

OBSAH

PŘEDMLUVA	21
1. ÚVOD DO MOLEKULÁRNÍ GENETIKY A GENOVÉHO INŽENÝRSTVÍ	23
1.1. Izolace a charakteristika DNA	23
1.1.1. Izolace DNA a buněčných jader	23
1.1.2. Charakteristika a měření koncentrace DNA	25
1.1.3. Metoda DNA-DNA hybridizace	26
1.2. Genové inženýrství	28
1.2.1. Restriční endonukleázy	28
1.2.2. Syntéza rekombinovaných molekul DNA in vitro	31
1.2.3. Klonování rekombinované DNA	32
1.2.4. Vektory v genovém inženýrství	32
1.2.5. Zpětná transkripce	33
1.2.6. Genové banky a klonování rostlinné DNA	34
1.2.7. Hybridizace DNA-DNA na filtru po rozdělení restričních fragmentů	35
1.2.8. Sekvenování DNA	36
SOUHRN	37
2. STRUKTURA BUNĚČNÉHO JÁDRA A CHROMOZÓMŮ	39
2.1. Komponenty buněčného jádra	39
2.1.1. Model struktury chromozómů	39
2.1.2. Nukleozómová struktura rostlinných chromozómů	41
2.1.3. Nukleozómy a regulace genové aktivity	43
2.1.4. Kondenzace interfázového chromatinu	44
2.2. Replikace DNA v buněčných jádrech	45
2.2.1. Autoradiografie vláken DNA	46
2.2.2. Velikost replikonů a rychlost replikace	47

2.2.3. Spojování replikonů ve fázi G_2	48
2.2.4. Postupná replikace genomu	49
2.3. Opakující se sekvence DNA	49
2.3.1. Genetický význam opakujících se sekvencí	50
2.3.2. Struktura rostlinného genomu z hlediska sekvencí DNA	51
2.4. Typy podélné diferenciace chromozómů	54
2.4.1. Základní diference	54
2.4.2. Některé vlivy fixačních a barvicích postupů na chromatin	54
2.4.3. Obecná charakteristika technik proužkování	55
2.4.4. Mechanismus proužkování fluorescenčními barvivy	56
2.4.5. Proužkování typu C	57
2.4.6. Proužkování typu N	59
2.4.7. Porovnání proužkování u rostlin a živočichů	60
2.4.8. Proužkování a struktura chromatinu	60
SOUHRN	61
3. NĚKTERÉ TYPY CHROMOZOMÁLNÍ VARIABILITY	62
3.1. Reparace genetického poškození	62
3.2. Crossing over	63
3.2.1. Primární párování chromozómů	64
3.2.2. Synaptonemální komplexy	65
3.2.3. Předmeiotická fáze S a syntéza DNA v zygoténu a pachyténu	66
3.2.4. Mechanismus procesu crossing over	67
3.2.5. Rekombinační uzliny	68
3.3. Výměny mezi sesterskými chromatidami	69
3.3.1. Autoradiografické hodnocení	69
3.3.2. Diferencované barvení chromatid po působení 5-bromdeoxyuridinu	70
3.3.3. Indukce výměn sesterských chromatid	72
3.3.4. Spontánní výměny sesterských chromatid	73
3.4. Chromozomální aberace	73
3.4.1. Klastogeny	73
3.4.2. Klasifikace chromozomálních aberací	74
3.4.3. Hodnocení chromozomálních aberací	75
3.4.4. Molekulární mechanismus působení klastogenů	76
3.4.5. Molekulární mechanismus výměnných chromozomálních aberací	77
3.4.6. Distribuce chromozomálních aberací v genomu	79
3.4.7. Kinetika indukce chromozomálních aberací	80
3.4.8. Chromozomální aberace a výměny sesterských chromatid	81
3.4.9. Achromatické léze a subchromatidové výměny	82
SOUHRN	83
4. GENETIKA SOMATICKÉ ROSTLINNÉ BUŇKY	84
4.1. Rostlinné explantáty	84
4.1.1. Základní technické možnosti práce s rostlinnými tkáňovými kulturami	84
4.1.2. Vliv rostlinného genotypu na růst buněk v tkáňové kultuře	85
4.1.3. Chromozomální variabilita tkáňových kultur	86
4.1.4. Kultivace rostlinných tkáňových kultur	87
4.1.5. Kalusy a buněčné suspenze	88

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие	21
1. ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ГЕНЕТИКУ И ГЕННУЮ ИНЖЕНЕРИЮ.	23
1.1. Выделение и характеристика ДНК	23
1.1.1. Выделение ДНК и клеточных ядер	23
1.1.2. Характеристика и определение концентрации ДНК	25
1.1.3. Метод ДНК-ДНК гибридизации	26
1.2. Генная инженерия	28
1.2.1. Рестриктазы	28
1.2.2. Синтез рекомбинированных молекул in vitro	31
1.2.3. Клонирование рекомбинированной ДНК	32
1.2.4. Векторы в генной инженерии	32
1.2.5. Реверсная транскрипция	33
1.2.6. Генные библиотеки и клонирование растительной ДНК	34
1.2.7. Гибридизация ДНК на нитроцеллюлозном фильтре после распределения фрагментов ДНК	35
1.2.8. Секвенирование ДНК	36
Содержание	37
2. ИЗУЧЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ЯДРА И ХРОМОСОМ.	39
2.1. Компоненты клеточного ядра	39
2.1.1. Модель структуры хромосом	39
2.1.2. Нуклеосомная структура растительных хромосом	41
2.1.3. Нуклеосомы и регуляция активности генов	43
2.1.4. Конденсация интерфазного хроматина	44
2.2. Репликация ДНК в клеточных ядрах	45
2.2.1. Авторадиография волокон ДНК	46

2.2.2.	Длина репликонов и скорость репликации	47
2.2.3.	Соединение репликонов в фазе G_2	48
2.2.4.	Последовательная репликация генома	49
2.3.	Повторяющиеся последовательности ДНК	49
2.3.1.	Генетическое значение повторяющихся последовательностей	50
2.3.2.	Структура растительного генома с точки зрения последовательностей ДНК	51
2.4.	Типы продольной дифференциации хромосом	54
2.4.1.	Основная дифференциация	54
2.4.2.	Влияние фиксаций и красителей на структуру хроматина	54
2.4.3.	Общая характеристика техник формирования полосок	55
2.4.4.	Механизм формирования полосок после действия флуоресцентных красителей.	56
2.4.5.	Полоски типа Ц	57
2.4.6.	Полоски типа Н	59
2.4.7.	Возникновение полосок у животных	60
2.4.8.	Возникновение полосок и структура хроматина	60
СОДЕРЖАНИЕ		61
3. НЕКОТОРЫЕ ВИДЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ ХРОМОСОМ		62
3.1.	Репарация генетического повреждения ДНК	62
3.2.	Кроссинговер	63
3.2.1.	Первичное спаривание гомологичных хромосом	64
3.2.2.	Синаптомемальные комплексы	65
3.2.3.	Предмейотическая S-фаза и зиготенный и пахитенный синтез ДНК.	66
3.2.4.	Механизм кроссинговера	67
3.2.5.	Рекомбинационные узелки	68
3.3.	Обмены между сестринскими хроматидами	69
3.3.1.	Авторадиографическое изучение	69
3.3.2.	Дифференциальная окраска хроматид после включения бромдеоксиуридина	70
3.3.3.	Индукция обменов между сестринскими хроматидами	72
3.3.4.	Спонтанные обмены между сестринскими хроматидами	73
3.4.	Хромосомные аберрации	73
3.4.1.	Кластогены	73
3.4.2.	Классификация хромосомных аберраций	74
3.4.3.	Проявление хромосомных аберраций	75
3.4.4.	Молекулярный механизм действия кластогенов	76
3.4.5.	Молекулярный механизм хромосомных аберраций типа обмена	77
3.4.6.	Распределение хромосомных аберраций в геноме	79
3.4.7.	Кинетика индукции хромосомных аберраций	80
3.4.8.	Хромосомные аберрации и обмен между сестринскими хроматидами	81
3.4.9.	Ахроматические участки и полухроматидные обмены	82
СОДЕРЖАНИЕ		83
4. ГЕНЕТИКА СОМАТИЧЕСКОЙ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ		84
4.1.	Изолированные ткани растений	84
4.1.1.	Основные технические возможности работы с культурами растительных тканей.	84

4.1.2. Влияние растительного генотипа на возраст клеток в культуре тканей . . .	85
4.1.3. Хромосомная неустойчивость культур тканей	86
4.1.4. Выращивание культур растительных клеток	87
4.1.5. Культуры тканей и клеточных суспензий	88
4.1.6. Андрогенез	89
4.1.7. Ауксотрофные мутации в культурах тканей	89
4.2. Протопласты растительных клеток	92
4.2.1. Выделение протопластов	92
4.2.2. Регенерация клеточной обалочки, калогенез и регенерация растений . . .	93
4.2.3. Протопласты и клеточный цикл	94
4.2.4. Сливание протопластов	95
4.2.5. Селекция соматических гибридов	95
4.2.6. Изменчивость набора хромосом после соматической гибридизации	99
4.2.7. Прием оргanelл и микроорганизмов протопластами	100
СОДЕРЖАНИЕ	101

5. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАНИПУЛЯЦИИ С РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКОЙ 102

5.1. Опыты с экзогенной ДНК	102
5.2. Векторы для переноса экзогенной ДНК в растительные клетки	103
5.2.1. Вирус мозаичности цветной капусты	103
5.2.2. Вироиды	105
5.2.3. Свойства ДНК растительных клеточных оргanelл	106
5.2.4. Митохондриальная ДНК]	107
5.2.5. Хлоропластная ДНК	108
5.2.6. Использование ДНК клеточных оргanelл	109
5.3. Контрольные элементы как потенциальные векторы экзогенной ДНК	110
5.3.1. Бактериальные IS-последовательности и транспозоны	110
5.3.2. Контрольные элементы кукурузы и других растений	112
5.3.3. Нестабильные мутации других растительных объектов	115
5.3.4. Выделение контрольных элементов методами геной инженерии	116
5.3.5. Паразитическая ДНК	117
5.3.6. Сравнение контрольных элементов с оперонами	118
5.3.7. Свойства контрольного элемента как вектора экзогенной ДНК	118

СОДЕРЖАНИЕ

119

6. ПЛАЗМИДА *Ti* *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* КАК ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ВЕКТОР ЭКЗОГЕННОЙ ДНК. 120

6.1. Инфекционные свойства <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	121
6.1.1. Процесс индукции растительных опухолей посредством бактерии <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	122
6.1.2. Свойства растительных опухолевых тканей, вызванных бактерией <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	124
6.1.3. Опины- центральные вещества этиологии растительных опухолей	125
6.1.4. Характеристика и стабильность опухолей	129
6.2. Плазмиды <i>Ti</i>	130
6.2.1. Типы плазмид <i>Ti</i>	130
6.2.2. Физическое картирование плазмид <i>Ti</i>	130
6.2.3. Генные карты плазмид <i>Ti</i>	132

6.3. Доказательство наличия последовательностей Т-ДНК в растительных клетках	133
6.3.1. Опухоли — продуценты нопалина	133
6.3.2. Опухоли — продуценты октопина	134
6.4. Транскрипция и трансляция Т-ДНК в растительных клетках	136
6.5. Использование плазмиды Т1 для внесения дальнейших последовательностей в растительные клетки	137
6.5.1. Вызывание инерций ДНК в заранее выбранных локусах Т-ДНК	137
6.6. Мейотический перенос Т-ДНК	140
6.7. Трансформация растительных протопластов	141
6.8. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	142
6.9. Взаимоотношение бактерий <i>Agrobacterium</i> и <i>Rhizobium</i>	143
6.10. Другие растительные опухоли	143
6.10.1. Генетические опухоли	143
6.10.2. Физиологическая индукция опухолевого роста	144
6.10.3. Другие типы опухолей	145
СОДЕРЖАНИЕ	145

7. ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФИКСАЦИИ АТМОСФЕРИЧЕСКОГО АЗОТА	147
7.1. Нитрогеназа	147
7.1.1. Структура нитрогеназы	147
7.1.2. Условия активности нитрогеназы	148
7.1.3. Предохранение активности нитрогеназы от кислорода	149
7.1.4. Генетический контроль нитрогеназной системы.	149
7.2. Симбиоз бактерий <i>Rhizobium</i> со содержащими легуминоз	150
7.2.1. Корневые клубеньки растений — содержащих легуминоз	150
7.2.2. Леггемоглобины и нодулины	150
7.3. Симбиоз азотфиксирующих бактерий с растительными тканевыми культурами	151
7.4. Особые типы симбиотической фиксации молекулярного азота	152
7.5. Генетические манипуляции, применяемые для переноса способности фиксации молекулярного азота	153
7.5.1. Внедрение азотфиксирующих бактерий и синезеленных водорослей в растительные клетки	153
7.5.2. Перенос генов симбиотической фиксации атмосферического азота из легуминоз в другие виды растений.	154
7.5.3. Перенос генов <i>nif</i> из бактерий в растительный геном	154
7.5.4. Перенос генов <i>nif</i> в растительные клеточные органеллы	156

СОДЕРЖАНИЕ	156
----------------------	-----

8.1. Временная амплификация ДНК	160
8.1.1. Временная амплификация ДНК в зоне продолжительного роста корневых верхушки	161
8.1.2. Амплификация ДНК во время перехода из вегетативной в генеративную фазу роста	161
8.1.3. Амплификация ДНК в специализированных тканях	161
8.1.4. Амплификация ДНК в поврежденных тканях растений	162
8.2. Постоянная амплификация ДНК	163
8.3. Несовершенная репликация ДНК	164
СОДЕРЖАНИЕ	165

9. РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ РАСТИТЕЛЬНОГО ГЕНОМА	166
9.1. Уровни регуляции генов растительного генома	166
9.2. Изучение на основе биохимических мутаций	167
9.2.1. Ауксотрофия по тиамину	168
9.2.2. Мутации недостаточности по нитрат редуктазе	169
9.2.3. Недостаточность ферментов фотосинтеза	171
9.2.4. Недостаточность белков для транспорта ионов	171
9.2.5. Генетический блок синтеза фитогормонов	172
9.3. Физиологическое и генетическое изучение экспрессии и регуляции генома	173
9.3.1. Изоферменты и их регуляция	173
9.3.2. Регуляторы роста	175
9.4. Изучение методами молекулярной генетики и геной инженерии	176
9.4.1. Изучение комплексности транскрипции	176
9.4.2. Изучение клонированных генов	178
СОДЕРЖАНИЕ	180

4.1.6. Androgeneze	89
4.1.7. Výživové mutace ve tkáňových kulturách	89
4.2. Protoplasty rostlinných buněk	92
4.2.1. Izolace rostlinných protoplastů	92
4.2.2. Regenerace buněčné stěny, kalogeneze a regenerace rostlin z protoplastů	93
4.2.3. Protoplasty a buněčný cyklus	94
4.2.4. Fúze protoplastů	95
4.2.5. Selektce somatických hybridů	95
4.2.6. Chromozomální poměry po somatické hybridizaci	99
4.2.7. Příjem organel a mikroorganismů	100
SOUHRN	101
5. GENETICKÉ MANIPULACE S ROSTLINNOU BUNKOU	102
5.1. Exogenní DNA	102
5.2. Vektory pro přenos exogenní DNA do genotypu rostlinných buněk	103
5.2.1. Virus mozaiky kvěťáku	103
5.2.2. Viroidy	105
5.2.3. Vlastnosti DNA rostlinných buněčných organel	106
5.2.4. Mitochondriální DNA	107
5.2.5. Chloroplastová DNA	108
5.2.6. Využití organel při genetickém inženýrství	109
5.3. Kontrolní prvky jako potenciální vektory pro přenos exogenní DNA	110
5.3.1. Bakteriální inzerční sekvence a transpozony	110
5.3.2. Kontrolní prvky u kukuřice a dalších rostlin	112
5.3.3. Nestabilní mutace dalších rostlinných objektů	115
5.3.4. Izolace kontrolních prvků metodami genového inženýrství	116
5.3.5. Parazitická DNA	117
5.3.6. Porovnání kontrolních prvků a operonového modelu	118
5.3.7. Vlastnosti kontrolního prvku jako možné složky vektoru pro přenášení genetické informace	118
SOUHRN	119
6. PLAZMID Ti <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	120
6.1. Infekční schopnosti <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	121
6.1.1. Proces indukce rostlinných tumorů působením <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	122
6.1.2. Vlastnosti rostlinných nádorových buněk, indukovaných bakterií <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	124
6.1.3. Opiny jako centrální látky etiologie rostlinných tumorů	125
6.1.4. Charakteristika a stabilita nádorů	129
6.2. Plazmidy Ti	130
6.2.1. Typy plazmidů Ti	130
6.2.2. Fyzikální mapování plazmidů Ti	130
6.2.3. Mapování genů na plazmidech Ti	132
6.3. Důkaz T-DNA v rostlinných buňkách	133
6.3.1. Nopalinové tumory	133
6.3.2. Oktopinové tumory	134
6.4. Transkripce a translace T-DNA v rostlinných buňkách	136
6.5. Využití plazmidu Ti ke vnášení dalších sekvencí DNA do rostlinného genomu	137

6.5.1. Indukce inzercí v předem zvolených úsecích T-DNA	137
6.6. Meiotický přenos T-DNA	140
6.7. Transformace rostlinných protoplastů	141
6.8. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	142
6.9. Vztah rodů <i>Agrobacterium</i> a <i>Rhizobium</i>	143
6.10. Další rostlinné tumory	143
6.10.1. Genetické tumory	143
6.10.2. Genotypově podmíněná náchylnost ke vzniku tumorů	144
6.10.3. Další typy tumorů	145
SOUHRN	145
7. GENETICKÉ STUDIUM FIXACE VZDUŠNÉHO DUSÍKU	147
7.1. Nitrogenáza	147
7.1.1. Struktura nitrogenázy	147
7.1.2. Podmínky aktivity nitrogenázy	148
7.1.3. Ochrana nitrogenázového systému před kyslíkem	149
7.1.4. Genetické založení nitrogenázového systému	149
7.2. Symbióza bakterií rodu <i>Rhizobium</i> s leguminózami	150
7.2.1. Kořenové hlízky	150
7.2.2. Leghemoglobiny a noduliny	150
7.3. Symbióza bakterií fixujících dusík s rostlinnými tkáňovými kulturami	151
7.4. Zvláštní typy symbiotické fixace vzdušného dusíku	152
7.5. Genetické manipulace při přenášení schopnosti fixace vzdušného dusíku	153
7.5.1. Věleňování bakterií nebo sinic fixujících dusík do rostlin	153
7.5.2. Přenášení genů pro symbiotickou fixaci vzdušného dusíku z leguminóz do dalších rostlin	154
7.5.3. Přenášení genů <i>nif</i> z bakterií do rostlinného genomu	154
7.5.4. Vnášení genů <i>nif</i> do buněčných organel	156
SOUHRN	156
8. AMPLIFIKACE A NEÚPLNÁ REPLIKACE DNA	158
8.1. Dočasná amplifikace DNA	160
8.1.1. Dočasná amplifikace DNA v prodlužovací zóně kořene	161
8.1.2. Amplifikace DNA vegetačního vrcholu při přechodu z vegetativní do generativní fáze	161
8.1.3. Amplifikace DNA ve specializovaných pletivech	161
8.1.4. Amplifikace DNA po poranění rostliny	162
8.2. Trvalá amplifikace DNA	163
8.3. Neúplná replikace DNA	164
SOUHRN	165
9. EXPRESE A REGULACE GENŮ ROSTLINNÉHO GENOMU	166
9.1. Úrovně regulace genů rostlinného genomu	166
9.2. Studium na základě biochemických mutací	167
9.2.1. Auxotrofie pro thiamin	168
9.2.2. Mutace deficientní pro nitrátreduktázu	169
9.2.3. Deficience enzymů fotosyntézy	171
9.2.4. Deficience nosičů pro příjem a transport iontů	171

9.2.5. Genetická blokáda syntézy růstových regulátorů	172
9.3. Komplexní fyziologické a genetické studium exprese a regulace genomu	173
9.3.1. Izoenzymy a jejich regulace	173
9.3.2. Růstové regulátory	175
9.4. Studium regulace metodami molekulární genetiky a genového inženýrství	176
9.4.1. Studium komplexnosti transkripce	176
9.4.2. Studium klonovaných genů	178
SOUHRN	180
Seznam literatury	186

CONTENTS

PREFACE	21
1. INTRODUCTION TO MOLECULAR GENETICS AND GENE ENGINEERING	23
1.1. Isolation and characteristics of DNA	23
1.1.1. Isolation of DNA and cell nuclei	23
1.1.2. Characteristics and measurement of DNA concentration	25
1.1.3. DNA-DNA hybridization	26
1.2. Gene engineering	28
1.2.1. Restriction endonucleases	28
1.2.2. DNA recombination in vitro	31
1.2.3. Cloning of recombinant DNA	32
1.2.4. Vectors in gene engineering	32
1.2.5. Reverse transcription	33
1.2.6. Gene libraries and cloning of plant DNA	34
1.2.7. Southern blotting	35
1.2.8. DNA sequencing	36
SUMMARY	37
2. CELL NUCLEUS AND CHROMOSOMES	39
2.1. Cell nucleus constituents	39
2.1.1. Chromosome structure	39
2.1.2. Nucleosomal organisation of plant chromosomes	41
2.1.3. Nucleosomes and the regulation of gene activity	43
2.1.4. Condensation of interphase chromatin	44
2.2. DNA replication and cell nuclei	45
2.2.1. DNA fibre autoradiography	46
2.2.2. Replicon size and velocity of replication	47

2.2.3. Joining of replicons in G_2 phase	48
2.2.4. Sequential genome replication	49
2.3. Repetitive DNA sequences	49
2.3.1. Genetic importance of repetitive sequences	50
2.3.2. The sequence structure of plant genome	51
2.4. Types of longitudinal differentiation of chromosomes	54
2.4.1. General features of longitudinal differentiation	54
2.4.2. Some effects of fixation and staining procedures on chromosome structure	54
2.4.3. General characteristics of banding pattern	55
2.4.4. The mechanism of banding by fluorescence stains	56
2.4.5. C-banding	57
2.4.6. N-banding	59
2.4.7. Banding of plant and animal chromosomes	60
2.4.8. Banding and chromatin structure	60
SUMMARY	61
3. SOME TYPES OF CHROMOSOMAL VARIABILITY	62
3.1. Repair of DNA damage	62
3.2. Crossing over	63
3.2.1. Primary structure of homologous chromosomes	64
3.2.2. Synaptonemal complexes	65
3.2.3. Premiotic S phase and zygotene and pachytene DNA synthesis	66
3.2.4. Mechanism of crossing over	67
3.2.5. Recombination nodules	68
3.3. Sister chromatid exchanges	69
3.3.1. Autoradiographic detection	69
3.3.2. Differential chromatid staining after incorporation of 5-bromodeoxyuridine	70
3.3.3. Induction of sister chromatid exchanges	72
3.3.4. Spontaneous sister chromatid exchanges	73
3.4. Chromosomal aberrations	73
3.4.1. Clastogens	73
3.4.2. Classification of chromosomal aberrations	74
3.4.3. Detection of chromosomal aberrations	75
3.4.4. Molecular mechanism of action of clastogens	76
3.4.5. Molecular mechanism of chromosomal aberrations of the exchange type	77
3.4.6. Distribution of chromosomal aberrations in genome	79
3.4.7. Kinetics of induction of chromosomal aberrations	80
3.4.8. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges	81
3.4.9. Achromatic lesions and sister chromatid exchanges	82
SUMMARY	83
4. PLANT SOMATIC CELL GENETICS	84
4.1. Plant explants	84
4.1.1. Methods of plant tissue cultures	84
4.1.2. The effect of plant genotype on the behaviour of plant tissue cultures	85
4.1.3. Chromosomal variability in tissue cultures	86
4.1.4. Cultivation of plant tissue cultures	87
4.1.5. Callus and cell suspension cultures	88

4.1.6. Androgenesis	89
4.1.7. Nutritional mutations in tissue cultures	89
4.2. Plant protoplasts	92
4.2.1. Isolation of plant protoplasts	92
4.2.2. Cell wall regeneration, callogenesis and plant regeneration	93
4.2.3. Protoplasts and cell cycle	94
4.2.4. Protoplast hybridization	95
4.2.5. Selection of somatic hybrids	95
4.2.6. Chromosomal variability after somatic hybridization	99
4.2.7. Uptake of organelles and microorganisms	100
SUMMARY	101
5. GENETIC MANIPULATION WITH PLANT CELLS	102
5.1. Exogenous DNA	102
5.2. Plant-directed vectors of exogenous DNA	103
5.2.1. Cauliflower mosaic virus	103
5.2.2. Viroids	105
5.2.3. Properties of DNA of plant cell organelles	106
5.2.4. Mitochondrial DNA	107
5.2.5. Chloroplast DNA	108
5.2.6. Use of cell organelles in gene engineering	109
5.3. Controlling elements as potential DNA vectors	110
5.3.1. Bacterial insertion sequences and transposons	110
5.3.2. Controlling elements of maize and other plants	112
5.3.3. Unstable mutations in other plant objects	115
5.3.4. Isolation of controlling elements by gene engineering	116
5.3.5. Parasitic DNA	117
5.3.6. Comparison of controlling elements and operons	118
5.3.7. Properties of controlling elements as possible vectors of exogenous DNA	118
SUMMARY	119
6. Ti PLASMID OF <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> AS ESTABLISHED PLANT — DIRECTED VECTOR OF EXOGENOUS DNA	120
6.1. Virulence of <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	121
6.1.1. Process of induction of crown gall tumors by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	122
6.1.2. Properties of crown gall tumor cells	124
6.1.3. Opines — central substances of the etiology of plant tumors	125
6.1.4. Characteristics and stability of tumors	129
6.2. Ti plasmids	130
6.2.1. Types of plasmids	130
6.2.2. Physical mapping of Ti plasmids	130
6.2.3. Gene mapping of Ti plasmids	132
6.3. Detection of T-DNA in plant cells	133
6.3.1. Nopaline tumors	133
6.3.2. Octopine tumors	134
6.4. Transcription and translation of T-DNA in plant cells	136
6.5. Use of Ti plasmids for introduction of exogenous DNA into plant genome	137
6.5.1. Introduction of insertions in pre-selected T-DNA sites	137

6.6. Meiotic transmission of T-DNA	140
6.7. Crown gall transformation of plant protoplasts	141
6.8. <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	142
6.9. The relationship of <i>Agrobacterium</i> and <i>Rhizobium</i>	143
6.10. Other plant tumors	143
6.10.1. Genetic tumors	143
6.10.2. Physiology of plant tumors	144
6.10.3. Other tumors	145
SUMMARY	145
7. GENETIC STUDY OF DINITROGEN FIXATION	147
7.1. Nitrogenase	147
7.1.1. Nitrogenase structure	147
7.1.2. Conditions of nitrogenase activity	148
7.1.3. Protection of nitrogenase system against oxygen	149
7.1.4. Genetic determination of nitrogenase system	149
7.2. Symbiosis of <i>Rhizobium</i> with leguminous plants	150
7.2.1. Root nodules	150
7.2.2. Leghemoglobin and nodulins	150
7.3. Symbiosis of dinitrogen fixing bacteria with plant tissue cultures	151
7.4. Special types of symbiotic dinitrogen fixation	152
7.5. Genetic manipulation for the transfer of dinitrogen fixation determinants	153
7.5.1. Incorporation of nitrogen fixing bacteria or blue-green algae as permanent symbionts	153
7.5.2. Transmission of genes for symbiotic dinitrogen fixation from legumes to other plants	154
7.5.3. Transfer of <i>nif</i> genes from bacteria to plant genome	154
7.5.4. Transfer of <i>nif</i> genes into plant cell organelles	156
SUMMARY	156
8. AMPLIFICATION AND UNDERREPLICATION OF DNA	158
8.1. Transient DNA amplification	160
8.1.1. Transient DNA amplification before the onset of longitudinal growth of root cells	161
8.1.2. DNA amplification connected with flowering phase induction	161
8.1.3. DNA amplification in specialized tissues	161
8.1.4. DNA amplification after wounding of plant	162
8.2. Permanent and semipermanent DNA amplification	163
8.3. Underreplication of DNA	164
SUMMARY	165
9. REGULATION OF EXPRESSION OF PLANT GENOME	166
9.1. The levels of gene regulation in plant genome	166
9.2. Study of biochemical mutants	167
9.2.1. Thiamine auxotrophy	168
9.2.2. Nitrate reductase deficiency	169
9.2.3. Deficiency of photosynthesis enzymes	171
9.2.4. Deficiency of ion uptake and transport carriers	171
9.2.5. Genetic block in phytohormone synthesis	172
9.3. Physiological and genetic study of regulation of genome expression	173

9.3.1. Isoenzymes and their regulation	173
9.3.2. Growth regulators	175
9.4. Study of gene expression by methods of molecular genetics and gene engineering	176
9.4.1. Study of complexity of transcription	176
9.4.2. Study of cloned genes	178
SUMMARY	180