



# Poszerzenie zmienności genetycznej z wykorzystaniem somatycznej hybrydyzacji w obrębie *Gramineae*

Jan J. Rybczyński

Ogród Botaniczny – Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej,  
Polska Akademia Nauk, Warszawa

## Increase of genetic variability by somatic hybridization in *Gramineae*

### Summary

The paper reviews somatic hybridization of grasses and cereals. The following subjects are discussed: 1) methods of somatic embryo production, 2) levels and methods used for somatic hybrids' description 3) species participating in hybridization programs, 4) traits used for selection of somatic hybrids in *in vitro* culture, 5) agricultural traits searched in particular combination of hybridization, 6) ploidy of somatic regenerants and their isoenzymatic variation.

### Key words:

grasses, cereals, donor, recipient, protoplast fusion, somatic hybrids, various analysis.

## 1. Wstęp

Wyjście roślin z wody, pierwotnego środowiska, przyczyniło się do rozwoju zarówno ciała rośliny w części somatycznej jak i narządów rozmnażania generatywnego. Proces ewolucji narządów generatywnych zmierzał do jak najgłębszego zachowania szczególności komórek żeńskich i wytworzenia systemu immunologicznego rośliny, który tylko selektywnie akceptuje ziarno pyłku i rozwijającą się z niego łagiewkę pyłkową, zapewniającą dostanie się komórek plemnikowych do komórki jajowej. Na tej drodze istnieje cały szereg barier, które nie pozwalają na dowolne czy raczej spontaniczne mieszanie się bliżej nieokreślonych

### Adres do korespondencji

Jan J. Rybczyński,  
Ogród Botaniczny –  
Centrum Zachowania  
Różnorodności  
Biologicznej,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Prawdziwka 2,  
02-973 Warszawa,  
e-mail:  
jjryb@obneostrada.pl

wartości genetycznych. Dowolność ta mogłaby zagrozić ewolucyjnie ustalonym wartościom genomów definiowanych w ramach pojęcia określającego gatunek. Istnienie, przed- i pozygotycznych barier, które obejmują przestrzeń od zajmowanych środowisk aż po nie dorastającą do woreczka zalążkowego łagiewkę pyłkową poprzez niesprzyjające warunki wzrostu i rozwoju zarodka oraz zaburzonych przemian otaczających jego tkanek w nasieniu i owocu, stanowiło pokusę rozwinięcia systemu zapylania i zapłodnienia *in vitro*. Możliwość wyizolowania samych komórek generatywnych i manipulowanie nimi otworzyła nową drogę dla lepszego poznania procesu zapłodnienia i pierwszych podziałów komórkowych zygoty u roślin. W przypadku procesu indukowanej różnymi czynnikami hybrydyzacji somatycznych komórek diploidalnych stworzona została droga uzyskiwania całkowicie nowych aranżacji genowych zbóż i traw znajdujących zastosowanie w rolnictwie.

## 2. Drogi modyfikacji genomu roślinnego

Droga modyfikowania genomu jednoliściennych roślin uprawnych w miarę postępu naukowego i technologicznego wiodła przez następujące etapy: krzyżowanie oddalone (międzyrodzajowe i międzygatunkowe), mutacje (chemiczne i fizyczne) somatyczną hybrydyzację (symetryczną, asymetryczną, hybrydyzację chromosomów metafazalnych i przedwczesną kondensację chromosomów, fuzję gamet), połączenie l-formy *Bacillus subtilis* z protoplastami roślinnymi oraz transformację (pośrednią i bezpośrednią).

Z chwilą, kiedy człowiek zdał sobie sprawę, że istnieje możliwość wpływania na produktywność hodowanych przez niego roślin minęło wiele czasu nad wypracowaniem metod selekcji i krzyżowania, czy krzyżowania i selekcji. Wykorzystanie zdefiniowanych przez Mendla praw dziedziczenia, rozwinięcie teorii Morgana oraz ustalenie praw rządzących kodem genetycznym przyczyniło się do maksymalnego wykorzystania puli genowej roślin uprawnych. Znalezienie spontanicznych mieszańców pszenicy i żyta było wskazaniem, że istnieje możliwość skrzyżowania międzyrodzajowego roślin należących do *Gramineae*. Wykorzystując kulturę niedojrzałych zarodków mieszańcowych uzyskano szereg w naturze nie występujących międzygatunkowych i międzyrodzajowych mieszańców generatywnych w obrębie i pomiędzy trawami i roślinami zbożowymi (1).

Niektóre fizyczne i chemiczne czynniki powodują nieodwracalne uszkodzenia kodu genetycznego, jednakże w kontrolowanych warunkach mogą być wykorzystywane do kierunkowego wywoływania mutacji. Wyselekcjonowanie osobników posiadających cechy stanowiące obiekt zainteresowania przyczyniło się do np. zasiedlania przez nowe odmiany nie tylko nowych, ale i całkowicie odmiennych obszarów kuli ziemskiej niejednokrotnie różnych od tradycyjnych terenów uprawy. Poprawienie cech agrarnych roślin uprawnych jest przykładem wykorzystania mutagenyzy w produkcji nasiennej i poszerzenia zasobów żywnościowych świata. Utrwale-

nie cech zainteresowania wymaga wieloletniej pracy głównie wykorzystującej krzyżowanie wsteczne w celu utrwalenia danej cechy w formie homozygotycznej. Proces ten uległ znaczącemu skróceniu poprzez wykorzystanie zdolności komórek szlaku generatywnego do podziałów komórkowych indukowanych odpowiednimi warunkami kultury i roślinnymi regulatorami wzrostu głównie auksynami i cytokinami.

Haploidyzacja na drodze androgenezy (kultury pylników lub izolowanych mikrospor), gynogenezy (kultura żeńskich elementów kwiatu) lub eliminacji chromosomów to droga efektywnego uzyskiwania roślin o zredukowanej liczbie chromosomów. Podwojenie liczby chromosomów w wyniku zachodzącego spontanicznie procesu diploidyzacji wywołanym warunkami kultur *in vitro* lub traktowaniem źdźbeł roztworami kolchicyny znacząco przyczyniło się do skrócenia czasu potrzebnego do uzyskania homozygotyczności danej cechy i wyprowadzenia nowej wartości genetycznej. Jakkolwiek należy podkreślić, że na tej drodze uzyskiwano cały szereg aneuploidalnych form, chociaż pełne tetraploidalne formy mogą stanowić nowe całkowicie nieoczekiwane wartości hodowlane.

Somatyczna hybrydyzacja roślin wyższych opiera się na dwóch podstawowych zasadach: 1) „dodawania” cech charakterystycznych dla dwóch partnerów fuzji, przy czym tylko niektóre z cech są przekazywane do potomstwa lub 2) komplementarności wykorzystywanej w przypadku dalece odległych hybrydyzowanych form oraz bardzo zmanipulowanych ich komórek. Wysoce asymetryczna somatyczna hybrydyzacja jest najlepszym przykładem tego typu manipulacji, w której jeden z partnerów wskutek użycia promieni jonizujących jest pozbawiony funkcjonalnego jądra, drugi zaś w wyniku traktowania aldehydem jodooctowym funkcjonalnej cytoplazmy. Dalsza selekcja heterokarionów i rozwijających się z nich kultur wraz z regeneratami oparta jest na systemie odporności na chemiczne czynniki selekcji (2). Poziom asymetrycznej somatycznej hybrydyzacji jest efektem współdziałania szeregu zewnętrznych i wewnętrznych czynników, np. dawki napromieniowania protoplastów dawcy, filogenetycznego dystansu pomiędzy partnerami fuzji, liczbą chromosomów każdego z partnerów oraz cyklem komórkowym łączonych na drodze fuzji protoplastów. Podniesienie dawki promieniowania głównie powoduje większą fragmentację i introgresję chromosomów. Przy stosowaniu różnych dawek naświetlenia UV zawartość materiału genetycznego partnerów fuzji jest kontrolowana przez co najmniej jednego z nich (3,4).

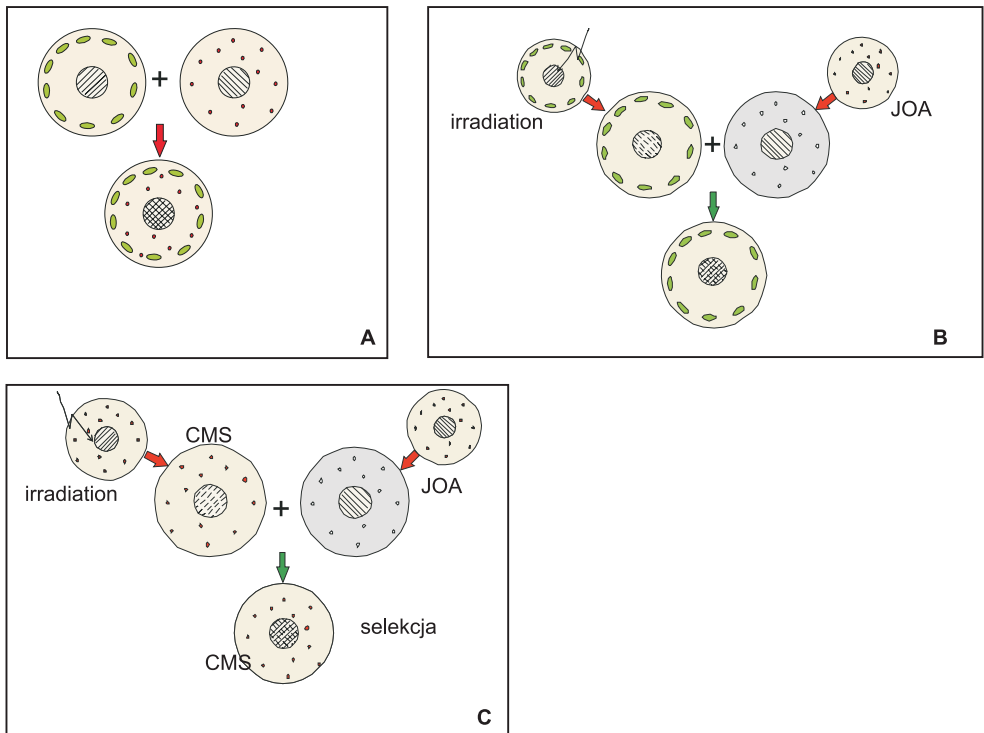
### 3. Metody uzyskiwania somatycznych mieszańców

Podstawową i jedyną metodą uzyskiwania somatycznych mieszańców jest fuzja dwóch nagich protoplastów pochodzących ze znacznie różniących się potencjałem morfogenetycznym tkanek rosnących w warunkach *in vitro* lub *ex vitro*. Czynniki fizyczne i chemiczne wywołują zmiany potencjału elektrycznego oraz sił adhezji pla-

zmolemy protoplastu. W wyniku traktowania protoplastów prądem zmiennym i stałym, następuje najpierw ustawienie protoplastów w „łańcuchy”, a następnie bezpośrednie ich łączenie się w heterokariony zawierające jądra i cytoplazmy obu partnerów (5,6). Inną drogą jest działanie na protoplasty takimi substancjami jak PEG (4000 lub 6000) (3,4,7), solą potasową siarczanu dekstranu,  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  czy glicyną o wysokim pH = 10,5 (8) powodującymi aglutynację, w wyniku czego powstają mosty plazmolemmowe pozwalające na połączenie się cytoplazm fuzjonowanych protoplastów.

#### 4. Gatunki roślin jednoliściennych stanowiące biorców i dawców

Najczęściej stosowanymi gatunkami w różnych programach hybrydacyjnych są: pszenica, ryż, trzcina cukrowa, proso, kostrzewa jako biorcy, aczkolwiek lista gatunków dawców jest o wiele szersza. Przedstawiamy przykłady partnerów somatycznej hybrydyzacji: *T. aestivum* + gatunki bliżej spokrewnione (*Agropyron*



Rys. Schemat fuzji zielonych protoplastów mezofilu liścia i protoplastów zawiesiny komórkowej (A) lub tylko zawiesiny komórkowej (C) wraz z modyfikacjami (B, C); (irradiation – traktowanie promieniami X, ; JOA = amid kwasu jodoctowego, CMS-cytoplazmatyczna męska sterylność.

*elongatum*, *Leymus chinensis*, *Psathycostachys juncea* czy *Haynaldia villosa*) (9,10) albo *T. aestivum* + **gatunki bardziej odległe** (*Bromus inermis*, *Aeleuropus littorulis sinensis*, *Setaria italica*, *Avena sativa*, *Lolium multiflorum* lub *Zea mays*) (11-13) dla *Oryza sativa* + **gatunki bliżej spokrewnione** (*O. officinalis*, *O. eichingeri*, *O. brachyantha* i *O. perreri*) (14) lub *O. sativa* + **gatunki bardziej odległe** (*Hordeum vulgare*, *Echinochloa oryzicola*, *Porteresia coarctata* lub *Daucus carota*) (15-18) lub międzyodmianowe (19,20). Przedstawiono również prace dotyczące pozyskiwania kolejnych mieszańców somatycznych: *Saccharum officinarum* + *Pennisetum americanum* (21,22), *Pennisetum americanum* + *Panicum maximum* (23), *Festuca arundinacea* + *Lolium multiflorum* (24-26) rys.

## 5. Opis somatycznych mieszańców

Wykorzystanie metody somatycznej hybrydyzacji do tworzenia nowych wartości genomowych zachodzi na poziomie pojedynczych komórek, których protoplasty są zmuszane do połączenia się i wymieszania swych wartości genetycznych. Manipulowanie uwolnionym protoplastem narzuca pewne poziomy analizy dla poszczególnych stadiów rozwojowych nowo powstałej wartości biologicznej. Pod uwagę brane są następujące wielkości: efektywność fuzji, wzrost heterokarionów i tkanki hybrydowej, ploidalność tkanki hybrydowej, przeżywalność nowej kultury wobec czynników selekcji, opisanie zdolności morfogenetycznych kultur w celu uzyskania roślin hybrydowych i cybrydowych. Morfologia wraz z płodnością stanowią cechy zawsze analizowane. Określana liczba chromosomów zwykle uzupełniana jest analizą zawartości i poziomem DNA w komórkach za pomocą metody cytometrii przepływową. Potwierdzenia hybrydowego charakteru wyprowadzonych roślin dokonuje się przy użyciu analizy izoenzymatycznej peroksydaz czy dehydrogenaz. Analiza genomu na poziomie molekularnym pozwala nam ostatecznie opisać hybrydowy charakter nowo powstałej rośliny na drodze analizy DNA: jądrowego, chloroplastowego i mitochondrialnego.

## 6. Selekcja mieszańców somatycznych

Zróznicowanie morfologiczne zielonych protoplastów komórek mezofilu liścia oraz białych protoplastów embriogenicznych tkanek kalusowych czy zawiesin komórkowych jest, spośród szeregu kombinacji programów fuzji, najczęściej stosowanym jej modelem. W przypadku takiej kombinacji protoplastów zwykle jeden z partnerów, pochodzący z komórek mezofilu, jest niezdolny do dzielenia się w stworzonych warunkach kultury. Przykładem tego typu jest somatyczna hybrydyzacja pomiędzy *Oryza sativa* ( $2n = 24$ ) + *Porteresia coarctata* ( $2n = 48$ ), w której regeneraty miały diploidalną liczbę chromosomów  $2n = 72$ . Uwidaczniały się cechy charakterystyczne dla obu partnerów, jak np. tolerancja na zasolenie, purpurowe pochwki liś-

ciowe oraz erekcyjny typ wzrostu źdźbeł wraz z szybkim wzrostem roślin i system korzeniowy ryżu (17).

Hodowla *in vitro* stwarza również możliwości uzyskiwania na drodze mutagenetyki kultur odpornych na różnego rodzaju czynniki chemiczne. Analog aminokwasowy 5-metylo-tryptofan (5MT) jest jednym z czynników, które pozwalają na wyprowadzenie zawiesin komórkowych. Protoplasty tych kultur nie posiadają zdolności do regeneracji, ale w fuzji ich heterokariony łatwo dają się wyselekcjonować. Ich zdolności regeneracyjne ulegają odtworzeniu na drodze komplementarności z drugim partnerem. Przykładem tego typu somatycznej hybrydyzacji jest fuzja między komórkami zawieszinowymi *Oryza sativa* i mezofilowymi protoplastami *Hordeum vulgare* (15). Tworzenie wysoce asymetrycznego płodnego mieszańca somatycznego uzyskano pomiędzy napromieniowanymi promieniami gamma, zielonymi protoplastami mezofilu liścia *Zebrania latifolia* a protoplastami ryżu o inaktywowanej amidem kwasu jodooctowego cytoplazmie (2). W somatycznej hybrydyzacji wykorzystuje się bardziej skomplikowane systemy selekcji, u podstawy których leży oporność jednego partnera na różne czynniki chemiczne np. S-2-amino-etylo-L-cysteiny (AEC), zaś jego protoplastowa cytoplazma jest inaktywowana amidem kwasu jodooctowego. Protoplasty drugiego partnera i heterokariony mogą rozwijać się w kolonie komórkowe. Przeniesienie ich na pożywkę z AEC powoduje jedynie wzrost kultur hybrydowych, które mogą wykazywać zdolności regeneracyjne. Taki system selekcji wykorzystano w fuzji pomiędzy *Pennisetum americanum* a *Panicum maximum* (23).

## 7. Uwarunkowania wykorzystania niektórych cech w somatycznej hybrydyzacji

Przekazanie cech ważnych rolniczo było podstawowym celem omawianych eksperymentów. Brano pod uwagę odporności na choroby wirusowe, grzybowe oraz wykorzystanie następujących cech gatunków dawców jak: wysoka wartość ziarniaków, zdolność do silnego krzewienia się, czy tolerancja na zasolenie. Szczególnie ciekawym przypadkiem eksperymentowania była próba uzyskania somatycznych mieszańców pomiędzy gatunkiem o typie fotosyntezy C4 *Echinochloa oryzicola* + *Oryza sativa* o C3 typie asymilacji dwutlenku węgla czy *Zea mays* + *Triticum aestivum* (16,7), które analizowano tylko pod względem cytogenetycznym, a nie fizjologicznym.

Regeneranty hybrydowe uzyskane z fuzji protoplastów charakteryzują się większą zmiennością w porównaniu z roślinami otrzymywanymi drogą krzyżowania generatywnego. U podstawy tej zmienności leżą następujące mechanizmy: 1) długoterminowy wzrost produktów fuzji w warunkach kultur *in vitro*, 2) niestabilność kombinacji jądrowych mogących prowadzić do utraty ekspresji genów lub fizycznej utraty części informacji genetycznej oraz 3) cytoplazmatyczna i jądrowa segregacja. Efektem współdziałania tych trzech mechanizmów jest aneuploidalność hybrydów (cybrydów) przy bardzo znaczącym zróżnicowaniu genotypowym.

Cytoplazmatyczna męska sterylność jest szeroko znana u roślin wyższych. Ona to hamuje rozwój dojrzałego pyłku i jest produktem niezgodności pomiędzy genomem jądrowym i cytoplazmatycznym. Przekazanie cechy cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS) pomiędzy odmianami *Oryza sativa* z wykorzystaniem fuzji protoplastów dwóch zawiesin komórkowych uzyskano stosując X-terapię, dezaktywując genom jądrowy odmiany męskosterylnej oraz jodowanie (JOA – amid kwasu jodoctowego) protoplastów odmiany płodnej. 80% uzyskanych na drodze elektrofuzji roślin hybrydowych wykazywało męską sterylność (25) rys. Wykazano również, że cytoplazmatyczne mieszańce posiadały rozkład prążków izoenzymatycznych peroksydazy jak płodna forma, podczas gdy w genomie mitochondrialnym były cztery plazmidowo podobne DNA pochodzące ze sterylnej formy A-58 CMS (26,27). Ostatecznie na podstawie analizy mtDNA cybryd wykazano istnienie różnego od partnerów fuzji zestawu fragmentów restrykcyjnych (28), zaś po analizie *Southern blot* występowanie plazmidów mitochondrialnego DNA w innej kombinacji somatycznej hybrydyzacji w przekazywaniu CMS w obrębie *Oryza sativa* (5).

## 8. Ploidalność somatycznych regeneratów

Warunki kultury niejednokrotnie indukują zmianę ploidalności materiału roślinnego, a stosowane manipulacje, którym poddawane są jądra jednego z partnerów fuzji poszerzają zakres zmienności genomu jądrowego. Zrównoważenie materiału genetycznego pomiędzy partnerami fuzji jest, jak się wydaje, ważniejsze niż absolutna liczba chromosomów. Stąd też analiza produktów fuzji wymaga zastosowania nie tylko opisu liczby i struktury chromosomów, ale również określenia ilości DNA w jądrach komórek mieszańcowych za pomocą cytometrii przepływowej i tą drogą określenia poziomu ploidalności (29). U somatycznych mieszańców *Oryza sativa* ( $2n = 24$ ) + *Porteresia coarctata* ( $2n = 48$ ) stwierdzono alloploidalność ( $2n = 6x = 72$ ), która potwierdziła posiadanie zestawów chromosomów obu partnerów fuzji (17). Manipulacje genomem jądrowym jednego z partnerów wpłynęły zasadniczo na szereg przemian chromosomowych, prowadzących do uzyskania somatycznych mieszańców o szerokim spektrum ploidalności (3,4,30,31).

## 9. Izoenzymatyczna zmienność somatycznych regeneratów

Do zobrazowania mieszańcowego charakteru uzyskanych regeneratów zastosowano analizę izoenzymatyczną szeregu enzymów: esterazy (3,9,12,14,32), peroksydazy (3,11,12,15), dehydrogenazy jabłczanowej (3,30), dehydrogenazy alkoholowej (23,30), katalazy (10), dehydrogenazy glutaminowej (30), dehydrogenazy fosfoglukonianu (21), dehydrogenazy szikimowej (21), kwaśnej fosfatazy (30), aminotransfe-

razy asparaginowej (30), izomerazy glukofosforanowej (30), fosfoglukomutazy (30), lecytynowej aminopeptydazy (16) oraz aminopeptydazy (23).

Wykorzystując analizę izoenzymów fosfoglucoizomerazy wykazano uzyskanie mieszańców w obrębie gatunku *Lolium perenne* w przypadku fuzji mającej na celu przeniesienie CMS pomiędzy jego odmianami (28). Charakter mieszańcowy *T. aestivum* + *Haynaldia villosa* potwierdzono występowaniem dodatkowego prążka esterazy na żelu poliakrylowym w porównaniu do obu partnerów fuzji (32). Izoenzymatyczna analiza *T. aestivum* + *Avena sativa* z wykorzystaniem dwóch systemów: esterazy oraz peroksydazy uwidoczniała zróżnicowanie występowania nowych prążków w przypadku badania produktów symetrycznej i asymetrycznej fuzji (31). W szerokim spektrum analizy izoenzymatycznej somatycznych mieszańców pomiędzy dwoma liniami *Oryza sativa* w programie przeniesienia CMS analizowano izoenzymatyczny wzór następujących enzymów: dehydrogenazy alkoholowej, glutaminowej, katalazy, kwaśnej fosfatazy, fosfoglukomutazy, izomerazy glukofosforanowej i tylko peroksydaza wykazała znaczne różnice w rozłożeniu prążków izoenzymatycznych (14).

## 10. Podsumowanie

Somatyczna hybrydyzacja stanowić może alternatywną drogę uzyskiwania mieszańców międzygatunkowych dla zbóż i traw. Mając na uwadze, że somatyczna hybrydyzacja roślin jednoliściennych, ze względu na stosunkowo łatwą utratę zdolności morfogenetycznych kultur w warunkach *in vitro*, jest skomplikowaną manipulacją nagich protoplastów, zwrócono uwagę na następujące problemy: metody uzyskiwania somatycznych mieszańców, poziomy i metody analizy wykorzystywane w opisie somatycznych mieszańców, gatunki roślin jednoliściennych stanowiące biorców i dawców, cechy wykorzystywane w selekcji mieszańców somatycznych, rolniczo ważne cechy szczególnie poszukiwane w poszczególnych kombinacjach somatycznej hybrydyzacji oraz ploidalność regeneratów i ich izoenzymatyczną zmienność.

## Literatura

1. Zwierzykowski Z., Apolinarska B., Sodkiewicz W., Kosmala A., Leśniewska-Bocianowska A., (2004), w: *Genetyka w ulepszaniu roślin użytkowych*, red. Krajewski P., Zwierzykowski Z., Kachlicki P., Instytut Genetyki Roślin PAN, Warszawa, 39-60.
2. Liu B., Liu Z. L., Li X. W., (1999), TAG, 98, 1099-1103.
3. Xiang F., Xia G., Zhi D., Wang J., Nie H., Chen H., (2004), Genome, 47, 680-688.
4. Cheng A. X., Xia G. M., Zhi D. Y., Chen H. M., (2004), Cell Research, 14, 86-91.
5. Kyoizuka J., Kaneda T., Shimamoto K., (1989), Bio/Technology, 7, 1171-1174.
6. Kovacs M., Barnabas B., Kranz E., (1995), Plant Cell Reports, 15, 178-180.
7. Szarka B., Göntér I., Molnár-Láng M., Mórocz S., Dudits D., (2002), TAG, 105, 1-7.
8. Davey M. R., Short K. C., (1973), in: *Protoplastes et fusion de cellulose somatiques vegetales*, de l'Institut National de Recherches Agronomique, Paris, 437-453.

9. Xia G., Chen H., (1996), *Plant Science*, 120, 197-203.
10. Xia G., Li Z., Wang S., Xiang F., Liu J., Chen P., Liu D., (1998), *Plant Science*, 137, 217-223.
11. Xu C., Xia G., Zhi D., Xiang F., Chen H., (2003), *Plant Science*, 165, 1001-1008.
12. Wei Y., Guangmin X., Daying Z., Huimin C., (2001), *Plant Science*, 161, 259-266.
13. Cheng A., Xia G., (2004), *Plant Sciences*, 166, 1216-1226.
14. Hayashi Y., Kyoizuka J., Shimamoto K., (1988), *MGG*, 214, 6-10.
15. Kisaka H., Kisaka M., Kanno A., Kameya T., (1994), *Plant Cell Rep.*, 17, 362-367.
16. Terada R., Kyoizuka J., Nishibayashi S., Shimamoto K., (1987), *MGG*, 210, 39-43.
17. Jelodar N. B., Blackhall N. W., Hartman T. V. P., Brar D. S., Khush G., Davey M. R., Cocking E. C., Power J. B., (1999), *TAG*, 99, 570-577.
18. Kisaka H., Lee H., Kisaka M., Kanno A., Kang K., Kameya T., (1998), *TAG*, 89, 365-371.
19. Toriyama K., Hinata K., (1988), *TAG*, 76, 665-608.
20. Akagi H., Taguchi T., Fujimura T., (1995), *TAG*, 91, 563-567.
21. Tabaeizadeh Z., Ferl R. L., Vasil I. K., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5616-5619.
22. Tabaeizadeh Z., Pring R. D., Vasil I. K., (1987), *Plant Mol. Biol.*, 8, 509-513.
23. Ozias-Atkins P., Ferl R. J., Vasil I. K., (1986), *MGG*, 203, 365-370.
24. Spangenberg G., Valles M. P., Wang Z. Y., Montavo P., Nagel J., Potrykus I., (1994), *TAG*, 88, 509-519.
25. Spangenberg G., Wang Z. Y., Legris G., Montavon P., Takamizo T., Perez-Vicente R., Valles M. P., Nagel J., Potrykus I., (1995), *Euphytica*, 85, 235-245.
26. Takamizo T., Spangenberg G., Sugino K., Potrykus I., (1991), *MGG*, 231, 1-6.
27. Akagi H., Sakamoto M., Negishi T., Fujimura T., (1989), *MGG*, 215, 501-506.
28. Yang Z-Q., Shikanai T., Yamada Y., (1988), *TAG*, 76, 801-808.
29. Creemers-Molenaar J., Hall R. D., Krens F. A., (1992), *TAG*, 84, 763-770.
30. Yang Z-Q., Shikanai T., Mori K., Yamada Y., (1989), *TAG*, 77, 305-310.
31. Xiang F., Xia G., Chen H., (2003), *Plant Science*, 164, 697-707.
32. Zhou A., Xia G., Zhang X., Chen H., Hu H., (2001), *MGG*, 26, 387-393.