиномицин и стрептомицин, были получены гибридные растения, имеющие гены aadA и nptII, хлоропласты S. rickii и S. tuberosum, гибридный ядерный геном, что подтверждено результатами ПЦР-анализов.

© Н.А. МАТВЕЕВА, А.М. ШАХОВСКИЙ, Н.В. КУЧУК, 2008

Введение. В настоящее время эффективное сельскохозяйственное производство неотделимо от новейших достижений науки. К ним можно отнести внедрение новых аграрных технологий, новых средств защиты растений, новых сортов. Широко используются созданные благодаря значительным успехам генетической инженерии трансгенные сельскохозяйственные культуры с генами устойчивости к гербицидам, заболеваниям, вредителям [1].

Особый интерес представляют растения, имеющие чужеродные гены в хлоропластах. Хлоропластная трансформация по сравнению с ядерной имеет ряд несомненных преимуществ. К ним можно отнести высокий уровень экспрессии и возможность накопления существенно большего количества белкового продукта по сравнению с переносом того же гена в ядерную ДНК [2]. При встраивании чужеродного гена в ядерную ДНК существует опасность неконтролируемого его распространения, в то время как материнское наследование цитоплазматических генов у большинства сельскохозяйственных культур делает невозможным перенос с пыльцой чужеродных генов и таким образом способствует экологической безопасности [3]. Трансформация хлоропластной ДНК, в отличие от ядерной, осуществляется по способу гомологичной рекомбинации [4]. Строгая специфичность по месту встраивания переносимого гена дает возможность избежать влияния так называемого неконтролируемого эффекта положения или «молчания» перенесенных генов. Полицистронный тип экспрессии при трансформации хлоропластов позволяет вводить в растительную клетку несколько генов одновременно [5].

На сегодня имеется несколько способов осуществления трансформации хлоропластной ДНК. К ним относятся «прямая» трансформация с использованием культуры протопластов [6, 7] и биолистическая трансформация [8]. Однако до настоящего времени надежные протоколы трансформации хлоропластной ДНК разработаны только для растений рода *Nicotiana* [4]. Хлоропластная трансформация других ценных сельскохозяйственных культур, например, картофеля, томатов, капусты, кукурузы и др. до сих пор остается затруднительной. Имеется лишь несколько успешных работ по трансформации хлоропластной ДНК, например, для

Lycopersicon esculentum [9], *Lesguerella fendleri* [10], *Petunia hybrida* [11], *Glycine max* [12].

Что касается трансформации хлоропластной ДНК растений картофеля, то цитируемые работы остаются пока единственными [13, 14].

Нами методом биолистической трансформации сегментов междоузлий были получены растения *Solanum rickii* Corr. с трансформированными пластидами, имеющие ген *aadA* [15, 16].

Осуществление трансформации хлоропластной ДНК картофеля как с помощью «прямой» трансформации протопластов, так и с использованием метода биолистической трансформации листьев, междоузлий, клубней требует высокой эффективности регенерации растений. Объективные трудности в решении этой задачи вызваны как отсутствием надежных и воспроизводимых методик регенерации растений из протопластов, так и значительными различиями в регенерационной способности разных сортов картофеля [17]. Возможное решение проблемы получения транспластомных растений рода *Solanum* заключается в использовании соматической гибридизации. Этот метод позволяет создавать растения с новыми признаками, причем сконструированные соматические гибриды могут иметь наборы генов, которые не удается получить с помощью полового скрещивания.

Слияние протопластов трансгенных растений, которые имеют в хлоропластной ДНК встроенный чужеродный ген, и протопластов растений, трансформация которых затруднена, позволяет решить проблему пластомной трансформации и таким образом создавать ценные сельскохозяйственные растения с необходимыми признаками. Этот подход к решению проблемы был использован Сытник и др. [18]. Авторами была показана возможность получения транспластомных растений *Salpiglossis sinuata* путем переноса трансформированных пластид от гибрида *Nicotiana tabacum* (+*S. sinuata*) после слияния изолированных протопластов.

Целью нашей работы был перенос трансформированных хлоропластов *S. rickii* с геном *aadA* в картофель путем слияния мезофильных протопластов *Solanum tuberosum* сортов Луговской и Славянка с мезофильными протопластами полученного нами ранее транспластомного растения *S. rickii*.

Материалы и методы. ***Растительный материал.*** В эксперименте были использованы полученные нами трансформированные растения *S. rickii*, имеющие в хлоропластах ген *aadA* (устойчивые к стрептомицину и спектиномицину), и ядерные трансгенные растения *S. tuberosum* сортов Луговской и Славянка, имеющие ген *nptII* (устойчивые к канамицину).

Растения выращивали в асептических условиях на среде MS [19] без гормонов при 16-часовом световом фотопериоде и температуре 22–24 °С. Размножали растения черенкованием на той же среде.

Выделение и слияние протопластов, культивирование продуктов слияния. Мезофильные протопласты выделяли по методике [20]. Слияние протопластов проводили по модифицированной методике [21]. Культивирование продуктов слияния осуществляли в жидкой культуральной среде WSS [20] с 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (0,2 мг/л), нафтилуксусной кислотой (2 мг/л), бензиламинопурином (0,5 мг/л). Антибиотики добавляли в концентрациях 30 мг/л канамицина, 100 мг/л стрептомицина и 50 мг/л спектиномицина.

Через 1 сут продукты слияния заплавляли в альгинатную пленку по модифицированной нами методике. Для этого продукты слияния центрифугировали в 0,5 М растворе маннита, осадок ресуспендировали в этом же растворе, добавляли 1 % раствора альгината натрия в соотношении 1 : 2, перемешивали и по каплям вводили непосредственно в жидкую среду WSS в чашках Петри. В течение 15–20 мин происходило застывание альгинатной пленки.

Селекцию гибридных колоний проводили по их способности к биосинтезу хлорофилла на среде, содержащей одновременно три антибиотика.

Для индукции морфогенеза использовали последовательную смену сред: STA (SH с добавлением бензиламинопурина 0,5 мг/л, нафтилуксусной кислоты 0,1 мг/л) и STC (SH с зеатином 1 мг/л и гиббереллловой кислотой 1 мг/л) [22, 23]. Через 1 мес после слияния концентрации антибиотиков в культуральной среде повышали: канамицина до 50 мг/л, стрептомицина до 200 мг/л, спектиномицина до 100 мг/л. Регенеранты укореняли на безгормональной

Рис. 1. Исходные растения (*а – S. rickii*, *б – S. tuberosum*) и микроколонии, полученные после слияния протопластов *S. rickii* и *S. tuberosum* (*в*)

агаризованной среде MS с антибиотиками в той же концентрации.

Выделение и молекулярный анализ ДНК. Суммарную ДНК экстрагировали из свежих листьев СТАВ-методом [24]. Полимеразную цепную реакцию проводили на амплификаторе Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) с термостатированной крышкой в пробирках с ультратонкими стенками.

Реакционная смесь состояла из однократного ПЦР-буфера с сульфатом аммония, 0,2 мкМ соответствующих праймеров, 200 мкМ каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов, 0,5 ед. TaqДНК-полимеразы, 2,0 мМ хлорида магния, 10–50 нг ДНК-пробы. Общий объем реакцинной смеси составлял 20 мкл.

Для подтверждения присутствия гена *aadA* использовали пару праймеров 5'-catttgtacggctccgcagtg-3' и 5'-attttgccggttactgcgctg-3', специфичных к внутренней части гена *aadA*. Размер амплифицированного с помощью этих праймеров фрагмента составляет 513 п.н.

Для подтверждения присутствия гена *nptII* использовали пару праймеров 5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' и 5'-gctctagatccagagtcccgctcagaag-3'. Размер амплифицированного с помощью этих праймеров фрагмента составляет 622 п.н.

Природу хлоропластной ДНК гибридных растений, полученных после слияния, изучали исследованием рестриктных спектров ПЦР-амлифицированного фрагмента хлоропластного участка *atpH–atpI*. Для этого были использованы праймеры 5'-ttgaccaactccaggtccaa-3' и 5'-ccgcagcttatataggcgaa-3'. Амплифицированный фрагмент (1282 п.н.) обрабатывали рестриктазой HaeIII. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле.

Анализ ядерной ДНК осуществляли с помощью одиночного праймера (tcc) ×5.

Происхождение митохондриальной ДНК регенерировавших растений исследовали с помощью рестриктных спектров митохондриальных генов *ndhI*. Для ПЦР-амплификации фрагментов этого гена использовали праймеры 5'-gcattacgatctgcagctca-3' и 5'-gcagctcgattagtttctgc-3'. Амплифицированный фрагмент (1500 п.н.) обрабатывали рестрикционной эндонуклеазой AluI.

Результаты исследований и их обсуждение. В качестве донора трансформированных хлоропластов были использованы полученные нами ранее с использованием метода биолистической трансформации транспластомные растения *S. rickii*. Они имели в хлоропластах ген *aadA*. Продукт этого гена, фермент аминогликозид-3'-аденилтрансфераза, обеспечивает устойчивость растений к антибиотикам стрептомицину и спектиномицину. Эти транспластомные растения длительно (более трех лет) культивировались на среде, содержащей 200 мг/л стрептомицина и 100 мг/л спектиномицина, при этом стабильно сохраняли зеленую окраску. Другим партнером для слияния были выбраны растения картофеля двух сортов – Луговской и Славянка, которые ранее были трансформированы и содержали в ядерной ДНК ген *nptII* (Е. Кищенко, Институт клеточной биологии и генетической инженерии, неопубликованные данные) (рис. 1, *а*, *б*).

Через 1 сут после слияния культуру смешивали с раствором альгината натрия и по каплям вводили непосредственно в жидкую среду в чашки Петри. Такой способ иммобилизации протопластов давал возможность получения очень тонкой пленки, что способствовало лучшему доступу культуральной среды к культи-

вируемым клеткам. При этом сокращалось число необходимых манипуляций. Отпадала необходимость использования среды с высоким содержанием ионов кальция и последующего переноса пленки в жидкую среду. В дальнейшем по мере роста микроколоний пленку не растворяли, а просто переносили на агаризованную среду.

При культивировании микроколоний (рис. 1, *в*) селекцию осуществляли по признаку устойчивости одновременно к трем антибиотикам – канамицину (ядро *S. tuberosum*), стрептомицину и спектиномицину (хлоропласты *S. rickii*). Предполагалось, что такая схема селекции даст возможность отобрать именно те продукты слияния, которые имеют одновременно ген *nptII* и ген *aadA*, а значит, ядерную ДНК *S. tuberosum* и хлоропласты *S. rickii*.

Для селекции продуктов слияния к культуральной среде через 11–28 сут добавляли канамицин, стрептомицин и спектиномицин. Введение одновременно трех антибиотиков в концентрациях 30 мг/л канамицина, 100 мг/л стрептомицина и 50 мг/л спектиномицина не позднее, чем через 14 сут после слияния, приводило к существенному увеличению как количества зеленых колоний, так и регенерировавших зеленых растений (таблица).

Так, при добавлении антибиотиков через 11–14 сут после слияния изолированных протопластов *S. rickii* и *S. tuberosum* (Луговской) эффективность регенерации зеленых растений, которую определяли как отношение количества регенерировавших колоний к первоначально отобранному количеству микроколоний, составляла 13,25–14,89 %. При увеличении периода культивирования продуктов слияния в среде без антибиотиков до 18–28 сут наблюдали значительное снижение эффективности регенерации зеленых растений, которая составляла 0,78–1,32 %.

Через 2 мес после слияния изолированных протопластов *S. rickii* и *S. tuberosum* (Луговской) в четырех экспериментах на среде STA было отобрано 505 зеленых микроколоний, а после слияния изолированных протопластов *S. rickii* и *S. tuberosum* (Славянка) – 396 зеленых колоний. При дальнейшем культивировании на среде STA с антибиотиками часть зеленых колоний погибла.

Рис. 2. Гибридные растения: *а*, *б* – *S. rickii* × *S. tuberosum* (Славянка); *в* – *S. rickii* × *S. tuberosum* (Луговской)

Это может быть связано как с несбалансированностью генома гибридных клеток, так и с недостаточным количеством трансформированных пластид *S. rickii* в гетеропластидных гибридных клетках.

После регенерации на среде STC, содержавшей одновременно три антибиотика, было получено 252 зеленых растения. Все они имели нормальную морфологию, укоренялись на среде с антибиотиками. По форме листовых пластинок в культуре *in vitro* часть растений делились на несколько групп – приближающиеся к форме листьев *S. tuberosum*; прибли-

Зависимость эффективности регенерации зеленых растений от длительности роста микроколоний на среде без антибиотиков

Длительность роста на среде без антибиотиков, сут	Количество			Эффективность регенерации зеленых растений, %
	отобранных колоний на среде WSS + ant	зеленых колоний на среде STA + ant	регенерировавших колоний на среде STC + ant	
11	400	376	53	13,25
14	188	109	28	14,89
18	256	9	2	0,78
28	304	11	4	1,32

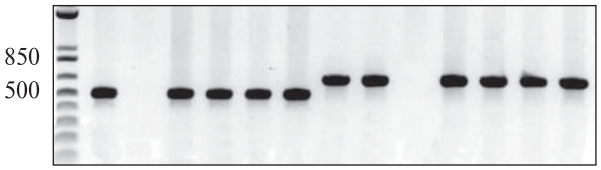

Рис. 3. ПЦР-анализ суммарной ДНК на присутствие в гибридах генов *aadA* (*1–4*) и *nptII* (*5–8*); *S.t.* – *S. tuberosum*, *S.r.* – *S. rickii*; *S.t.*L – картофель, сорт Луговской; *S.t.*S – картофель, сорт Славянка, М – маркер

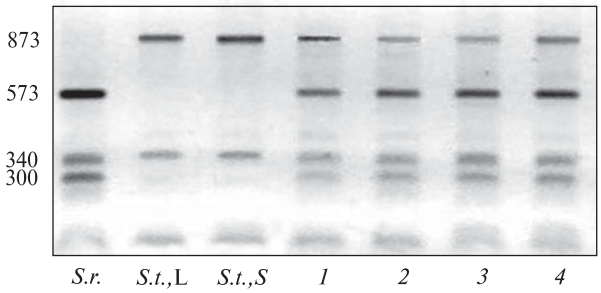

Рис. 4. Гидролиз амплифицированного фрагмента *atpH-atpI* хлоропластной ДНК рестриктазой HaeIII. *S.r.* – *S. rickii*; *S.t.*L – картофель, сорт Луговской; *S.t.*S – картофель, сорт Славянка; *1*, *2* – гибридные растения *S.r.* × *S.t.*S; *3*, *4* – гибридные растения *S.r.* × *S.t.*L

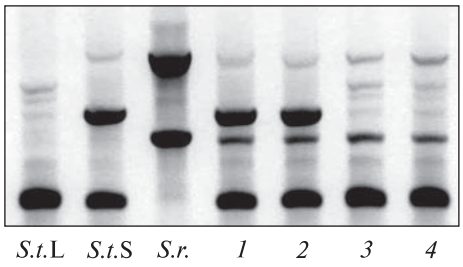

Рис. 5. ПЦР-анализ ядерного генома с использованием праймера (tcc) × 5: *S.t.*L – *S. tuberosum,* сорт Луговской; *S.t.*S – *S. tuberosum,* сорт Славянка; *S.r.* – *S. rickii*; *1*, *2* – гибриды *S.r.* × *S.t.*S; *3*, *4* – гибриды *S.r.* × *S.t.*L

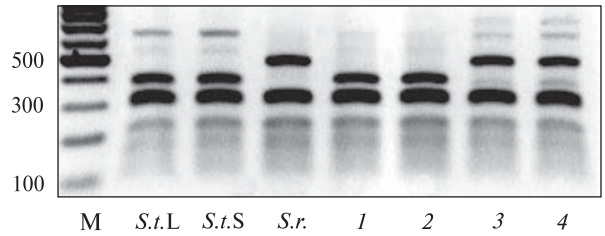

Рис. 6. ПЦР-анализ митохондриального генома: *S.t.*L – *S. tuberosum,* сорт Луговской; *S.t.*S –*S. tuberosum,* сорт Славянка; *S.r.* – *S. rickii*; *1*, *3* – гибриды *S.r.* × *S.t.*S; *2*, *4* – гибриды *S.r.* × *S.t.*L, М – маркер

жающиеся к форме листьев *S. rickii*; промежуточные (рис. 2).

В связи с тем, что исходные растения *S. rickii* имели ген *aadA*, который определял устойчивость к стрептомицину и спектиномицину, а растения *S. tuberosum* сортов Славянка и Луговской имели ген *nptII*, который должен был обусловить их устойчивость к канамицину, при слиянии протопластов в условиях селективного давления можно было ожидать регенерации растений, устойчивых к трем антибиотикам, т.е. таких, которые имеют одновременно гены *aadA* и *nptII*.

Для выявления этих генов в полученных после слияния протопластов растениях был использован метод полимеразной цепной реакции. Для молекулярно-биологических анализов были отобраны 33 гибридные линии, представляющие все характерные фенотипы. Анализ 17 зеленых растений, полученных после слияния протопластов *S. rickii* и *S. tuberosum* сорта Луговской, и 16 зеленых растений, полученных после слияния протопластов *S. rickii* и *S. tuberosum* сорта Славянка, показал, что все они имели как ген *aadA*, так и ген *nptII* (рис. 3), кроме одного растения S1–117, имевшего только ген *aadA*.

Происхождение пластомного генома определяли при помощи рестриктного анализа участка хлоропластной ДНК между генами *atpH* и *atpI*. Изучение природы хлоропластной ДНК растений-регенерантов показало, что они имели последовательности обоих родителей (рис. 4), и только у растения S1-117 присутствовала хлоропластная ДНК *S. rickii*.

Ядерный геном гибридов изучали с помощью одиночного праймера (tcc) × 5. Было показано, что изученные растения имели последовательности ядерной ДНК, характерные как для *S. rickii*, так и для *S. tuberosum* (рис. 5). У растения Sl1–117 выявлена только ядерная ДНК *S. rickii*.

При исследовании митохондриального гена *ndhI* оказалось, что его рестриктный спектр преимущественно наследовался или от *S. rickii,* или от *S. tuberosum* (рис. 6). Это свидетельствует о том, что наследование митохондрий у гибридов происходило случайным образом.

Результаты анализов позволяют считать растения, полученные после слияния мезофильных протопластов транспластомного *S. rickii* и *S.*

tuberosum (Славянка и Луговской), соматическими гибридами, имеющими последовательности ядерной и хлоропластной ДНК обоих родителей. Только одно из изученных регенерировавших растений имело ядерный и хлоропластный геном исходного *S. rickii.*

Таким образом, можно сделать заключение, что использование селективного давления при наличии у одного из родителей маркерного гена в хлоропластах, а у другого в ядерной ДНК дает возможность с большой вероятностью получить гибридные растения, имеющие маркерные гены обоих родителей.

Проведенные исследования по слиянию мезофильных протопластов показали возможность получения соматических гибридов *S. rickii* × *S. tuberosum*. Для достижения этой цели были использованы устойчивые к спектиномицину и стрептомицину трансластомные растения *S. rickii* и устойчивые к канамицину трансгенные растения *S. tuberosum* сортов Славянка и Луговской. Гибридные растения имели ядерный и хлоропластный геном от обоих родителей. Использование при культивировании продуктов слияния и регенерации растений селективных сред, содержащих одновременно канамицин, стрептомицин и спектиномицин, дало возможность с высокой эффективностью отобрать гибридные растения. Присутствие генов *aadA* и *nptII* в гибридах было подтверждено с помощью ПЦР-анализов. Таким образом метод слияния изолированных протопластов может быть использован для переноса трансформированных хлоропластов и получения трансластомных растений культурных сортов картофеля.

N.A. Matvieieva, A.M. Shakhovsky, N.V. Kuchuk

SOMATIC HYBRIDS AMONG TRANSGENIC *SOLANUM TUBEROSUM* AND TRANSPLASTOMIC *SOLANUM RICKII*

The hybrid plants with transformed plastids were regenerated after fusion of mesophyll protoplasts of *Solanum rickii* with *aadA* chloroplast selective marker gene and *Solanum tuberosum* with *nptII* nuclear selective marker gene. The hybrid callus clones were selected on the medium containing streptomycine, spectinomycine and kanamycine. The hybrids were identified on the base of PCR analysis of nuclear and plastid DNAs. The analysis have shown that regenerated plants were somatic hybrids containing *aadA* and *nptII* genes, *Solanum rickii* and *Solanum tuberosum* nuclear and chloroplast DNA.

Н.А. Матвєєва, А.М. Шаховський, М.В. Кучук

СОМАТИЧНІ ГІБРИДИ МІЖ ТРАНСГЕННИМИ РОСЛИНАМИ КАРТОПЛІ *SOLANUM TUBEROSUM* ТА ТРАНСПЛАСТОМНИМИ РОСЛИНАМИ *SOLANUM RICKII*

Проведено експерименти по злиттю мезофільних протопластів *Solanum tuberosum* (сортів Луговський та Слов'янка) з геном *nptII* в ядерній ДНК та отриманої нами раніше трансластомної рослини *Solanum rickii* з геном *aadA*. На селективному середовищі, що містило одночасно антибіотики канаміцин, спектиноміцин та стрептоміцин, було отримано гібридні рослини, що мали гени *aadA* та *nptII*, хлоропласти *S. rickii* та *S. tuberosum* і гібридний ядерний геном. Ці дані було підтверджено результатами ПЦР-аналізів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кучук Н.В.* Генетическая инженерия высших растений. – Киев : Наук. думка, 1997. – 152 с.
2. *McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J., Hogan P.S., Stalker D.M., Maliga P.* Amplification of the chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco // Biotechnology. – 1995. – **13.** – P. 362–365.
3. *Daniell H., Datta R., Varma S., Gray S., Lee S.B.* Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome // Nature Biotechnol. – 1998. – **16**. – P. 345– 348.
4. *Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P.* Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1990. – **87**. – P. 8526– 8530.
5. *Staub J.M., Maliga P.* Expression of chimeric *uidA* gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995. – **87.** – P. 8526–8530.
6. *Golds T., Maliga P., Koop H.-U.* Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* // Biotechnology. – 1993. – **11**. – P. 95–97.
7. *Potrykus I., Shillito R.D., Saul M.W., Paszkow- ski J.* Direct gene transfer. State of the art and future potential // Plant Mol. Biol. Rep. – 1985. – **3**. – P. 117–128.
8. *Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C.* High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // Nature. – 1987. – **327**. – P. 70–73.
9. *Ruf S., Hermann M., Berger I.J., Carrer H., Bock R.* Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nature. Biotechnol. – 2001. – **19** (9)**.** – P. 870–875.
10. *Skarjinskaia M., Svab Z., Maliga P.* Plastid transforma-

tion of *L. fendleri,* an oilseed Brassicaceae // Transgenic Res. – 2003. –**12**. – P. 115–122.
11. *Zubko M., Zubko E., Van Zuilen K., Meyer P., Duy A.* Stable transformation of petunia plastids // Transgenic Res. – 2004. – **13.** – P. 523– 530.
12. *Duformantel N., Pelissier B., Garson F. et al.* Generation of fertile transplastome soybeen // Plant Mol. Biol. – 2004. – **55**. – P. 479–480.
13. *Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J.M., Nehra N.S.* Stable chloroplast transformation in potato : use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. – 1999. – **19** (2)**.** – P. 209–216.
14. *Thant Thi Nguyen et al.* Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solonum tuberosum* L.) // Plant Sci. – 2005. – **168**. – P. 1495–1500.
15. *Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Кучук Н.В.* Генетическая трансформация хлоропластной ДНК *Solanum rickii* // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 5. – С. 3–9.
16. *Матвеева Н.А., Момот В.П., Шаховський А.М., Кучук Н.В.* Регенерация цибридных растений *Lycopersicon peruvianum* (*Solanum rickii*) с трансформированными хлоропластами // Цитология и генетика. – 2005. – **39**, № 6. – С. 3–9.
17. *Seabrook J.A., Douglass L.K., Tai G.C.C.* Segregation for somatic embrygenesis on stem-internode explants from potato seedlings // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 2001. – **65**. – P. 69–73.
18. *Сытник Е.С., Парий А.Ф., Комарницкий И.К., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В.* Анализ ядерного и митохондриального геномов у транспластомных растений *Salpiglossis sinuata*, полученных путем переноса трансформированных пластид от цибрида *Nicotiana tabacum* (+*S. sinuata*) // Цитология и генетика. – 2003. – **37**, № 5. – С. 3–9.
19. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Phys. Plant. – 1962. – **15.** – P. 473– 497.
20. *Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М.* Соматическая гибридизация пасленовых. – Киев : Наук. думка, 1985. – 130 с.
21. *Menczel L., Nagy F., Kiss Z., Maliga P.* Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of *Nicotiana tabacum* + *Nicotiana knightiana*: Correlation of resistance to *Nicotiana tabacum* plastids // Theor. Appl. Genet. – 1981. – **59**. – P. 191–195.
22. *Shepard J.F., Totten R.E.* Mesophyll cell protoplasts of potato // Plant Physiol. – 1977. – **60**. – P. 313–316.
23. *Shepard J.F.* Abscisic acid-enhanced shoot initiation in protoplast-derived calli of potato // Plant Sci. Lett. – 1980. – **18**. – P. 334.
24. *Дрейпер Дж., Скотт Р.* Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // Генная инженерия растений. – М.: Мир, 1991. – С. 241–245.

Поступила 20.03.07