

Гипометилирование ДНК побегов подсолнечника

Е. Н. Тищенко, Л. П. Корж

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
Ул. Васильковская, 31/17, Киев, 03022, Украина

*Показано дифференциальное метилирование CpCpGrG- и CpCrA/TrGrG-мотивов ДНК подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) при прорастании и индукции органогенеза в каллусе меристем. Обсуждается роль варибельности энзиматической модификации цитозина в ходе роста и дифференцировки подсолнечника.*

Введение. В ДНК многих организмов осуществляется энзиматическое метилирование цитозина с образованием 5-метилцитозина (5mC). Отличительной особенностью высших растений является высокий уровень метилирования их ДНК. Ранние исследования показали, что цитозин в ДНК растений преимущественно метилируется в симметричных CpG- и CpNpG-мотивах (N — любой нуклеотид), в последнее же время установлено, что это основание часто подвергается модификации и в асимметричных мотивах ДНК эндогенных генов, мобильных генетических элементов и трансгенов [1–3].

В отличие от прокариотов значение метилирования цитозина в ДНК клеток эукариотов менее изучено. В частности, накоплены экспериментальные факты, свидетельствующие об ингибировании транскрипции тканеспецифичных генов позвоночных, ДНК которых модифицирована [4]. Не столь широко исследованы тканеспецифичные гены растений, для которых при их транскрипции также наблюдается деметилирование цитозина в кодирующих и промоторных областях [5, 6]. Метилирование ДНК рассматривается как механизм, контролирующей активность мобильных генетических элементов [1, 2]. Весомым свидетельством возможного участия метилирования в регуляции активности генов является молчание трансгенов, ДНК которых метилирована [7]. Однако имеются и исключения. Так, для растений показано отсутствие корреляции между степенью метилирования ДНК и уровнем экспрессии как генов [8], так и трансге-

нов [9]. А в ряде случаев, наоборот, активность генов связана с повышенным метилированием цитозина эукариот [10]. Следует отметить, что взаимосвязь метилирования с экспрессией генов имеет, главным образом, коррелятивный характер, до сих пор остается открытым вопрос — является энзиматическая модификация цитозина причиной или следствием ингибирования транскрипции генов эукариотов.

Мутации гена метилтрансферазы мыши впервые показали, что метилирование ДНК может иметь важное значение для нормального развития животных [11]. Об этом же свидетельствуют и результаты трансформации арабидопсиса антисмысловым геном метилтрансферазы (MET1), а также данные исследования *ddm1*-мутантных (пониженный уровень метилирования) растений этого вида [1,10,12]. В MET1-трансгенных растениях наблюдается уменьшение уровня метилирования ДНК, что приводит к аномальному развитию, в частности, к значительным морфологическим изменениям, включающим гомеотические трансформации органов цветка. В таких растениях отмечается aberrантная экспрессия гомеотических генов, которые, в норме функционируя в цветках, начинают экспрессироваться в листьях трансгенных растений [12]. Исследования MADS бокс гена, кодирующего репрессор цветения, более конкретно указывают на связь энзиматического метилирования с развитием растений [13].

В предыдущих исследованиях нами установлено [14], что в морфогенезе подсолнечника осуществляется дифференциальная экспрессия генов, а именно, в двухдневных этиолированных пророст-

ках экспрессируются 94000 разных генов, тогда как в корнях пятидневных — 21300. Исходя из того, что в побегах пятидневных этиолированных проростков, в отличие от корней, наблюдается интенсивное гипометилирование CpCpGpG-мотивов ДНК, предположили существование возможной связи метилирования с экспрессией группы генов этого вида [15]. В данной работе показано, что дифференциальному метилированию подвергаются и другие палиндромные участки генома, в частности, CpCpA/TrGpG-последовательности ДНК. Для выяснения значения варибельности метилирования сайт-специфичных последовательностей генома в развитии подсолнечника представляет интерес изучение меристем побега и корня, в результате непрерывной активности которых формируются все морфологические структуры растений. В связи с этим на модельной системе — каллус меристем побега и корня — исследовали динамику изменения уровня метилирования в CpCpGpG- и CpCpA/TrGpG-мотивах на ранних этапах индукции органогенеза.

Материалы и методы. Объектом исследования была ДНК подсолнечника сорта Передовик (ВНИИМК, Россия) из побегов двухдневных и корней пятидневных этиолированных проростков, а также как из первичных и морфогенных каллусов апикальных меристем побега и корня, так и вегетативных почек из каллуса побега. Семена подсолнечника проращивали в термостате при температуре 25 °С в рулонах фильтровальной бумаги, смоченной дистиллированной водой. Для получения первичного каллуса стерильные семянки подсолнечника помещали на агаризованную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) с половинной минеральной основой без гормонов и выращивали в термостате при температуре 28—30 °С с 14-ч фотопериодом в течение двух недель. Исходным материалом для индукции каллусных культур служили изолированные корневые и стеблевые меристемы (около 500 мкм) на модифицированной МС-среде, содержащей 1 мг/л кинетина, 0,5 мг/л бензиламинопурина, 2 мг/л нафтилуксусной кислоты, 3 % сахарозы, 0,5 % агара, pH 6,0. Каллусообразование происходило на 3—4-й день. Для индукции морфогенеза каллус меристем побега, а также корня пассировали на среду того же состава без гормонов, в которой концентрация минеральных компонентов и сахарозы была уменьшена в 2 и 1,5 раза соответственно. На 7—8-й день наблюдали образование зеленого компактного каллуса меристем побега, а спустя еще две недели — вегетативных почек. В такие же сроки формировался морфогенный каллус меристем корня и происходил ризогенез.

ДНК выделяли по модифицированному нами методу Деллапорта [15]. Размер ДНК в 0,6 %-м агарозном геле соответствовал 30000—40000 парам нуклеотидов (п. н.). Препараты ДНК, концентрация которых составляла 1—3 мкг/мкл, обрабатывали рестриктазами *MspI*, *XhoI*, *PvuII*, *Sall* («Диалат» ЛТД, Россия), *SmaI*, *EcoRI* («Promega», США), *DraII*, *Sau3AI*, *MboI*, *PstI*, *HindIII* («Fermentas», Литва). Каждую партию очищенной ДНК тестировали на присутствие ингибиторов ферментов рестрикции совместным гидролизом с ДНК бактериофага λ . Предварительно подбирали условия, достаточные для полного гидролиза ДНК каждой рестриктазой. На 1 мкг ДНК брали 4—10 ед. акт. рестриктаз и инкубировали в соответствующих буферах («Boehringer Mannheim Biochemical», Германия) в течение 3—5 ч при 37 °С для всех рестриктаз, кроме *SmaI*, которую инкубировали при температуре 25 °С. Реакцию рестрикции останавливали замораживанием. Электрофорез гидролизованной ДНК проводили в 0,8 %-м агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия в 1 × TBE (89 мМ трис, pH 8,0, 89 мМ H₃BO₄, 2 мМ ЭДТА) при напряженности 3—4 В/см в течение 3—4 ч. В работе использовали трис, ЭДТА, агарозу, бромистый этидий фирмы «Serva» (Германия).

Результаты и обсуждение. Характер метилирования ДНК побегов двухдневных и корней пятидневных этиолированных проростков анализировали чувствительными к метилированию ферментами рестрикции различной специфичности. На рис. 1, а, представлены результаты сравнительного изучения продуктов гидролиза ДНК корней и побегов рестриктазой *MspI*, которая узнает и гидролизует CpCpGpG-мотивы ДНК независимо от наличия метильной группы у внутреннего цитозина и не производит разрыва по этому сайту, если внешний цитозин метилирован. В этом эксперименте брали одинаковое количество гидролизующей и нативной ДНК, составляющее около 15 мкг. Электрофоретические подвижности в агарозном геле нативной и обработанной *MspI* ДНК корней имеют статистически незначимые расхождения, следовательно, ДНК этого органа не расщепляется *MspI* и в пределах чувствительности используемого метода внешние остатки цитозина в CpCpGpG-сайтах ДНК корней метилированы. В то же время рестриктаза *MspI* гидролизует ДНК побегов на большое количество фрагментов широкого диапазона молекулярных масс. Причем в области ниже 2000 п. н. отчетливо видны фрагменты ДНК различного размера. Это указывает на присутствие ряда регулярно расположенных неметилированных остатков 5'-цитозина CpCpGpG-сайтов вдоль полинуклео-

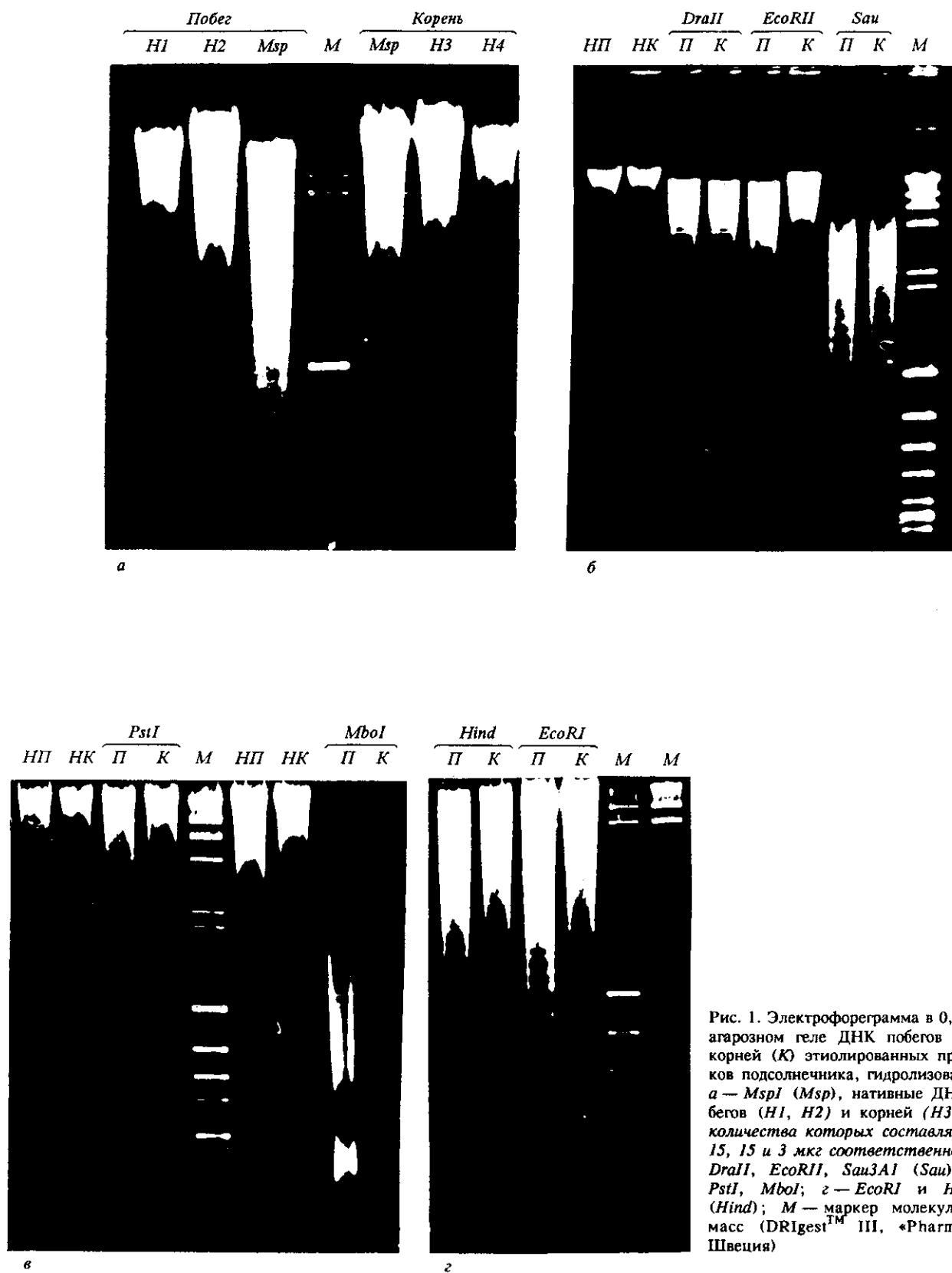


Рис. 1. Электрофореграмма в 0,8 %-м агарозном геле ДНК побегов (П) и корней (К) этилированных проростков подсолнечника, гидролизованных: а — *MspI* (*Msp*), нативные ДНК побегов (H1, H2) и корней (H3, H4), количества которых составляют 5, 15, 15 и 3 мкг соответственно; б — *DraII*, *EcoRII*, *Sau3AI* (*Sau*); в — *PstI*, *MboI*; г — *EcoRI* и *HindIII* (*Hind*); М — маркер молекулярных масс (DRigest™ III, «Pharmacia», Швеция)

тидной последовательности ДНК. Происходящее смещение полосы продуктов гидролиза ДНК побегов относительно нативной ДНК при одинаковом и меньшем количествах последней свидетельствует о том, что преобладающее большинство фрагментов ДНК, средний размер которых составляет 30000—40000 п. н., содержит сайты расщепления этой рестриктазы. Учитывая, что размер генома подсолнечника равен $9,8 \cdot 10^8$ п. н., число сайтов, узнаваемых *MspI*, составляет не менее 25000. Исходя из этого в ДНК побегов осуществляется интенсивное гипометилирование внешних остатков цитозина CpCpG палиндромных участков.

Различия в электрофоретических подвижностях наблюдаются и между продуктами гидролиза ДНК проростков рестриктазой *EcoRII*, которая производит разрывы в последовательностях CpCpA/TrCpG независимо от того, метилирован или нет 5'-цитозин, и не переваривает ДНК, если внутренний цитозин метилирован. В отличие от *MspI*, *EcoRII* частично гидролизует ДНК корней, однако подвижности *EcoRII*-продуктов гидролиза ДНК побегов выше, чем таковых корней. Следовательно, внутренние остатки цитозина CpCpA/TrCpG-мотива в ДНК корней имеют более высокий уровень метилирования, чем в ДНК побегов. ДНК побегов и корней слабо гидролизуются *PstI* (рис. 1, б), которая не рестриктирует CpTrCpCpA/G-сайты, содержащие метилированные внешние остатки цитозина. Между профилями их электрофореграмм различия небольшие, в частности, в ДНК побегов наблюдается фрагмент размером 4400 п. н.

На этих же фотографиях (рис. 1, б и в) показаны результаты гидролиза ДНК проростков рестриктазами *DraII*, *Sau3AI* и *MboI*. Последние два фермента являются изошизомерами, узнающими CpArTrC-мотивы. *MboI* в отличие от *Sau3AI* переваривает ДНК независимо от наличия метильной группы у цитозина. При сравнении профилей электрофореграмм видно, что каждая из этих изошизомеров в одинаковой степени рестриктирует ДНК как в побегах, так и корнях, однако интенсивность гидролиза *MboI* выше, чем *Sau3AI*. Это означает, что многие CpArTrC-палиндромные участки генома подсолнечника подвергаются метилированию. *DraII*, которая не фрагментирует A/GpCpNpCpC/T-сайты, если второй внутренний цитозин метилирован, гидролизует ДНК побегов и корней в равной мере. В то же время *EcoRI* и *HindIII*, узнающие иные асимметричные последовательности (CpArArTrTrC и ArArCpCpTrT) и не гидролизующие ДНК, если остатки цитозина в них энзиматически модифицированы, по-разному рестриктируют ДНК корней и побегов. Электрофо-

ретические подвижности в агарозном геле *EcoRI*- и *HindIII*-продуктов гидролиза ДНК (рис. 1, в) корней меньше, чем ДНК побегов. В большей степени эти различия проявляются для рестриктазы *EcoRI*.

При обработке ДНК побегов и корней проростков подсолнечника рестриктазами *XhoI*, *SalI*, *SmaI*, *PvuII* (данные не приведены) достоверных различий в подвижностях нативных и гидролизующих ДНК не наблюдалось, видимо, в этом случае осуществляется метилирование преобладающего большинства сайтов узнавания этих ферментов.

Таким образом, при выяснении природы метилируемых палиндромных участков ДНК этиолированных проростков подсолнечника установлено, что энзиматической модификации подвергаются остатки цитозина как в симметричных CpG- и CpNpG-последовательностях, так и в асимметричных мотивах ДНК. В частности, в последних метилируются ArArCpCpTrT-сайты, а также CpArTrC- и CpArArTrTrC-последовательности, в которых, возможно, эта модификация осуществляется в тех остатках цитозина, за которыми следует гуанин.

Наиболее важно, что в ходе роста и дифференцировки *H. annuus* в специфичных сайтах генома происходит переменное метилирование цитозина. Так, преобладающее большинство CpCpG-последовательностей, которые в ДНК корней метилированы, в ДНК побегов гипометилированы. То же можно сказать и о CpCpA/TrCpG- и CpArArTrTrC-мотивах, хотя уровень гипометилирования в них меньше, чем в первом палиндромном участке. Причем в случае недометилирования многих остатков цитозина выявлена определенная регулярность расположения вдоль полинуклеотидной последовательности ДНК. Обращает на себя внимание также тот факт, что сайт-специфичное деметилирование ДНК сопряжено с дифференциальной экспрессией генов подсолнечника. В цитоплазме клеток побегов и корней наблюдаются существенные различия в количестве разнообразных транскрибируемых мРНК, при этом транскрипция большей части генов двухдневных этиолированных проростков в корнях пятидневных этиолированных проростков не иницируется [14]. Большому уровню транскрибируемых генов в побегах сопутствует гипометилирование цитозина, главным образом, в ДНК сайтов узнавания рестриктаз *MspI*, *EcoRII* и *EcoRI* по сравнению с таковыми в ДНК корней. Такое наблюдение, принимая во внимание данные об ингибировании транскрипции индивидуальных генов эукариот, ДНК которых метилирована [1, 4—6], можно рассматривать в пользу высказанного ранее предположения [15] о связи энзиматического

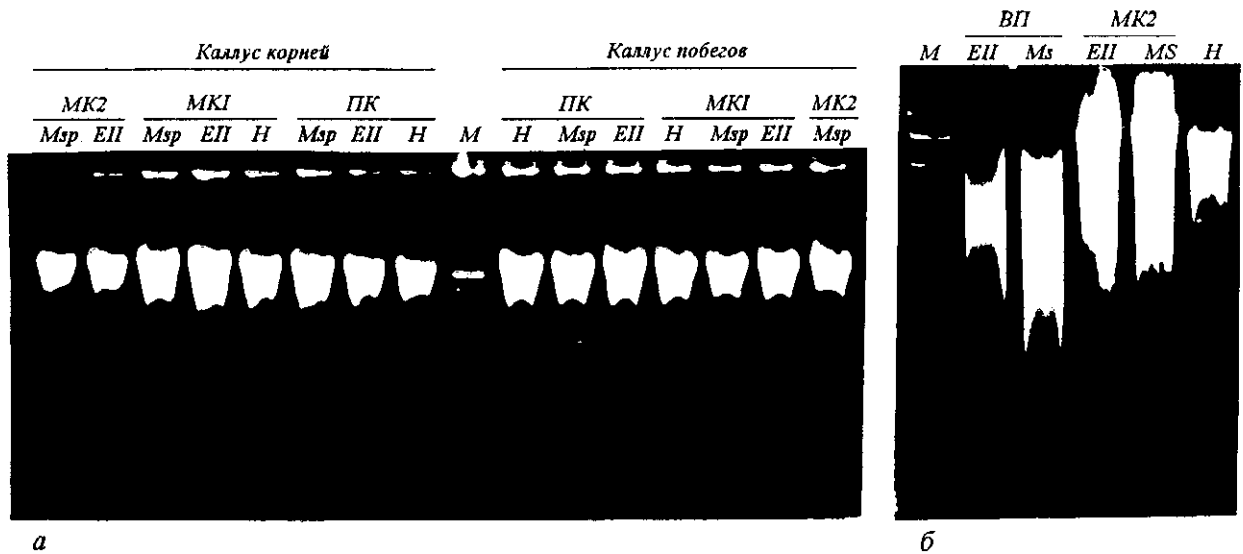


Рис. 2. Электрофореграмма в 0,8 %-м агарозном геле *MspI* (*Msp*)- и *EcoRII* (*EII*)-гидролизатов ДНК первичного (ПК) и морфогенного (МК) каллусов апикальных меристем побегов и корней подсолнечника: а — ПК и МК; б — вегетативных почек (ВП) и МК2, МК1 — МК на раннем этапе индукции, МК2 — МК при формировании вегетативных почек и корней. М — маркер молекулярных масс (ДНК фага λ , рестрицированная *HindIII*); Н — нативная ДНК

метилирования и экспрессии группы генов подсолнечника. И хотя это предположение строится только на корреляции гипометилирования остатков цитозина в многократно представленных палиндромных участках ДНК и активации десятков тысяч генов, можно допустить, что сайт-специфическое деметилирование является составной частью пока что неизвестного триггерного механизма координированной экспрессии генов в морфогенезе подсолнечника.

Для выяснения вопроса о том, когда и как начинает осуществляться переменное метилирование ДНК, на модельной системе (культура каллуса) сравнивали характер метилирования CpCpGrG- и CpCpA/TrGrG-последовательностей ДНК. На рис. 2, а, представлены электрофореграммы нативных и рестрицированных ДНК первичного и морфогенного каллусов апикальных меристем побегов и корней подсолнечника, причем метилирование ДНК морфогенного каллуса рассматривали на начальной этапе его индукции и в период образования вегетативных почек и корней. Электрофоретические подвижности анализируемых ДНК достоверно не различаются. Поскольку в присутствии ДНК подсолнечника ДНК бактериофага λ рас-

щепляется этими рестриктазами, очевидно, что ДНК первичного и морфогенного каллусов не гидролизуется этими рестриктазами и, следовательно, внешние остатки цитозина CpCpGrG-последовательностей и внутренние остатки цитозина CpCpA/TrGrG-сайтов метилированы. Отметим, что нам не удалось индуцировать органогенез, изменив лишь один из компонентов культуральной среды, что позволило бы судить о их взаимосвязи с метилированием.

ДНК вегетативных почек эффективно гидролизуется как *MspI*, так и *EcoRII* (рис. 2, б), вследствие этого CpCpGrG- и CpCpA/TrGrG-сайты интенсивно гипометилированы. В то же время ДНК морфогенного каллуса (количество внесенной ДНК составляло ~15 мкг), собранная вокруг вегетативных почек, оставалась метилированной. Обобщая результаты, представленные на рис. 2, видно, что при индукции каллуса меристем как побега, так и корня наблюдается одинаково высокий уровень метилирования ДНК в сайтах узнавания рестриктаз *MspI* и *EcoRII*. Такой же уровень метилирования сохраняется в морфогенных каллусах разного возраста, однако уже в вегетативных почках происходит гипометилирование обсуждаемых сайтов ДНК

и устанавливается модель метилирования, характерная для ДНК развивающихся проростков *in vivo*. Таким образом, уже на ранних этапах органогенеза в культуре каллуса сопровождается сайт-специфическими изменениями метилирования ДНК. Данные о повышенном уровне метилирования ДНК в индуцированном каллусе моркови [16] согласуются с нашими результатами о высоком уровне метилирования каллуса меристем подсолнечника. Если такой же уровень метилирования сайтов узнавания рестриктаз *MspI* и *EcoRII* присущ и ДНК клеток меристем *in vivo*, можно предположить, что гипометилирование CpCpGrG- и CpCpA/TrGrG-последовательностей осуществляется в начальных фазах прорастания семян подсолнечника (набухание или проклевывание). Следует отметить, что в культуре *in vitro* могут происходить изменения в метилировании ДНК растений [17].

Тем не менее, в литературе имеются противоречивые указания о влиянии сред культивирования на характер метилирования генома растений [18, 19]. Так, в листьях и каллусах *Pennisetum purpureum* уровень метилирования ДНК не меняется, тогда как в ДНК пролиферирующих клеток культур моркови наблюдается положительная корреляция между модификацией цитозина и концентрацией эндогенного ауксина. Для подсолнечника как при низкой концентрации фитогормонов в культуральной среде в процессе каллусообразования, так и при их отсутствии при индукции органогенеза выявлен высокий уровень метилирования, что может указывать на отсутствие взаимосвязи метилирования с концентрацией экзогенных фитогормонов и адекватность модели культуры ткани для исследования метилирования генома подсолнечника *in vivo*. Вариабельность метилирования первичного и морфогенного каллусов апикальных меристем побегов дает основание предположить возможное участие метилирования ДНК подсолнечника в клеточной дифференцировке. Следует подчеркнуть, что морфогенный каллус, так же как и первичный каллус меристем *H. annuus*, имеет высокий уровень метилирования *MspI*- и *EcoRII*-мотивов ДНК. Видимо, деметилирование ДНК не является первичной реакцией на изменение фитогормонального, углеводного и минерального состава среды культивирования при индукции морфогенеза. Наряду с этим, поскольку чувствительность используемых методов исследования не позволяет установить деметилирование ДНК в единичных клетках, можно сделать и противоположное допущение о том, что индукция органогенеза *in vitro* происходит в инициальных клетках каллуса, ДНК которых подверглась гипометилированию.

Таким образом, при прорастании в геноме подсолнечника выявлена сайт-специфичность метилирования цитозина в побегах и корнях. Транскрипция генов в побегах двухдневных этиолированных проростков, в которых экспрессируется приблизительно в 4 раза больше разных генов, чем в корнях пятидневных этиолированных проростков, сопровождается гипометилированием CpCpGrG-, CpCpA/TrGrG- и GpApArTrGrC-последовательностей ДНК. Это свидетельствует о возможной связи метилирования с дифференциальной экспрессией генов в ходе роста и дифференцировки подсолнечника. Вариабельность метилирование CpCpGrG- и CpCpA/TrGrG-мотивов на ранних этапах органогенеза в культуре *in vitro* позволяет предположить, что различия в уровне метилирования ДНК побегов и корней *in vivo* возникают на первоначальных стадиях прорастания семян.

E. N. Tishchenko, L. P. Korzh

DNA hypomethylation of sunflower seedlings

Summary

The DNA methylation in shoots and roots of etiolated seedlings of sunflower (*Helianthus annuus* L.) has been investigated. Using the methyl-sensitive enzymes of restriction we showed that CpCpGrG-, CpCpA/TrGrG- and GpApArTrGrC- sites are subjected to differential methylation. In particular, these DNA motifs are extensively hypomethylated in shoots, where in contrast to roots, diverse genes are expressed almost 4 times more. The organogenesis in the sunflower callus culture of the shoot apical meristem is also accompanied by the reduction in the level of cytosine enzymatic modification in CpCpGrG- and CpCpA/TrGrG-sequences of DNA. A role of the DNA enzymatic methylation variability during growth and differentiation of sunflower is under discussion.

O. M. Тищенко, Л. П. Корж

Гіпометилування ДНК пагонів соняшнику

Резюме

Досліджували метилування ДНК у корнях і пагонах етіолованих проростків соняшнику (*Helianthus annuus* L.). Використовуючи метил-чутливі ферменти рестрикції показано, що CpCpGrG-, CpCpA/TrGrG- і GpApArTrGrC-сайти ДНК піддаються диференційному метилуванню. Зокрема, ці мотиви ДНК інтенсивно гіпометильовані в пагонах, де на відміну від коренів експресується приблизно в 4 рази більше різних генів. Органогенез у культурі калусу апікальних меристем пагону соняшника також супроводжується зниженням рівня ензиматичної модифікації цитозину в CpCpGrG- і CpCpA/TrGrG- послідовностях ДНК. Обговорюється роль варіабельності ензиматичного метилування ДНК у ході росту і диференціювання соняшнику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Finnegan R. J., Genger R. K., Peacock W. J., Dennis E. S. DNA methylation in plants // Annu. Rev.—1998.—49.—P. 223—247.
2. Wang L., Heinlein M., Kunze R. Methylation pattern of activator transposase binding sites in maize endosperm // Plant Cell.—1996.—8, N 4.—P. 747—758.

3. Meyer P., Niedenhof I., ten Lohus M. Evidence for cytosine methylation of non-symmetrical sequences in transgenic *Petunia hybrida* // EMBO J.—1994.—13, N 9.—P. 2084—2088.
4. Singal R., Ferris R., Little J. A., Wang S. Z., Ginder G. D. Methylation of the minimal promoter of an embryonic globin gene silences transcription in primary erythroid cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1997.—94, N 25.—P. 724—729.
5. Bianchi M. W., Viotti A. DNA methylation and tissue-specific transcription of the storage protein genes of maize // Plant Mol. Biol.—1988.—11, N 2.—P. 203—214.
6. Riggs C. D., Chrispeels M. J. The expression of phytohemagglutinin genes in *Phaseolus vulgaris* is associated with organ-specific DNA methylation patterns // Plant Mol. Biol.—1990.—14, N 4.—P. 629—632.
7. Matzke M. A., Matzke A. J. M. How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? // Plant Physiol.—1995.—107.—P. 679—683.
8. Walbot V., Warren C. DNA methylation in the alcohol dehydrogenase-1 gene of maize // Plant Mol. Biol.—1990.—15, N 1.—P. 121—125.
9. Brusslan J. A., Karlin-Neumann G. A., Lu H., Tobin E. M. An arabidopsis mutant with a reduced level of cab 140 RNA is a result of cosuppression // The Plant Cell.—1993.—5, N 6.—P. 667—677.
10. Kakutani T., Jeddalon J. A., Flowers S. K., Munakata K., Richards E. J. Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 12406—12411.
11. Li E., Bestor T. H., Jaenisch R. Targeted mutation of DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality // Cell.—1992.—69.—P. 915—926.
12. Finnegan R. J., Peacock W. J., Dennis E. S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 8449—8454.
13. Sheldon C. C., Burn J. E., Perez P. P., Metzger J., Edwards J. A., Peacock W. J., Dennis E. S. The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation // Plant Cell.—1999.—11, N 3.—P. 445—458.
14. Тищенко Е. Н., Кунцевич В. И., Билинская А. Т., Лобов В. П. Ядерные РНК вегетативных органов *Helianthus annuus* // Физиология растений.—1996.—43, № 2.—С. 213—219.
15. Тищенко Е. Н. Дифференциальное метилирование внешнего остатка цитозина ЦЦГТ-последовательностей ДНК проростков подсолнечника // Доп. НАНУ.—1999.—10.—С. 165—167.
16. Palmgren G., Mattsson O., Okkels F. T. Specific level of DNA methylation in various tissues, cell lines, and cell types of *Daucus carota* // Plant Physiol.—1991.—95, N 1.—P. 174—178.
17. Кунах В. А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования // Физиология растений.—1999.—46, № 6.—С. 919—929.
18. Lo Schiavo F., Pitto L., Giuliano G., Torti G., Nuti-Ronchi V., Marazziti D., Vergara R., Orselli S., Terzi M. DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs // Theor. and Appl. Genet.—1989.—77, N 3.—P. 5—31.
19. Morrish F. M., Vasil I. K. DNA methylation and embryogenic competence in leaves and callus of napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.) // Plant Physiol.—1989.—90, N 1.—P. 37—40.

УДК 547.963.32

Надійшла до редакції 29.03.2000