

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії

На правах рукопису

Щербак Наталія Леонідівна

УДК 604.6:582.926.2:582.998.1 +577.218

**ВИВЧЕННЯ LOX-ОПОСЕРЕДКОВАНОЇ ЕКСПРЕСІЇ ПЕРЕНЕСЕНИХ
ГЕНІВ В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ**

03.00.20 – БІОТЕХНОЛОГІЯ

Дисертація на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Науковий керівник

Кучук Микола Вікторович,

доктор біологічних наук, професор,

член-кореспондент НАН України

Київ – 2015

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
Актуальність теми.....	8
Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.....	11
Мета і завдання дослідження.....	11
Методи дослідження.....	12
Наукова новизна.....	13
Практичне значення отриманих результатів.....	14
Особистий внесок здобувача.....	15
Апробація результатів роботи.....	15
Публікації.....	16
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	19
1.1. Регуляція експресії перенесених генів в генетично модифікованих рослинах.....	19
1.1.1. Загальна будова еукаріотичного промотора РНК полімерази II.....	21
1.1.1.1. Коровий або мінімальний промотор РНК полімерази II.....	22
1.1.1.2. DPE промотор.....	24
1.1.1.3. Проксимальна частина промотору РНК полімерази II.....	24
1.1.1.4. Транскрипційний фактор NF- Υ	25
1.1.1.5. Дистальні елементи еукаріотичного промотору РНК полімерази II.....	26
1.1.2. Регуляторні послідовності, що використовуються в генетичній інженерії рослин.....	27
1.1.2.1. Промотори, що забезпечують конститутивну експресію трансгенів, вірусного та бактеріального походження.....	28
1.1.2.2. Модульна структура 35S промотору.....	28
1.1.2.3. Інші промотори вірусного походження.....	30
1.1.2.4. Переваги та недоліки використання конститутивних промоторів вірусного походження.....	31

1.1.2.5. Штучні (синтетичні) промотори.....	31
1.1.2.6. Індуцибельні промотори, що використовуються в генетичній інженерії рослин.....	33
1.1.2.7. Промотори, що забезпечують конститутивну експресію трансгенів, рослинного походження.....	35
1.1.2.8. Криптичні промоторні послідовності.....	36
1.1.2.9. IRES опосередкована експресія трансгенів.....	39
1.1.2.10. Явище позиційного ефекту та підходи по зменшенню його впливу на експресію трансгенів	40
1.1.2.11. Послідовності, що забезпечують прикріплення хроматину до ядерного матриксу.....	41
1.1.2.12. Інсулятори.....	42
1.2. Cre/lox система рекомбінації бактеріофагу P1 в генетичній інженерії рослин.....	43
1.2.1. Використання Cre/lox системи рекомбінації бактеріофагу P1 для видалення селективних маркерів з геному трансгенних рослин.....	45
1.2.2. Сайт-специфічна інтеграція T-ДНК за допомогою системи рекомбінації Cre/lox.....	47
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	51
2.1. Характеристика реактивів.....	51
2.2. Векторні конструкції та бактеріальні штами.....	52
2.3. Трансформація <i>A. tumefaciens</i> методом електропорації.....	56
2.3.1. Виділення плазмідної ДНК.....	56
2.4. Рослинний матеріал.....	57
2.5. Поверхнева стерилізація насіння та умови культивування рослин.....	57
2.6. Генетична трансформація рослин, опосередкована <i>A. tumefaciens</i>	58
2.6.1. <i>Nicotiana africana</i>	58
2.6.2. <i>Nicotiana tabacum</i>	60
2.6.3. <i>Lactuca sativa</i>	61

2.7. Генетична трансформація рослин <i>N. tabacum</i> за допомогою біолістичного методу.....	61
2.8. Адаптація рослин в ґрунті та обробка гербіцидом.....	62
2.9. Аналіз рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації.....	62
2.9.1. Молекулярно-біологічний аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.....	62
2.9.2. Аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у поєднанні зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР)	64
2.9.3. Гістохімічний аналіз активності β -глюкуронідази.....	65
2.9.4. Флуориметричний метод визначення активності β -глюкуронідази.....	66
2.9.4.1. Екстракція загального водорозчинного білку з листків рослин.....	66
2.9.4.2. Вимірювання концентрації сумарного розчинного білку.....	67
2.10. Агронфільтрація рослин <i>N. benthamiana</i>	67
2.11. Статистична обробка експериментальних даних.....	68
Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	70
3.1. Генетична трансформація рослин <i>N. africana</i>	70
3.1.1. Розробка методики генетичної трансформації <i>N. africana</i>	70
3.1.2. Визначення селективної концентрації антибіотиків та гербіцидів для <i>N. africana</i> в культурі <i>in vitro</i>	73
3.1.3. Отримання та дослідження трансгенних рослин <i>N. africana</i> , які містять <i>lox</i> -сайти рекомбінації.....	74
3.2. Отримання трансгенних рослин <i>Nicotiana tabacum</i> з векторами, що містять послідовність <i>-lox-bar-</i>	80
3.2.1. Молекулярно-біологічний аналіз рослин, що регенерували на селективному середовищі.....	84
3.2.2. Експерименти з векторами, що містять <i>bar</i> ген між <i>lox</i> сайтами в середині конструкції.....	87

3.3. Пряма трансформація тютюну методом бомбардування частинками вольфраму.....	92
3.4. <i>Lox</i> -опосередкована експресія <i>bar</i> гену, при розміщенні <i>lox</i> сайту біля лівого бордеру.....	94
3.5. Дослідження <i>lox</i> -опосередкованої транзійентної експресії <i>bar</i> гену.....	98
3.6. Дослідження <i>lox</i> -опосередкованої експресії гену <i>gus</i>	100
3.6.1. Транзійентна <i>lox</i> -опосередкована експресія гену <i>gus</i>	101
3.6.2. <i>Lox</i> -опосередкована експресія <i>gus</i> гену в стабільно трансформованих рослинах тютюну.....	103
3.7. Аналіз послідовності RB- <i>lox in silico</i>	107
3.8. Генетична трансформація рослин салату <i>Lactuca sativa</i> векторами, що містять <i>lox</i> сайт та <i>bar</i> ген біля правого бордеру.....	109
3.8.1. Визначення селективної концентрації канаміцину та фосфінотрицину для рослин <i>L. sativa</i> в культурі <i>in vitro</i>	109
3.8.2. Отримання та дослідження трансгенних рослин салату, в яких проходить <i>lox</i> -опосередкована експресія <i>bar</i> гену.....	111
УЗАГАЛЬНЕННЯ.....	114
ВИСНОВКИ.....	117
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	119

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БАП	6-бензиламінопурин
2,4-Д	2,4-дихлорфеноксіоцтова кислота
ЗТ-ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція, поєднана зі зворотною транскрипцією
МЕС	2[N-морфоліно]етансульфо кислота
НОК	α -нафтилоцтова кислота
ПВП	полівінілпіролідон
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
п. н.	пара нуклеотидів
Т-ДНК	ділянка ДНК агробактерій, яка переноситься та вбудовується в рослинний геном при трансформації (від <i>англ.</i> Transferred DNA)
ЦТАБ	цетрилтриетиламоній бромід
<i>bar</i>	ген фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази
Cre	рекомбіназа Cre- <i>lox</i> системи бактеріофага P1 (Cyclization recombination protein)
<i>cre</i>	ген рекомбінази Cre- <i>lox</i> системи бактеріофага P1
DPE	регуляторна послідовність, що розміщена в положенні від +28 до +30 пн по відношенню до TSS (Downstream Promoter Element)
GTF	загальні транскрипційні фактори (General Transcription Factors)
GUS	білок β -глюкуронідаза
<i>gusA</i>	ген β -глюкуронідази
<i>hpt</i>	ген гігроміцинфосфотрансферази
IRES	внутрішня ділянка посадки рибосоми (Internal Ribosome Entry Site)
<i>loxP</i>	сайт рекомбінації Cre- <i>lox</i> системи бактеріофага P1 (locus of crossingover (X) in P1)
4-MU	4-метилумбеліферон (4-methylumbelliferone)
4-MUG	4-метилумбеліферил- β -D-глюкуронід (4-Methylumbelliferyl-b-D-glucuronide)

<i>nos</i>	ген нопалінсинтетази
<i>nptII</i>	ген неоміцинфосфотрансферази II
NPTII	неоміцинфосфотрансфераза II
<i>ocs</i>	ген октопінсинтетази
RB, LB	правий та лівий повтори, які обмежують T-ДНК
S/MARs	послідовності, що забезпечують прикріплення хроматину до ядерного матриксу (Scaffold/Matrix Attachment Regions)
35S	послідовність ДНК, що кодує транскрипт 35S вірусу мозаїки цвітної капусти
TBP	ТАТА-зв'язуючий білок (TATA Binding Protein)
TFII	фактори транскрипції РНК полімерази II (Transcription Factors of RNA polymerase II)
TSS	сайт старту транскрипції (Transcription Start Site)
Tris	трис-(гідроксиметил)-амінометан
X-Gluc	5-бром-4-хлор-3-індолілглюкуронід

ВСТУП

Актуальність теми

Для прикладної генетичної інженерії основним завданням залишається удосконалення властивостей культурних рослин відповідно до викликів сучасного світу: врожайність, поживні та харчові якості, стійкість до гербіцидів, біотичних та абіотичних стресів [1, 2, 3, 4]. Успіх при виконанні цих завдань пов'язаний, перш за все, з ефективністю та контрольованістю експресії перенесеного гену, що залежить від цілого ряду причин: комбінації регуляторних елементів, що забезпечують функціонування трансгенів, ділянок рослинного геному, в які відбулась інтеграція, наявності інтронів, кількості вставок Т-ДНК.

Використовуючи трансгенні рослини як модель, генетична трансформація сформувалась у напрямок, завдяки якому виникає унікальна можливість досліджувати фундаментальні питання молекулярної біології. При вивченні функціонування чужорідних генів у трансгенних рослинах були охарактеризовані та досліджені механізми «замовчування» та регуляції експресії перенесених генів, ідентифіковані регуляторні послідовності. Експериментальні дані з вивчення експресії трансгенів, функціонуванню промоторів, енансерів, механізмів дії транскрипційних факторів, а також багатьох інших механізмів реалізації генетичної інформації створюють нові можливості для вивчення фундаментальних питань молекулярної біології та мають практичне застосування при створенні векторів для генетичної трансформації.

Ключова роль в регуляції експресії перенесених генів та рівня накопичення рекомбінантного білку в трансгенних рослинах належить промоторним послідовностям. Починаючи з перших векторів для генетичної трансформації рослин, в яких були використані промотори генів ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens* [5], іде постійний пошук регуляторних послідовностей, які могли б забезпечити необхідний рівень контрольованої

експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. Було клоновано і охарактеризовано велику кількість вірусних та рослинних промоторів, а також виділено основні регуляторні модулі цих послідовностей [6], які згодом успішно були використані як елементи штучних промоторів. Для контролю експресії генів інтересу в трансгенних рослинах найбільш перспективними вважаються індукцйбельні та тканиноспецифічні промотори [6, 7]. Разом з тим, для селекції трансгенних рослин незмінно використовуються конститутивні промотори і традиційно найбільш поширеними є регуляторні елементи, що походять з рослинних патогенів. Ефективність цих промоторів підтверджена багатьма експериментами, але для них залишається проблема «замовчування генів» в результаті метилювання промоторів як механізму захисту рослин від вірусних інфекцій [8, 9, 10, 11, 12], що набуває особливої актуальності при вирощуванні рослин у відкритому ґрунті та їх контакті з природними патогенами. Так, в роботі Al-Kaff et al. [13] повідомлялось, що «замовчування» гену фосфінотрицин-N-ацетилтрансферази (*bar*) під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти в трансгенних рослинах ріпаку відбувалось при інфікуванні рослин цим вірусом.

На сучасному етапі генетичної інженерії крім поліпшення певних ознак, як при традиційній селекції, вирішується завдання отримати рослини, в яких накопичуються зовсім нові сполуки, що використовуються в медицині, хімічному виробництві та інших галузях. Такими сполуками можуть бути певні жирні кислоти, білки з високим вмістом незамінних амінокислот, вакцини, антитіла. В багатьох випадках бажана ознака або необхідний рекомбінантний білок є результатом взаємодії продуктів експресії декількох перенесених генів. Крім того, технології створення трансгенних рослин передбачають використання у векторі для генетичної трансформації селективних та репортерних генів [1, 14]. Тому виникає потреба використання мультигенних конструкцій, що, відповідно, збільшує кількість регуляторних елементів, необхідних для функціонування таких векторів [15, 16, 17]. При створенні мультигенних конструкцій дублювання промоторів є вкрай небажаним,

оскільки повтори послідовностей ДНК у геномі трансгенної рослини призводять до «замовчування генів» [18, 19, 20, 21]. Одним із підходів для вирішення цих проблем може бути використання у векторах для генетичної трансформації регуляторних послідовностей, що мають незначну ступінь гомології з традиційними промоторами.

Ще одна проблема, яка виникає при використанні конститутивних промоторів, зокрема 35S промотору – це сильний енхансер, який, згідно опублікованим даним, впливає на експресію генів, що розміщені поряд у векторі, в результаті чого втрачається локалізація та специфіка експресії відповідних тканиноспецифічних та індукцибельних промоторів [22, 23, 24]. Тому, в певних випадках, для забезпечення експресії селективного гену більш доцільним було б використання менш сильного промотору, який не мав би впливу на регуляторні послідовності, що знаходяться в найближчому оточенні.

Вивчення регуляторних послідовностей є також дуже важливим з точки зору певної патентної свободи. Використання нових підходів для забезпечення експресії перенесених генів дає можливість, наприклад, отримати рослину стійку до гербіциду в обхід патентів, здатних заблокувати використання в сільському господарстві таких рослин, створених з використанням традиційних промоторів.

В нашій роботі стійкі до фосфінотрицину трансгенні рослини декількох видів були отримані з використанням генетичних векторів, в яких *bar* ген, що забезпечує стійкість до цього гербіциду, не підпадав під контроль будь якого з традиційних промоторів. Натомість у безпосередній близькості до сайту ініціації транскрипції цього гену знаходився *lox* сайт Cre-*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1. Використання таких векторів для генетичної трансформації рослин, на наш погляд, має ряд переваг, оскільки дає можливість зменшити кількість необхідних промоторів у векторі. До того ж створення трансгенних рослин, стійких до гербіциду і які містять *bar* ген без промотору, має певну привабливість з точки зору їх комерційного застосування.

Дослідження *lox*-опосередкованої експресії перенесених генів є актуальним не тільки в зв'язку із можливістю отримання стійких до гербіциду рослин, не використовуючи для *bar* гену традиційний промотор, але й для вивчення особливостей експресії перенесених генів в трансгенних рослинах, а також особливостей успадкування набутої ознаки у контексті фундаментальних питань генетики, генетичної інженерії, молекулярної біології та біотехнології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконувалась в рамках бюджетних науково-дослідних робіт відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України: «Дослідження біологічних процесів в генетично модифікованих рослинах» (№ держ. реєстрації 0101U000390, 2000 – 2004 рр.), «Створення нових генетичних конструкцій та отримання на їх основі трансгенних рослин методами пластомної та генетичної інженерії за допомогою високоефективних методів трансформації» (№ держ. реєстрації 0102U006018, 2002-2006 рр.), «Вивчення поведінки перенесених генетичних маркерів у трансгенних рослин з цінними агрономічними та фармацевтичними властивостями» (№ держ. реєстрації 0107U002734, 2007-2011 рр.), «Дослідження впливу перенесених генів на функціонування рослинних систем в умовах стресів різного походження» (№ держ. реєстрації 0112U001734, 2012-2016 рр.).

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було дослідити в трансгенних рослинах експресію перенесених генів, що відбувається під впливом *lox* сайту; з'ясувати умови та можливості використання *lox*-опосередкованої експресії для різних видів рослин. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- 1) розробити ефективну систему регенерації та генетичної трансформації рослин *Nicotiana africana* та отримати трансгенні рослини з векторами, що містять послідовність гену *bar* між двома *lox* сайтами Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1;
- 2) отримати трансгенні рослини *Nicotiana tabacum* з векторами, що містять послідовність *lox* сайту, розміщену замість традиційного промотора у складі перенесеного *bar* гену, та провести дослідження *lox*-опосередкованої експресії в трансгенних рослинах;
- 3) дослідити *lox*-опосередковану експресію репортерного гену β -глюкуронідази (*gus*) в стабільно трансформованих рослинах *Nicotiana tabacum* та транзійтну *lox*-опосередковану експресію при агроінфільтрації рослин *Nicotiana benthamiana*;
- 4) оцінити стабільність *lox*-опосередкованої експресії *bar* та *gus* генів в трансгенних рослинах та дослідити успадкування трансгенних ознак у нащадків цих рослин на прикладі вибірки з незалежно отриманих трансформантів.

Об'єкт дослідження – *lox*-опосередкована експресія перенесених селективних та репортерних генів в трансгенних рослинах різних видів.

Предмет дослідження – створення трансгенних рослин та вивчення експресії перенесених генів, визначення взаємозв'язку між наявністю експресії трансгенів та особливостями будови генетичного вектора, який був використаний в експерименті.

Методи дослідження

Методи дослідження включали методи культивування рослин *in vitro*, генетичну трансформацію рослин за допомогою *Agrobacterium tumefaciens*, а також пряму трансформацію методом бомбардування частинками вольфраму. Наявність та експресію трансгенів в геномі рослин визначали за допомогою молекулярно-біологічних (ПЛР, ЗТ-ПЛР), біохімічних (тест на гістохімічне виявлення активності β -глюкуронідази) та спектрофлуориметричного аналізів,

а також визначенням стійкості трансгенних рослин до гербіциду в умовах *in vitro* та при вирощуванні в ґрунті в умовах теплиці. Транз'єнтну експресію проводили методом інфільтрації листків *N. benthamiana* агробактеріальною суспензією в умовах теплиці. Для створення векторів для генетичної трансформації використовували рестрикційний гідроліз ДНК та лігазну реакцію, а також методику виділення фрагментів ДНК з агарозного гелю. Для аналізу експериментальних даних було використано методи статистичної обробки.

Наукова новизна

1. Розроблено метод агробактеріальної трансформації рослин *N. africana*, який характеризується високою ефективністю, та вперше отримано трансгенні рослини цього виду, які містять елементи Cre-lox системи рекомбінації бактеріофагу P1, та трансгенні рослини, в яких проходить lox-опосередкована експресія гену *bar*.
2. Вперше показано можливість отримання стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослин, з використанням у векторі для трансформації послідовності lox сайтів (дикого типу loxP та мутованого loxA) Cre-lox системи рекомбінації бактеріофагу P1 замість промотору, при розміщенні послідовності -lox-bar- біля бордерів T-ДНК. За допомогою молекулярно-біологічного аналізу було підтверджено, що в стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослинах відбувається транскрипція гену *bar*.
3. Вперше отримано трансгенні рослини *N. tabacum*, в яких проходить lox-опосередкована експресія гену *gus*, проаналізовано особливості експресії даного гену та визначено вплив енхансера 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти на lox-опосередковану експресію в трансгенних рослинах тютюну. Також показано можливість транз'єнтної lox-опосередкованої експресії *gus* гену.

4. Вперше вектори, що містять послідовність *lox* сайту замість традиційного промотора у складі перенесеного *bar* гену біля правого бордеру Т-ДНК, було успішно використано для отримання трансгенних рослин салату (*Lactuca sativa*), стійких до гербіциду фосфінотрицину.

Практичне значення отриманих результатів

Забезпечення стабільного та контрольованого рівня експресії перенесених генів залишається актуальним завданням генетичної інженерії і надає поштовх для нових досліджень, що стосуються регуляції експресії генів у генетично модифікованих рослинах. Результати, отримані в дисертаційному дослідженні, демонструють можливість використання послідовності *lox* сайту Cre/*lox* системи рекомбінації, розміщеної біля бордеру Т-ДНК, замість промотора перенесеного гену *bar* для забезпечення його експресії в трансгенних рослинах, отриманих методом *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації. Запропонований підхід може бути успішно використаний для отримання сільськогосподарсько цінних видів рослин, стійких до гербіциду, що було доведено на прикладі отриманих трансгенних рослин *Lactuca sativa*. Також отримані результати представляють цінність для фундаментальних досліджень експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. Відібрані трансгенні лінії *L. sativa*, *N. tabacum*, *N. africana* та їх нащадки від самозапилення, в яких проходить експресія *bar* або *gus* генів, є цінним матеріалом для подальшого більш детального вивчення *lox*-опосередкованої експресії перенесених генів.

Створені трансгенні лінії *N. africana*, що містять послідовності *lox* сайтів, а також лінії тютюну, що містять ген білку Cre рекомбінази, надалі можуть бути використані для дослідження функціонування Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 у геномі гібридів цих рослин.

Отримані результати досліджень використовуються в курсі лекцій «Молекулярна біологія» та «Молекулярні основи клонування» для студентів факультету біотехнології та біотехніки НТУУ «КПІ».

Особистий внесок здобувача

Особистий внесок здобувача полягає в розробці завдань досліджень, плануванні та проведенні експериментів, їх обробці та інтерпретації, аналізі літератури, написанні наукових статей. Спільно з науковим керівником проведено вибір об'єктів, розроблено загальний напрямок досліджень і структуру дисертаційної роботи. Векторні конструкції pICH 3737, pICBV 19, pICH 3744, pICH 9393, pICH 9414, pICH 9702 та pICH 1567 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН). Автором особисто були отримані трансгенні рослини *L. sativa*, *N. tabacum*, *N. africana*, проведено біохімічний та флуориметричний аналіз експресії *gus* гену в отриманих трансгенних рослинах. Молекулярно-біологічні аналізи з використанням ПЛР та створення генетичних векторів були проведені спільно з к.б.н. І. К. Комарницьким (ІКБГІ НАНУ). Викладені в дисертації наукові висновки та положення сформульовані автором самостійно.

Апробація результатів роботи

Результати досліджень доповідались на Міжнародному симпозіумі «Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources» (26-31 травня 2002 р., м. Ялта, Україна), 6-ому Міжнародному симпозіумі в серії «Recent Advances in Plant Biotechnilogy - From Laboratory to Business» (12-16 вересня, 2005 р., м. Чеські Будейовиці, Чехія), IV Міжнародній конференції «Геном растений» (10-13 червня 2003 р., м. Одеса, Україна), Установчому з'їзді Українського товариства клітинної біології (25-28 жовтня 2007 р., м. Київ, Україна), Міжнародній конференції «Биотехнология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (8-12 вересня 2008р., м. Звенигород, Росія), VI Міжнародній конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (20–24 вересня 2010 р., м. Алушта, Україна), Міжнародній науковій конференції «Современные аспекты генетической инженерии растений» (30 травня - 1 червня 2011 р., м. Київ, Україна), а також на наукових семінарах

відділу генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

Публікації

За результатами дисертаційної роботи опубліковано 12 наукових робіт, що включають 6 статей, 5 з яких у фахових наукових виданнях, що входять до переліку ДАК/ МОН України, та 6 тез доповідей у збірках матеріалів конференцій.

1. Белокурова В. Б. Регенерация *in vitro* растений *Nicotiana africana* из эксплантов разного типа и мезофильных протопластов / В. Б. Белокурова, И. С. Головач, Н. Л. Щербак, Н. В. Кучук // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 9-16.
2. Щербак Н. Л. Генетическая трансформация растений *Nicotiana africana* Мерхт. плазмидами, содержащими сайты рекомбинации *lox* / Н. Л. Щербак, В. Б. Белокурова, И. К. Комарицкий, Н. В. Кучук // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 3–8.
3. Щербак Н. Л. Изучение влияния *lox* сайтов Cre *lox* системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях / Н.Л. Щербак, В. Б. Белокурова, И. О. Гецко, И. К. Комарицкий, Н. В. Кучук // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 3-9.
4. Shcherbak N. *Lox*-dependent gene expression in transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation / N. Shcherbak, O. Kishchenko, L. Sakhno, I. Komarnitskiy, N. Kuchuk // Cytology and Genetics. – 2013. - V. 47, № 3. - P. 145–155.
5. Щербак Н. Л. Дослідження *lox*-опосередкованої експресії *gus* гену в трансгенних рослинах тютюну / Н. Л. Щербак, М. В. Кучук // Вісник ХНАУ Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 1, № 34. – С. 28-36.
6. Щербак Н. Л. Изучение *lox*-опосредованной экспрессии в трансгенных растениях / Н. Л. Щербак, Л. А. Сахно, И. К. Комарницкий // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / НАН України, УААН, АМН України, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М. І. Вавилова ;

- редкол.: В. А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – Т. 9. - К.: Логос, 2010. - С. 374-378.
7. Shcherbak N. L. Genetic transformation of *Nicotiana africana* and *N. tabacum* plants with constructs containing the bacteriophage P1 cre-lox recombination system / N. L. Shcherbak, V. B. Belokurova, N. V. Kuchuk // Abstracts of International Symposium «Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources» (Yalta, 26-31 May 2002) – Yalta, 2002 - P. 75.
 8. Shcherbak N. L. Mobility of the maize suppressor-mutator transposable element in transgenic plants of *Nicotiana africana* / N. L. Shcherbak, V. B. Belokurova, I. K. Komarnitskiy, N. V. Kuchuk // Сборник тезисов IV Международной конференции «Геном растений» (Одесса, 10-13 июня 2003 г.) - НАН Украины, УААН, Укр. общество генетиков и селекционеров им. Н. И. Вавилова. - Одесса, 2003 – С. 36.
 9. Shcherbak N. L. Localization of lox site between the right border of T-DNA (RB) and promoterless *bar* gene led to its highly efficient expression in transgenic plants / N. L. Shcherbak, V. B. Belokurova, I. O. Getsko, I. K. Komarnitskiy, N. V. Kuchuk // Abstracts of 6th International Symposium in the Series Recent Advances in Plant Biotechnology «From Laboratory to Business» (Ceske Budejovice (Czech Republic), 12-16 September 2005). - Ceske Budejovice, 2005. – P. 60.
 10. Shcherbak N. Lox-dependent *bar* gene expression in transgenic plant obtained via agrobacterium-mediated transformation / N. Shcherbak, V. Belokurova, O. Kishchenko, I. Komarnitskiy, N. Kuchuk // Матеріали Другого з'їзду Українського товариства клітинної біології (Київ, 23-26 жовтня 2007 р.). - Київ, 2007. - С. 260.
 11. Щербак Н. Л. Лох-опосредованная экспрессия беспромоторного *gus* гена в трансгенных растениях табака / Н. Л. Щербак, И. К. Комарицкий, Н. В. Кучук // IX международная конференция «Биотехнология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород (Россия), 8-12 сентября 2008 г.). – Звенигород, 2008.- С. 446.

- 12.Щербак Н. Л. *Lox*-опосредованная экспрессия *bar* гена в трансгенных растениях салата (*Lactuca sativa*) [Электронный ресурс] / Н. Л. Щербак, И. К. Комарницкий // Материалы Международной научной конференции «Современные аспекты генетической инженерии растений» (Киев, 30 мая – 1 июня, 2011 г.) - С. 68. – Режим доступа:
http://conference.icbge.org.ua/images/2011/Abstracts_ICBGE_2011.pdf

Автор висловлює щиро подяку член-кор. НАН України, професору, д.б.н. М. В. Кучуку за наукове керівництво та організацію роботи. Особливу вдячність автор висловлює к.б.н. І. К. Комарницькому за допомогу в проведенні молекулярно-біологічних аналізів та створенні векторів для генетичної трансформації. Автор хоче щиро подякувати с.н.с. Кищенко О. М. за надання різнобічної підтримки та допомоги під час роботи над дисертацією, а також с.н.с. В. Б. Белокуровій за цінні поради при написанні роботи та корегуванні тексту дисертації. Автор також дякує всім співробітникам відділів генетичної інженерії та молекулярної генетики ІКБГІ НАН України за допомогу та поради в ході виконання експериментів та під час обговорення результатів роботи.

Розділ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.2. Регуляція експресії перенесених генів в генетично модифікованих рослинах

Для забезпечення функціонування чужорідного гену в геномі трансгенної рослини він переноситься як незалежна транскрипційна одиниця, що крім структурної ділянки гену містить також і регуляторні послідовності, насамперед, промотори та термінатори транскрипції [1, 25]. Незважаючи на таку автономність, питання нестабільності експресії перенесених генів виникло вже через декілька років після створення перших генетично модифікованих рослин, коли було встановлено, що трансгенні клони, отримані паралельно в одному експерименті, відрізняються за рівнем експресії чужорідних генів, а в деяких випадках перенесені гени взагалі втрачають свою активність [26, 27]. Одним з пояснень такого прояву функціонування трансгенів є позиційний ефект, зумовлений тим, що перенесений ген може опинитися як у відносно несконденсованій, транскрипційно активній ділянці хроматину, так і у сконденсованій, транскрипційно інертній. Але, крім позиційного ефекту, низький рівень або відсутність експресії трансгенів може бути наслідком, так званого, «замовчування генів» («gene silencing»). Серед причин «замовчування генів» у трансгенних рослин перш за все виділяють наявність гомології між ділянками ДНК трансгену або трансгену і геномної ДНК – гомологічний сайленсинг трансгенів [18, 19, 20]. Різні випадки гомологічного «замовчування генів» зумовлені або відсутністю трансляції гену - посттранскрипційне «замовчування генів» (PTGS) або пригніченням на рівні транскрипції - транскрипційне «замовчування генів» (TGS). Обидва ці процеси корелюють зі збільшенням цитозинового метилювання перенесених генів.

Механізм залежного від гомології «замовчування генів» також лежить в основі захисту рослин від вірусної інфекції [8, 9, 10, 11], тому цілком природно,

що вперше це явище було згадане вірусологами. У статті Baulcombe [12] є посилання на роботи вірусологів, які ще в 1928 р. повідомляли, що після інфікування рослин тютюну вірусом кільцевої плямистості тютюну, верхні листки стають стійкими до цього вірусу. Саме генетична трансформація рослин відкрила можливості для послідовного вивчення явища «замовчування генів» в рослинах. Одними з перших були роботи з трансформації петунії, які проводились в 1990 році в Нідерландах [28] та США [29]. За задумом дослідників для збільшення інтенсивності забарвлення пелюстків в геном рослин були перенесені додаткові гени дигідрофлавонол-4-редуктази та халькон синтази. У переважної більшості трансформантів наявність додаткових генів не призвела до очікуваного результату, але найбільш вражаючим виявився той факт, що пелюстки 25% трансгенних петуній взагалі втратили колір, а в клітинах цих рослин не було знайдено відповідної мРНК. З того часу явище «замовчування генів» стало предметом дослідження багатьох наукових лабораторій, і згодом були опубліковані дослідження, які виявили, що руйнування мРНК призводить до накопичення в клітині специфічних коротких дволанцюгових РНК (short/small interfering RNA, siRNA). Як один з механізмів реалізації «замовчування генів», була охарактеризована РНК інтерференція - фундаментальний механізм, що контролює потік генетичної інформації завдяки siРНК [30, 31, 32, 33, 34]. Andrew Z. Fire та Craig C. Mello, які відкрили явище РНК інтерференції у нематоди [34], отримали в 2006 році Нобелівську премію, а вчені всього світу пов'язують з цим відкриттям великі надії на створення принципово нових ліків проти вірусних та онкологічних захворювань [35, 36, 37]. Явище замовчування генів, механізми його реалізації та усунення в трансгенних рослинах є темою багатьох наукових оглядів [20, 21, 32, 33, 38, 39].

«Замовчування генів» є цікавим явищем для фундаментальних досліджень, але реальною проблемою при створенні трансгенних рослин, оскільки для генетичної інженерії основним завданням є отримання стабільної експресії гену інтересу та максимального накопичення необхідного білку. При

цьому слід зазначити, що проблему «замовчування генів» в трансгенних рослинах пов'язують насамперед з використанням конститутивних промоторів вірусного походження [8, 9, 10, 11, 13]. Інша причина – це дублювання промоторних послідовностей, яке виникає внаслідок множинних вставок Т-ДНК або при використанні у векторі однакових промоторів [11, 18, 19, 20, 21]. Зменшення ризику «замовчування генів» в трансгенних рослинах є однією з причин постійного інтересу дослідників до нових регуляторних послідовностей, які б забезпечували стабільну та керовану експресію перенесених генів.

1.1.1. Загальна будова еукаріотичного промотора РНК полімерази II

Як відомо, тільки одна з трьох еукаріотичних РНК полімераз, РНК полімераза II, транскрибує гени, які потім транслюються у білки. Саме промотори класу II, які розпізнає РНК полімераза II, є ключовими регуляторними послідовностями, які забезпечують експресію генів, що кодують білки. Саме ці промотори використовуються у векторах для генетичної трансформації рослин для регуляції експресії перенесених генів. Перша стадія реалізації генетичної інформації, транскрипція, залежить як від промоторних послідовностей, що розміщені безпосередньо біля структурної послідовності гену, так і від послідовностей, що розміщені на відстані (енхансери та сайленсери), а також білків – факторів ініціації транскрипції. Фактори ініціації, використовуючи певні послідовності промотору як сайти розпізнавання, формують сумісно з РНК полімеразою II преініціаторний комплекс. За останні роки було опубліковано низку експериментальних статей та наукових оглядів, в яких докладно розглянуто етапи формування преініціаторного комплексу, фактори ініціації транскрипції РНК полімеразою II та організацію еукаріотичного промотора РНК полімерази II [40, 41, 42, 43, 44].

Коротко узагальнюючи дані, опубліковані за останні роки, можна сформулювати основні положення, що стосуються будови та функціонування еукаріотичного промотора РНК полімерази II. Промотори мають спільну

будову: коровий (базальний) промотор, а також більш віддалені регуляторні елементи, що умовно поділяють на проксимальний промотор та дистальний регіон (рис. 1.1). Послідовність АТАТАА (ТАТА бокс) відокремлена від сайту ініціації транскрипції приблизно на 25 пар нуклеотидів (п. н.). На відстані близько 40 (іноді до 120) п. н. від нього розміщена послідовність GGCCAATC (СААТ-бокс).

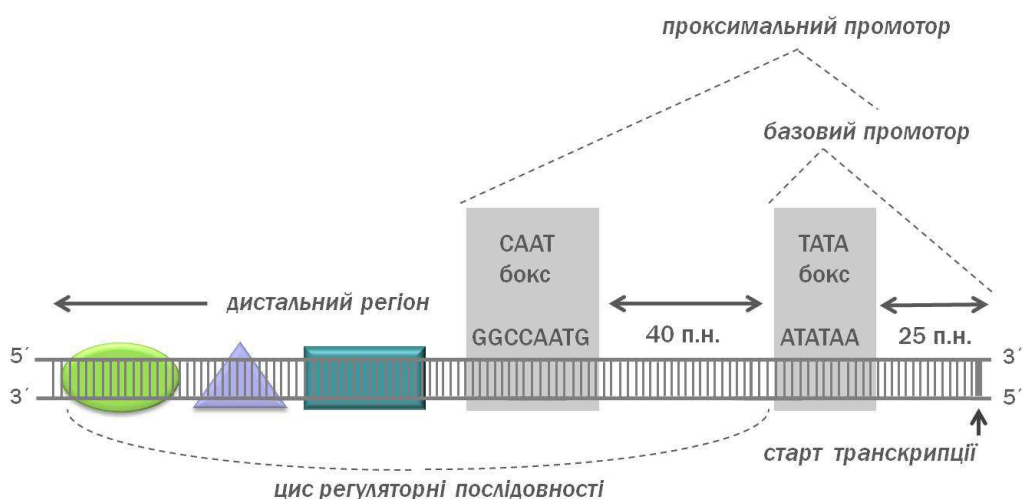


Рис. 1.1. Схематичне зображення будови еукаріотичного промотору, що містить ТАТА бокс, згідно [43]:

ТАТА бокс – послідовність АТАТАА, що розміщена на відстані 25 п. н. від сайту ініціації транскрипції; СААТ бокс - регуляторна послідовність GGCCAATC, розміщена на відстані близько - 40 (іноді до - 120) п. н. від ТАТА боксу, дистальний регіон - послідовності, що впливають на експресію гену (енхансери/інгібітори) розміщені на відстані 1-2 т. п. н. від сайту ініціації транскрипції.

1.1.1.1. Коровий або мінімальний промотор РНК полімерази II

За визначенням *коровий промотор* – це мінімальний фрагмент ДНК, достатній для забезпечення базового рівня ініціації РНК полімерази II, що містить сайт старту транскрипції TSS (Transcription Start Site) та зазвичай простягається в межах – 60 п. н. до + 40 п. н. по відношенню до TSS. Класичний коровий промотор включає ТАТА бокс – послідовність АТАТАА, що розміщена на відстані 25 п. н. від TSS – місця початку синтезу РНК [44, 45]. В межах корового промотору для коректної ініціації транскрипції РНК полімеразою II повинні зібратися ініціаторні фактори, що мають назву TFII (Transcription Factors of RNA polymerase II), або ще їх називають

загальними транскрипційними факторами - GTF (General Transcription Factors). Всього виділяють шість загальних факторів транскрипції: TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF та TFIIH. Серед них фактор TFIID напряду зв'язується з консенсусною послідовністю TATAAA, а TFIIB розпізнає послідовність BRE (7 нуклеотидів поряд з TATAAA). Встановлено, що взаємодія TFIID з TATA боксом залежить від наявності у складі фактору специфічного TATA зв'язуючого білку – TBP (TBP - TATA Binding Protein) [46, 47]. Після зв'язування TBP с TATA боксом запускається каскад подій, результатом яких є формування преініціаторного комплексу.

Згідно з загальноприйнятим визначенням коровий промотор здатен забезпечити базовий/мінімальний рівень експресії гену, що відбувається у клітинах всіх типів. Ще досить недавно TATA бокс вважався найбільш консервативною функціональною послідовністю, яка здатна забезпечити ініціацію РНК полімерази II навіть за відсутністю додаткових регуляторних елементів [25]. Але уявлення про базові послідовності, що утворюють коровий промотор, змінились за останні роки. В огляді Muller et al. [48] сформовані чотири тези, де узагальнено основні розбіжності, які виникли при більш детальному вивченні процесу ініціації транскрипції: 1) більшість корових промоторів не мають TATA боксу; 2) не лише TBP, але й інші споріднені з TBP фактори здатні забезпечити ініціацію транскрипції; 3) показано можливість незалежної від TBP та споріднених з TBP факторів транскрипції РНК полімеразою II; 4) зв'язування TBP не є необхідною передумовою або індикатором активності промотора в умовах *in vivo*.

Згідно сучасних уявлень, не існує «універсального набору» елементів корового промотору, які були б присутні у всіх промоторах. Корові промотори різних регуляторних послідовностей відрізняються по характеру взаємодії з транскрипційними факторами та демонструють індивідуальні властивості, такі як активація енхансерами транскрипції [48, 49].

1.1.1.2. DPE промотор

Як вже згадувалось, великі групи промоторів РНК полімерази II не мають ТАТА боксу. Здійснення транскрипції з таких промоторів стало предметом багатьох досліджень, в яких було встановлено особливості ініціації транскрипції на таких регуляторних послідовностях та їх взаємодія з факторами транскрипції [50, 51, 52]. На прикладі промоторів дрізофіли, які не мають ТАТА боксу, була визначена та детально охарактеризована послідовність, що розміщена в положенні від +28 до +30 пн по відношенню до TSS, яка отримала назву DPE (Downstream Promoter Element) [53, 54, 55]. Було показано, що TVP окремо не зв'язується з цією послідовністю, хоча і відбувається зв'язування всього комплексу TFIID [49, 56].

В експериментах з штучними промоторами, які містили DPE та ТАТА бокс було встановлено, що DPE здатен компенсувати відсутність ТАТА боксу (при його інактивації). Але при цьому в природньому промоторі дрізофіли *hsp70*, який також містить обидва регуляторні елементи, така компенсація не відбувалась. Також слід зауважити, що при наявності ТАТА, DPE майже не впливає на рівень базальної транскрипції, тобто в присутності ТАТА боксу DPE промотор не є функціональним [57].

1.1.1.3. Проксимальна частина промотору РНК полімерази II

Аналіз великої кількості еукаріотичних промоторів та 5'-прилеглих ділянок виявив регуляторну послідовність GGCCAATC, яку виділяють як СААТ бокс [58, 59, 60, 61]. Вона розміщена на відстані приблизно - 40 (іноді до - 120) п. н. від ТАТА боксу, і цю частину еукаріотичного промотора називають *проксимальним промотором*. СААТ бокс присутній у 25-30% еукаріотичних промоторів та може функціонувати як у прямій, так і у зворотній орієнтації по відношенню до TSS. Поширеність СААТ боксу трохи більшою серед промоторів, які не мають ТАТА боксу. В таких промоторах він частіше зустрічається у зворотній орієнтації, а в деяких з них розміщений ближче до положення - 1, може навіть перекриватися з TSS [61, 62]. У рослинних

промоторах, що містять СААТ бокс, цей елемент зазвичай розміщений між позиціями - 46 та - 106, а найчастіше визначається у позиції - 75 [45]. Дослідження, що були проведені свідчать, що від 40 до 50% еукаріотичних промоторів містять СААТ бокс за межами проксимального промотору, зокрема в деяких інтронах, або навіть на дуже віддалених позиціях, при чому як у 5`-, так і у 3`- напрямку [63].

1.1.1.4. Транскрипційний фактор NF-Y

Транскрипційний фактор, що зв'язується з СААТ боксом та активує транскрипцію РНК полімеразою II, відомий як NF-Y (Nuclear Factor Y). Він визначений у еукаріотичних клітинах всіх видів та являє собою тример, що складається з трьох субодиниць NF-YA, NF-YB та NF-YS [64]. В рослинному геномі кожна з субодиниць представлена сімейством приблизно з 10 генів, як у однодольних, так і у дводольних рослин, на відміну від тварин, в геномі яких субодиниці NF-Y транскрипційного фактору представлені одним або двома генами. Збільшення сімейства генів NF-Y в рослинах, у поєднанні з гетеротримерною будовою білку, створює умови для формування багатьох варіантів кінцевого NF-Y комплексу. В огляді Petroni et al. [65] відзначається, що така багатоваріантність є основою для формування гнучкої комбінаторної системи транскрипційних факторів, що створюють адаптаційну модель, яка чутливо реагує на зміни в навколишньому середовищі, а експерименти останніх років підтверджують участь цього фактору у процесах, які у рослин є відповіддю на стрес. Центральні ділянки амінокислотної послідовності білків NF-YS та NF-YB є дуже близькими до відповідних ділянок корових гістонів H2A та H2B. Глобулярна частина корових гістонів виглядає як характерний триспиральний гістоновий мотив (histone fold), в якому одна довга α -спіраль ($\alpha 2$) фланкована двома короткими ($\alpha 1$, $\alpha 3$), приєднаними до неї петлями [66, 67]. Такий самий гістоновий мотив притаманний і білкам транскрипційного фактору NF-Y. Щільна асоціація між NF-YS та NF-YB є передумовою для зв'язування цього комплексу з білком NF-YA та сайт-специфічною взаємодією

транскрипційного фактору NF-Y з ДНК. Функціональні та біологічні особливості будови транскрипційного фактору NF-Y обумовлюють його фундаментальну роль як елемента, що пов'язує ступінь організації хроматину та ініціацію транскрипції [68, 69].

1.1.1.5. Дистальні елементи еукаріотичного промотора РНК полімерази II

Дистальні елементи еукаріотичного промотора РНК полімерази II – послідовності, що впливають на експресію гену (енхансери/інгібітори) розміщені на відстані 1-2 т. п. н. від сайту ініціації транскрипції. Енхансери були визначені як ДНК елементи, що, знаходячись на досить великій відстані від сайту ініціації транскрипції, мають позитивний (підсилюючий) вплив на експресію гену [70, 71]. Енхансери представлені короткими послідовностями ДНК, які складаються з окремих елементів (модулів), що можуть повторюватись. Енхансери здатні збільшувати ефективність транскрипції гена в десятки або навіть сотні разів, знаходячись на великій відстані (більше ніж 1000 п. н.) та в будь-якій орієнтації по відношенню до напрямку транскрипції гена. Енхансери можуть бути розміщені як на 5'-, так і на 3'-кінці фрагмента ДНК, що включає ген, а також можуть розташовуватись в межах нітронів. Послідовності енхансерів включають певні мотиви для зв'язування як загальних транскрипційних факторів, так і транскрипційних факторів, специфічних для певного виду клітин. Таким чином, енхансери є ДНК матрицями для організації складних білкових комплексів, які забезпечують високо специфічні зв'язки по типу білок-білок та передачу регуляторних сигналів до РНК полімерази II, що знаходиться у складі ініціаторного комплексу [72].

Ще однією важливою характеристикою енхансерів є їх здатність впливати на активність інших промоторів, що розміщені відносно поряд. Так, було доведено, що в трансгенних рослинах енхансер 35S промотору, який

забезпечує експресію одного з генів у векторі, збільшує активність експресії інших перенесених генів [22, 23, 24].

Узагальнюючи, можна сказати, що дія енхансера розповсюджується на промотори, що геометрично розміщені найближче до енхансера. Регуляція експресії за допомогою енхансерів здійснюється таким же чином, що і регуляція проксимальними елементами промоторів, а саме шляхом формування на певних послідовностях ДНК білкового комплексу, який називають енхансеосома, та його взаємодії з основним транскрипційним комплексом [73, 74, 75]. Така взаємодія можлива, тому що завдяки петлям та вигинам молекули ДНК, геометрично енхансер розміщений таким чином, що виникає можливість безпосереднього контакту послідовностей корового промотора та віддаленого від нього енхансера, зв'язаних із специфічними білками [76, 77].

1.1.2. Регуляторні послідовності, що використовуються в генетичній інженерії рослин

Кількість промоторів, що використовуються у генетичній інженерії рослин, є досить великою і цей список продовжує постійно поповнюватись. Різні класи промоторів знайшли своє застосування при створенні трансгенних рослин, забезпечуючи відповідно до поставлених цілей конститутивну, специфічну, що проходить лише в певних тканинах, органах або на окремих стадіях розвитку рослини, а також індукцибельну експресію. Активність промотору залежить від наявності та активності транскрипційних факторів, а також їх взаємодії з відповідними послідовностями промотору. Особливість конституційних промоторів полягає в тому, що вони є доступними для транскрипційних факторів весь час, що і зумовлює їх постійну активність. Цей клас промоторів залишається особливо цінним для генетичної інженерії. Саме завдяки цьому класу промоторів вирішується не тільки завдання отримати найбільшу кількість необхідного білку, а також і більш практичне питання селекції трансгенів, яке можливе лише при ефективній експресії селективних маркерів.

1.1.2.1. Промотори, що забезпечують конститутивну експресію трансгенів, вірусного та бактеріального походження

Незважаючи на велику кількість охарактеризованих за останні роки регуляторних послідовностей, для забезпечення конститутивної експресії найчастіше використовують промотори, що походять від прокаріот, які є рослинними патогенами. Так, широке застосування знайшли промотори гену нопалінсинтетази (*nos*) та октопінсинтетази (*ocs*) ґрунтової бактерії *Agrobacterium tumefaciens*, які були використані у перших векторах для генетичної трансформації рослин [6, 78, 79]. При подальшому дослідженні з'ясувалось, що *nos* промотор не завжди забезпечував високий рівень експресії трансгену, а його активність посилювалась під впливом ауксинів [80], а також саліцилової кислоти, метилжасмонату та перекису водню [81, 82]. Схожі результати були отримані і для *ocs* промотора [84].

Іншим джерелом промоторів стали віруси рослин. В сучасних векторах для трансформації рослин для контролю експресії маркерних генів традиційно використовується 35S промотор вірусу мозаїки цвітної капусти. Він був виділений з подвійної спіралі ДНК вірусу мозаїки цвітної капусти, що використовує РНК полімер азу II рослини-хазяїна і не залежить від будь яких інших продуктів вірусних генів [84, 85, 86]. Цей промотор виявився більш сильним, ніж промотори октопінсинтетази та нопалінсинтетази, що вже використовувались в генетичній інженерії рослин [87]. До того ж, 35S промотор не проявляє тканиноспецифічності, тобто однаково сильно працює у всіх тканинах рослини. Оригінальний повнорозмірний 35S промотор (- 941 п. н. - + 9 п. н.) не мав значних відмінностей активності у порівнянні з фрагментом - 343 п. н. [86].

1.1.2.2. Модульна структура 35S промотору

Детальний аналіз цієї послідовності виявив, що високий рівень конститутивної експресії перенесених генів під контролем 35S промотору в трансгенних рослинах забезпечується взаємодією декількох доменів [88].

Будова 35S промотору вперше була охарактеризована в публікації [89], хоча дещо раніше вже були опубліковані роботи, в яких були виділені основні модулі, що забезпечують конститутивну експресію перенесених генів в трансгенних рослинах тютюну та петунії [88]. Було показано, що послідовність від - 343 до - 46 п. н. проявляє свою функціональну активність незалежно від орієнтації та відстані по відношенню до мінімального промотору. Модульна структура 35S промотору представлена на рисунку 1.2.

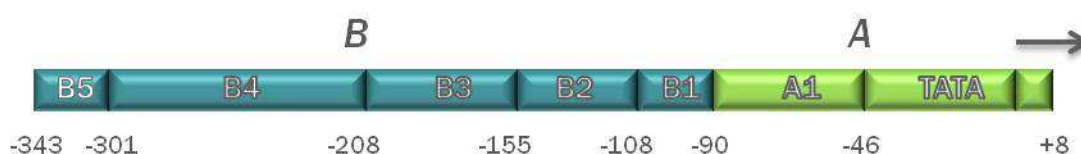


Рис. 1.2. Модульна структура 35S промотору, згідно Benfey and Chua [89].

Згідно з представленою авторами схемою будови 35S промотору, він складається з двох основних доменів: А та В. Домен А складається з мінімального базового промотору, що розміщений в положенні від - 46 до + 8 п. н. відносно сайту ініціації транскрипції, та включає в себе ТАТА бокс, а також субдомен А1, що простягається від - 90 до - 46 п. н. Субдомен А1 містить елемент as-1 – прямий повтор TGACG, розділений сімома нуклеотидами (TGACG TAAGGGA TGACG), до якого приєднується транскрипційний фактор ASF-1 [86]. Елемент as-1 забезпечує експресію трансгена в коренях рослини, але, крім цього, повідомлялось і про те, що взаємодія as-1 елементу з іншими субдоменами (B1-B5) є необхідною умовою високого рівня експресії трансгену в інших тканинах рослин [91]. Елементи, подібні до as-1, були ідентифіковані також в інших рослинних, бактеріальних та вірусних промоторах. Така структура - пентамерний прямий повтор та семинуклеотидний спейсер – є консервативною для промоторів Т-ДНК, таких як *ags* та *mas* [92], та вірусних промоторів.

Послідовність між нуклеотидами 90 та 340 – це енхансер, що функціонує в будь-якій орієнтації і в будь-якому положенні по відношенню до гена [88, 89], а також здатен впливати на активність оточуючих промоторів [22,

23, 24]. Використання тамдемних повторів цієї послідовності підвищує рівень активності промотору майже в 10 разів [93].

Завдяки своїй ефективності, 35S промотор активно використовується у векторах для генетичної трансформації рослин для забезпечення конститутивної експресії перенесених генів. Він складається з декількох доменів, серед яких домен (46 п. н.), що містить ТАТА бокс виділяють як мінімальний 35S промотор. Енхансер 35S промотору функціонує в будь-якій орієнтації і в будь-якому положенні по відношенню до гена.

1.1.2.3. Інші промотори вірусного походження

Зазвичай в бінарних векторах для генетичної трансформації рослин міститься декілька генів: цільовий (може бути не один), селективний та, можливо, маркерний гени. Використання однакових промоторів у векторі може негативно вплинути на рівень експресії, або навіть спричинити «замовчування» трансгена. Ці факти є однією з найважливіших причин, яка зумовлює інтерес до пошуку нових промоторів, а також до створення нових регуляторних послідовностей, комбінуючи регуляторні модулі різних промоторів. Вражаючи універсальність та ефективність 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти в експериментах з генетичної трансформації рослин передбачувалося сприяла пошуку альтернативного промотору серед аналогічних регуляторних послідовностей інших каулімовірусів. Так, були ізольовані та досліджені промотори каулімовірусів норічника (*Scrophularia californica*) [94], нічної красуні (*Mirabilis jalapa*) [95], суниці (*F. x ananassa*) [96], маніюки (або касави) (*Manihot utilissima* Pohl) [97]. Кулуев та співавт. в своїй роботі досліджували ефективність промоторів вірусу кільцевого гравірування гвоздики та вірусу мозаїки жоржини в трансгенних протопластах та рослинах тютюну [98].

Загальний висновок, який можна зробити згідно з опублікованими результатами експериментів, що всі досліджені промотори вірусного походження забезпечували конститутивну експресію маркерного гену та показали ефективність, яка відповідає, а в деяких випадках переважає

ефективність 35S промотору. При цьому слід зазначити, що до нинішнього часу 35S промотор залишається «робочою конячкою» в практичній біотехнології рослин та «еталоном» для порівняння при створенні та тестуванні нових регуляторних послідовностей.

1.1.2.4. Переваги та недоліки використання конститутивних промоторів вірусного походження

35S промотор є одним з найсильніших конститутивних промоторів, що забезпечують експресію перенесених генів у трансгенних рослинах. Але використання у векторах для трансформації 35S промотору та інших вірусних промоторів має і свої недоліки, які в першу чергу пов'язані з тим, що це послідовності рослинних патогенів. Метилування промоторів, що призводить до «замовчування генів», є механізмом захисту рослин від вірусних інфекцій [8, 9, 10, 11, 12]. Ймовірність «замовчування генів» за такою схемою збільшується при перенесенні трансгенних рослин у відкритий ґрунт та їх контакт з природними патогенами. Так, в роботі Al-Kaff et al. [13] повідомлялось, що «замовчування» *bar* гену під контролем 35S-промотору в трансгенних рослинах ріпаку відбувалось при інфікуванні цих рослин вірусом мозаїки цвітної капусти. Крім того, як вже обговорювалось раніше, 35S промотор має дуже сильний енансер, який здатен впливати на ефективність інших промоторів, а відповідно і на рівень експресії генів, що розміщені під їх контролем [22, 23, 24]. В результаті такого впливу може бути втрачена специфічність експресії, що забезпечується промоторами, які знаходяться поряд у векторі для трансформації, якщо, наприклад, селективний або маркерний ген розміщені під контролем 35S промотору, а для цільового гену передбачена тканино- або органоспецифічна експресія.

1.1.2.5. Штучні (синтетичні) промотори

Пошук оптимальної регуляторної послідовності, яка б забезпечила точну та керовану експресію перенесеного гену, зменшивши ризик «замовчування

генів» внаслідок гомології, став передумовою для створення синтетичних промоторів. При створенні синтетичних промоторів певні регуляторні елементи (енхансери) відомих промоторів, самотійно або у різних комбінаціях, поєднують з мінімальним промотором [99, 100]. Під контролем створеного промотору розміщують маркерний ген, зазвичай ген *gus*, експресія якого легко фіксується і дозволяє провести кількісне обчислення ефективності створеного промотору [101].

Перші штучні промотори, які могли б забезпечити експресію трансгену в рослинах, були створені з використанням субдоменів нативних конститутивних промоторів. Послідовності, що функціонують як активатори транскрипції 35S [89], *ocs* [102] та *mas* [103] промоторів, були поєднані у різних комбінаціях або подвоєні з метою досягти синергічного ефекту при регуляції експресії перенесеного гену [93, 104, 105, 106].

При створенні штучних промоторів використовували короткі прямі повтори, що є енхансерними послідовностями у рослинних вірусів [107]. Різні комбінації таких прямих повторів у поєднанні з мінімальним 35S промотором були застосовані при створенні синтетичних промоторів, активність яких була підтверджена як при транзйентній експресії, після інфільтрації агробактерії, так і в стабільно трансформованих рослинах тютюну. В результаті було відібрано два синтетичних промотора – SynPro3 та SynPro5, які забезпечували високий рівень експресії репортерного гену в більшості тканин на всіх стадіях розвитку.

В роботі Bhullar et al. [108] було проведено порівняння двох підходів зі створення штучних конститутивних промоторів, один з яких базується на комбінації доменів різних промоторів, а інший - на розміщенні регуляторних *cis*-елементів у новому ДНК оточенні. В результаті було створено нові регуляторні послідовності, що забезпечують експресію маркерного *gus* гену на рівні 35S промотору, але при цьому мають малу ступінь гомології з цим промотором. На думку авторів такий підхід має зарадити проблемі «замовчування генів» у трансгенних рослинах, яку часто пов'язують з використанням 35S промотору.

Ефективні синтетичні промотори були створені при поєднанні певних послідовностей промоторів вірусів мозаїки норічника, нічної красуні та вірусу хлорозу прожилок арахісу [109]. Створені промотори забезпечували активність ре портерного гену *gus* вищу, ніж 35S промотор та підтвердили свою активність в трансгенних рослинах тютюну, петунії, томату, арабідопсису та шпінату. Синтетичний промотор, створений при комбінуванні послідовностей вірусу мозаїки нічної красуні, мав індукцибельні властивості та підвищував свою активність під впливом саліцилової та абсцизової кислот [110]. Висвітлюючи питання синтетичних регуляторних послідовностей, індукцибельні промотори, слід виділити окремо, тому більш детально вони охарактеризовані у наступному розділі.

1.1.2.6. Індукцибельні промотори, що використовуються в генетичній інженерії рослин

Індукцибельні промотори набувають все більшої популярності для експресії перенесених генів, оскільки в деяких випадках конститутивна експресія трансгену може створювати проблему на ранніх стадіях росту рослини, коли високий рівень накопичення трансгенного продукту заважає нормальному розвитку рослини. Високий рівень експресії трансгенів також може спричинити метаболічне виснаження ресурсів рослини. В таких випадках доцільно використовувати індукцибельні промотори, які зумовлюють експресію гену лише під дією певних хімічних речовин або факторів зовнішнього середовища (зміна температури, нестача поживних речовин тощо).

Один із класів індукцибельних систем, які використовуються в рослинах, базується на активації транскрипції, що опосередковується ядерним рецептором стероїдних гормонів тварин. Для таких індукцибельних систем використовується химерний трансактиватор, транскрипційна активність якого регулюється певним гормоном або структурно спорідненими чинниками. Опубліковано роботи, в яких для створення химерного трансактиватору використовували регуляторний домен глюкокортикоїдного рецептору щура

[111], рецептор естрогену людини [112], (рецептор гормону, що відповідає за линьку комах – екдізону [113]. Найсуттєвішим недоліком цих систем є неможливість застосування вищезгаданих індукторів у сільському господарстві.

Перспективною, з точки зору практичного використання у сільському господарстві, є етанол індукцйбельна система, що походить від філаментних грибів *Aspergillus nidulans*. Вона складається зі специфічного активатора AlcR, що кодується геном *alcR*, та промотору гену алкогольдегідрогенази (*alcA*), що містить сайти зв'язування AlcR. Для забезпечення високого рівня індукцйбельної експресії трансгену в рослинах промоторну послідовність гену *alcA* зшивають з мінімальним 35S промотором. Генетичні вектори з маркерним геном, що контролюється таким химерним промотором та геном *alcR* під контролем конститутивного промотору, були успішно використані у трансгенних рослинах тютюну, картоплі [114] та арабідопсису [115].

Створено індукцйбельний промотор, що активується рослинними патогенами [116]. В ньому регуляторні елементи, що забезпечують експресію генів при взаємодії рослини з патогенами, розміщені перед послідовністю мінімального 35S промотору. Такі промотори дають можливість додатково вивчати передачу сигналів та активацію транскрипції в рослинах при пошкодженні та при взаємодії з патогенами. Індукцйбельні промотори, що підвищують свою активність під впливом саліцилової та абсцизової кислоти створений при комбінуванні послідовностей вірусу мозаїки нічної красуні [110] та вірусу мозаїки норічника [117]. При використанні послідовностей вірусу, що уражує рослини цеструму був створений конститутивний промотор, який додатково індукується в умовах як біотичного, так і абіотичного стресу[118].

Дослідження функціонування в трансгенних рослинах промоторів бактеріального та вірусного походження, вивчення їх будови та створення бази даних регуляторних елементів [119, 120] відкриває широкі можливості для створення синтетичних промоторів. Сучасні методи дозволяють створювати

штучні регуляторні послідовності, підлаштовуючи активність їх експресії в залежності від необхідного рівня накопичення трансгенного продукту.

1.1.2.7. Промотори, що забезпечують конститутивну експресію трансгенів, рослинного походження

Джерелом конститутивних промоторів для генетичних векторів також є рослинні гени, експресія яких проходить в клітинах постійно. Серед промоторів рослинного походження, що забезпечують високий рівень конститутивної експресії трансгенів, найчастіше використовуються промотори генів актину та убіквітину. З геному арабідопсису був ізольований промотор гену *actin2*. Послідовність довжиною 1,5 т. п. н. у 5'-області цього гену була зшита з маркерним геном *gus*, і такий химерний ген був використаний для трансформації арабідопсису [121]. Під контролем цього промотору експресія гену *gus* відбувалась майже у всіх тканинах трансгенних рослин, крім гіпокотилу, зав'язі, пилкового мішку та оболонки насінини. Актиновий промотор був ізольований також із гену *actin1* рису [122, 123]. Зшитий з *gus* геном, він забезпечував його транз'єнтну експресію у протопластах рису та майже у всіх тканинах трансгенних рослин цієї культури. Також було показано, що транз'єнтна експресія зникала при делеції першого інтрону *actin1*, а включення цього інтрону до химерного 35S промотору збільшувало його активність у трансгенних рослинах рису та трансгенних рослинах кукурудзи майже у 40 разів [122].

Розповсюдженість та консервативність убіквітину, його участь у таких важливих процесах як проліферація, розвиток та диференціювання клітин, реакція на стрес та репарація ДНК, зумовила інтерес до промотору цього білку як до можливого конститутивного промотору для генетичної трансформації. Один з промоторів убіквітину, що знайшов своє застосування у генетичній трансформації - це промотор гену *ubi1* кукурудзи. Дослідження показали, що зшитий з маркерним геном *cat*, він забезпечував експресію цього гену у протопластах кукурудзи на рівні у 10 разів більшому ніж 35S промотор. В той

же час в протопластах тютюну активність цього промотора була значно меншою, що і змусило обмежити коло рослин, для трансформації яких використовується *ubi1* промотор злаковими культурами [124, 125]. У трансгенних рослинах рису *ubi1* промотор підтримував активність гену *gus* у всіх тканинах, але спостерігалось зменшення активності експресії у більш старих тканинах [126].

Провівши аналіз опублікованих даних, можна зробити висновок, що конститутивні промотори рослинного походження використовуються здебільшого для трансформації злакових культур, тоді як для дводольних більш ефективними є промотори вірусного походження, або штучні промотори, створені із залученням елементів цих промоторів.

1.1.2.8. Криптичні промоторні послідовності

Серед ендегенних промоторів, що знайшли своє застосування для генетичної трансформації рослин, слід відмітити криптичні промоторні послідовності, які були виявлені в рослинному геномі за допомогою методу Т-ДНК тагетінгу, або промотор трепінгу. В таких експериментах використовують вектори, в яких безпромоторний маркерний ген розміщений біля правого бордеру, а експресія цього гену в трансгенній рослині відбувається внаслідок випадкового транскрипційного злиття з промотором в рослинному геномі. Вперше можливість використання технології «маркування промоторів» в рослинному геномі була продемонстрована на рослинах тютюну та арабідопсису з використанням векторів, що містили безпромоторний ген неоміцинфосфотрансферази II (*npt II*) [127, 128]. Надалі були використані інші, як селективні - *hpt* (ген гігрозиміцинфосфотрансферази) [129], так і репортерні маркерні гени: ген *gus* [130] та ген люціферази (*luc*) [131, 132].

За допомогою методу промотор-трепінгу були виявлені як криптичні промотори (послідовності, які не впливають на експресію генів в нативних умовах, а їх регуляторний потенціал проявляється лише в певному генетичному оточенні), так і інші промоторні послідовності, які характеризувались тканино-

специфічною або індукційною експресією. В таблиці 1.1 представлені узагальнені дані про регуляторні послідовності, клоновані методом промотор трепінгу в трансгенних рослинах [133].

Таблиця 1.1

Список деяких важливих промоторів, клонованих методом промотор трепінгу, згідно Srinivasan and Saha [133]

Види рослин	Ізольований промотор	Експресія в тканинах	Ген репортер	Посилання
<i>A. thaliana</i>	AtEM101, 201	ембріон	<i>gus</i>	Topping et al. [134]
<i>N. tabacum</i>	криптичний	насіннєва оболонка	<i>gus</i>	Fobert et al. [135]
<i>A. thaliana</i>	AtVT1	судини	<i>gus</i>	Wei et al. [136]
<i>N. tabacum</i>	tCUP	конститутивний	<i>gus</i>	Foster et al. [137]
<i>A. thaliana</i>	Pyk20	тканини/органи, ушкоджені нематодами	<i>gus</i>	Puzio et al. [138]
<i>A. thaliana</i>	криптичний	корінь	<i>gus</i>	Mollier et al. [139]
<i>A. thaliana</i>	криптичний	замикаючі клітини продихів	<i>gus</i>	Plesch et al. [140]
<i>Lotus japonicus</i>	Lj Cbp1	корінь	<i>gus</i>	Webb et al. [141]
<i>A. thaliana</i>	elF-4A1	молоді листки	<i>gus</i>	DeGreve et al. [142]
<i>A. thaliana</i>	488	індукція патогеном	<i>gus</i>	Custers et al. [143]
<i>A. thaliana</i>	EXORDIUM	ембріон та меристема	<i>gus</i>	Farrar et al. [144]
<i>A. thaliana</i>	криптичний	корінь	<i>gus</i>	Sivanandan et al. [145]
<i>A. thaliana</i>	LOJ	з'єднання латеральних органів	<i>gus</i>	Prasad et al. [146]
<i>A. thaliana</i>	Anth85	пиляк	<i>gus</i>	Thakare et al. [147]
<i>L. japonicus</i>	LjENOD40-2	корінь та наріст	<i>gus</i>	Buzas et al. [148]

Перші криптичні регуляторні елементи були охарактеризовані для дріжджів - криптичний промотор було виявлено в послідовності інтрону гену актину [149]. Пізніше критичні промотори були виявлені різних організмів як безпосередньо біля структурної ділянки генів, так і в нетранскрипційних ділянках геному. Криптичний енхансер було виявлено всередині генного інтрону *Drosophila proboscipedia* [150]. Охарактеризовані криптичні промотори в геномі мишей – в послідовності гену цитохрому CYP4A6 [151] та людини [152, 153].

В геномі тютюну було виявлено криптичний промотор, що забезпечував експресію гену в покривних тканинах насіння [135]. В геномі *Arabidopsis thaliana* виявили криптичний промотор, що забезпечував експресію маркерного гену в замикаючих клітинах продихів [140]. Перший конститутивний криптичний промотор tCUP [137] було виявлено в геномі тютюну. Мінімальний або коровий промотор конститутивного криптичного промотора tCUP не містить ТАТА боксу. Енхансер, що відповідає за конститутивну експресію, розміщений між позиціями + 62 та + 197. Другий енхансер, розміщений у позиції +394 - +197, підсилює активність промотора як у прямій, так і у зворотній орієнтації по відношенню до мінімального +62tCUP [154]. Активність tCUP промотора підтвердилася в трансгенних рослинах тютюну, арабідопсису, льону, ріпаку, люцерни [155] та рису [156]. Нещодавно методом промотор трепінгу в геномі арабідопсису було виявлено двонаправлений критичний промотор, який забезпечував експресію репортерних генів в пилку [157].

Криптичні промотори за визначенням – послідовності, які не регулюють експресію в нативних умовах, але здатні забезпечити експресію при певному розташуванні по відношенню до гена. В наших дослідженнях ми також спостерігали вплив на експресію послідовності, яка не є регуляторною, а також не згадується в публікаціях як криптична регуляторна послідовність. Експресія *bar* гену в трансгенних рослинах відбувалась під впливом послідовності *lox-сайту Cre/lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 [158]. В експериментах

було з'ясовано, що необхідною умовою такої експресії є розташування послідовності *lox-bar* біля правого бордеру та використання агробактеріальної трансформації для отримання трансгенних рослин [159, 160]. Крім того, було з'ясовано, що експресія підсилюється під впливом енхансера незалежного 35S промотора, розміщеного у векторі [161]. Тому в нашій роботі ми вважаємо недоцільним використання для *lox* сайту терміну криптична регуляторна послідовність та зупинились на визначенні *lox*-опосередкована експресія.

1.1.2.9. IRES-опосередкована експресія трансгенів

Серед послідовностей, здатних забезпечувати експресію перенесених генів, окремо треба виділити можливість використання IRES послідовностей та механізму внутрішньої ініціації трансляції. Послідовність IRES - внутрішня ділянка посадки рибосоми (Internal Ribosome Entry Site), - ділянка мРНК, яка має виражену вторинну структуру та направляє рибосому на стартовий AUG кодон. Завдяки IRES послідовності ініціація синтезу білку відбувається у альтернативний спосіб – так звана кеп (cap) незалежна (внутрішня) ініціація трансляції мРНК.

У 1988 році вперше було продемонстровано, що ініціація трансляції РНК пікорнавірусів (поліомеліта та енцефаломіокардиту (EMCV)) відбувається за альтернативним механізмом внутрішньої ініціації трансляції мРНК [162, 163]. Також було підтверджено, що еукаріотична рибосома здатна здійснювати ініціацію трансляції, приєднуючись до певної внутрішньої ділянки мРНК, – області внутрішньої посадки рибосом або IRES. Згодом виявилось, що механізм внутрішньої ініціації трансляції використовується не лише вірусними, але і клітинними мРНК. Перший клітинний IRES був ідентифікований в 5'-області мРНК білку, що пов'язує важкі ланцюги імуноглобулінів – Вір (immunoglobulin heavy chain binding protein). Дослідники звернули увагу на цю мРНК, оскільки її трансляція продовжувалась у клітинах, в яких після інфікування поліовірусом була пригнічена кеп-залежна ініціація трансляції мРНК [164].

Можливість використання послідовностей IRES для регуляції експресії трансгенів була показана у 2000 році. Було опубліковано результати, згідно з якими для трансформації тютюну була використана конструкція, що містить під контролем одного промотору два маркерних гени з відкритою рамкою зчитування, розділених IRES елементом EMCV вірусу [165]. Було підтверджено активність обох маркерних генів у трансгенних рослинах, а також наявність біцистронного транскрипту та незалежну трансляцію обох білків. В роботі Дорохова [166] проводилось порівняння трьох IRES послідовностей. Дві з них походять від тобамовірусу хрестоцвітих та IRES елемент EMCV вірусу. Також, ще в 2000 році компанія Icon Genetics запатентувала використання IRES послідовностей у векторах для генетичної трансформації рослин як приклад використання безпромоторних технологій [167].

1.1.2.10. Явище позиційного ефекту та генетичні послідовності, які здатні зменшити його вплив на експресію трансгенів

Питання нестабільності експресії перенесених генів виникло вже через декілька років після створення перших генетично модифікованих рослин, коли було встановлено, що трансгенні клони, отримані паралельно в одному експерименті, відрізняються за рівнем експресії чужорідних генів, а в деяких випадках перенесені гени в новому оточенні взагалі втрачають свою активність [26, 27]. Однією з причин такого прояву функціонування трансгенів є позиційний ефект, пояснення, яке базується на тому, що в результаті трансформації перенесений ген може опинитися як у відносно несконденсованій, транскрипційно активній ділянці хроматину, так і у сконденсованій, транскрипційно інертній. І хоча за даними деяких авторів інтродукція Т-ДНК з більшою ймовірністю відбувається у транскрипційно активні ділянки геному, опубліковано результати, які доводять, що трансформація рослин векторами, при створенні яких були використані послідовності, що сприяють усуненню позиційного ефекту, була цілком успішною і забезпечила більш стабільну експресію чужорідних генів. Саме

тому крім промоторів та енхансерів, для вдосконалення векторів для генетичної трансформації рослин використовуються також послідовності, здатні модулювати формування, зміну та утримування хроматинових структур.

1.1.2.11. Послідовності, що забезпечують прикріплення хроматину до ядерного матриксу

Один з підходів зі зменшення впливу позиційного ефекту базується на розміщенні у векторній конструкції послідовностей, що забезпечують прикріплення хроматину до ядерного матриксу - S/MARs (Scaffold/Matrix Attachment Regions). Майже всі охарактеризовані S/MARs - це АТ багаті (більше ніж 65%) послідовності довжиною 200-1000 нуклеотидів з тенденцією до утворення одноланцюгових ділянок ДНК [168, 169]. Ці послідовності мають підвищену спорідненість до ядерного матриксу, і вважається, що їх основною функцією є утворення, підтримання та регуляція функціонування петельних доменів інтерфазного хроматину [170]. Зважаючи на властивості та функцію S/MARs, очікувалось, що використання векторів, в яких Т-ДНК обмежена S/MARs послідовностями, забезпечить стабільну експресію, зменшить варіабельність у рівні експресії трансгену між різними трансформантами та забезпечить пряму залежність рівня експресії від кількості вставок Т-ДНК. Allen et al. в своїй роботі використали S/MARs послідовності дріжджів, що фланкували репортерний ген *gus* у векторній конструкції для трансформації суспензійної культури клітин тютюну [171]. Всупереч очікуванням, отримані трансгенні лінії мали різний рівень експресії репортерного гену, водночас спостерігалось значне збільшення активності (до 20 разів) *gus* гену в окремих трансгенних лініях. На думку авторів, обмеженість впливу S/MARs елементів в даному експерименті була викликана малою спорідненістю S/MARs послідовностей дріжджів до геному тютюну, оскільки S/MARs послідовності не є консервативними. Численні S/MARs елементи були ізольовані також з різних видів рослин [172, 173, 174]. Результати багатьох аналогічних експериментів підтверджують, що використання S/MARs в генетичних векторах сприяє

підвищенню рівня експресії перенесених генів та/або зменшує варіабельність у рівні експресії між трансгенними клонами [175, 176, 177]. Але такий результат не є однозначним і, як повідомляють Сидоренко та співав. [178], вплив S/MARs на експресію трансгенів у кукурудзи залежав від комбінації промотору та S/MARs елементу.

1.1.2.12. Інсулятори

Зменшення впливу позиційного ефекту на експресію трансгену можливо досягти також використовуючи інсулятори - послідовності, які, так само як і S/MARs, задіяні у формуванні петельних доменів хроматину. Інсулятори здатні блокувати зовнішній вплив на експресію трансгенів, який може обумовлювати як збільшення, так і зменшення рівня експресії. Функція інсуляторів може бути реалізована двома різновидами активності. Одна з них – блокування впливу енхансера на промотор, яке відбувається тільки при розміщенні інсулятора між цими регуляторними послідовностями [179, 180]. При цьому слід зазначити, що на регуляторну активність кожного з цих елементів окремо інсулятор не впливає, і вони зберігають свою здатність взаємодіяти з аналогічними регуляторними елементами від яких вони не відокремлені інсуляторами. Інша інсуляторна активність – це здатність виконувати бар'єрну функцію, перешкоджаючи розповсюдженню сконденсованого хроматину [181] і, таким чином, створювати умови для експресії трансгену, стабільно інтегрованого в геном незалежно від позиційного ефекту [182]. Так само як і S/MARs послідовності, інсулятори здатні обмежувати окремі петельні домени хроматину, що і дозволяє припустити спорідненість впливу цих двох елементів (хоча б в окремих випадках) на експресію трансгенів. Вперше інсуляторні властивості деяких S/MARs спостерігали в тваринних клітинах [183, 184], а в 2009 році було опубліковано результати експериментів, в яких S/MARs елементи кукурудзи (ADH1 5'), тютюну (Rb7 3') та петунії (TBS) досліджувались на здатність блокувати взаємодію між енхансером та промотором [185]. Було показано, що TBS S/MARs петунії, на відміну від двох

інших, проявляють інсуляторну активність і блокують взаємодію між 35S енхансерною послідовністю та AGIP промотором.

Як свідчить аналіз опублікованих даних, забезпечення стабільності експресії перенесених генів залишається актуальним завданням при створенні трансгенних рослин. Крім промоторних послідовностей, яким належить ключова роль у керуванні експресією трансгену, можуть бути використані послідовності IRES, завдяки яким відбувається внутрішня ініціація трансляції. При використанні у векторній конструкції послідовностей MARs та інсуляторів, вдається збільшити рівень експресії та зменшити вплив позиційного ефекту на експресію трансгену. Але ми не зустрічали даних про вплив на експресію трансгенів сайтів рекомбінації *lox*, тоді як наші дослідження свідчать, про наявність такого впливу при розміщенні послідовності *lox* сайту та безпромоторног *bar* гену біля правого бордеру [158, 159, 160].

1.2. Cre/*lox* система рекомбінації бактеріофагу P1 в генетичній інженерії рослин

З моменту перенесення Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 в рослинний геном [186], ця система була детально охарактеризована і успішно використовується як у комерційній біотехнології, так і для фундаментальних досліджень. Здатність Cre-рекомбінази каталізувати рекомбінацію між *lox* сайтами успішно застосовується для індукції хромосомних транслокацій, інверсій та делецій [187, 188, 189, 190, 191].

Білок Cre-рекомбіназа (Cyclization recombination protein) – продукт гену *cre* бактеріофагу P1 здатен здійснювати рекомбінацію між *lox* сайтами без будь-яких додаткових факторів. Cre належить до сайт-специфічних рекомбіназ родини Int (надродина λ інтеграз), які здійснюють сайтспецифічну рекомбінацію ДНК за єдиним механізмом, що включає гідроліз ланцюгів ДНК, із використанням залишку тирозину в активному центрі білка, їх обмін та лігування. Білок Cre розпізнає специфічну послідовність завдовжки 34 п. н., яка отримала назву *loxP* (locus of crossingover (X) in P1). Cre та *loxP* у життєвому

циклі фага P1 забезпечують циклізацію лінійної фагової ДНК у перші хвилини інфекції кишкової палички. Сайти рекомбінації *lox* складаються з двох інвертованих повторів (13 п. н.), розділених асиметричним спейсером (8 п. н.) (рис. 1.3). За наявності двох сайтів *loxP* білок Cre-рекомбіназа зв'язується з інвертованими повторами і стимулює формування синаптичного комплексу та рекомбінацію між двома послідовностями *loxP*.

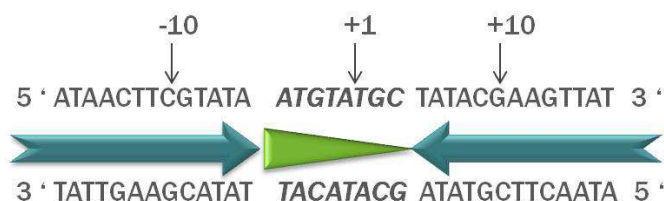


Рис. 1.3. Структура *loxP* сайту, що розпізнається Cre рекомбіназою, згідно [186, 191]. Нуклеотиди пронумеровані від центру сайту.

Оскільки спейсери асиметричні, то обмін нитками ДНК можливий тільки тоді, коли два *loxP* з'єднані синапсом у одній орієнтації. Асиметричність спейсера зумовлює орієнтацію *lox* сайту та визначає характер рекомбінаційних подій. Було показано, що рекомбінація між двома *loxP* сайтами однакової орієнтації призводить до делеції фрагменту між ними, а між *lox* сайтами зворотної орієнтації - до інверсії (рис. 1.4) [192, 193].

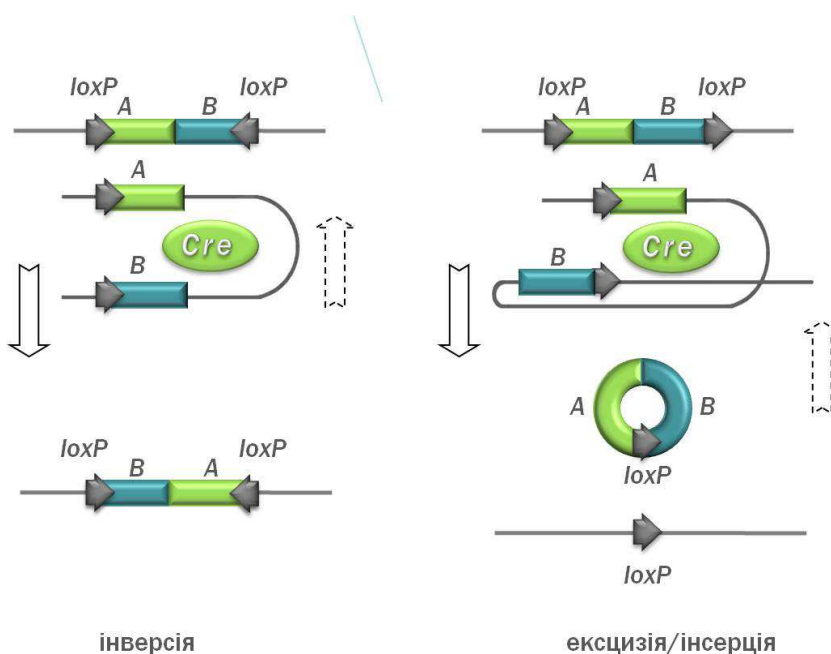


Рис. 1.4. Схема рекомбінаційних подій, що каталізуються Cre-рекомбіназою, в залежності від орієнтації *loxP* сайтів, згідно [191].

Крім того, Cre може інтегрувати кільцеву молекулу ДНК у лінійну ДНК, якщо кожна з них містить *loxP*, або зумовлювати обмін ділянками ДНК на двох молекулах, наприклад, негомологічних хромосомах, які містять *loxP* сайт.

Система Cre/*lox* рекомбінації бактеріофагу P1 характеризується високою точністю, а завдяки незалежності від додаткових білків та кофакторів вона проявляє активність у різних біологічних системах, що дає можливість використовувати Cre *loxP* в експериментах з маніпуляцій ДНК, вирішуючи важливі прикладні питання генетичної інженерії.

1.2.1. Використання Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 для видалення селективних маркерів з геному трансгенних рослин

Здатність Cre рекомбінази вирізати фрагмент ДНК між двома *lox*-сайтами прямої орієнтації знайшла своє застосування при створенні безмаркерних трансгенних рослин [194]. Традиційні методи отримання трансгенних рослин базуються на використанні селективних генів стійкості до антибіотиків та гербіцидів [195]. Експресія перенесених селективних генів надає метаболічні переваги трансгенним клітинам, створюючи умови для розвитку та диференціації трансформованих тканин. Після завершення селекції трансгенних рослин присутність селективних генів стає непотрібною, а видалення цих генів з геному трансгенних рослин створює переваги з точки зору біобезпеки. Вперше видалення селективного гена з геному трансгенних рослин за допомогою Cre-*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 було продемонстровано на трансгенних рослинах тютюну [196]. Рослини тютюну були трансформовані вектором, який містив ген люциферази та ген стійкості до гігromіцину (*hpt*) в оточенні *lox* сайтів. Отримані трансгенні рослини були повторно трансформовані вектором, який містив ген ферменту Cre рекомбінази. В роботі було підтверджено проходження рекомбінації, в результаті якої відбулось видалення селективного маркерного гену *hpt* з геному подвійних трансформантів. Надалі з використанням системи Cre-*lox* були отримані

безмаркерні трансгенні рослини таких видів як арабідопсис [197], кукурудза [198], соя [199], картопля [200], томат [201], баклажан [202].

Послідовність ДНК селективного маркеру, розміщена між двома *lox*-сайтами, видалялась завдяки експресії Cre рекомбінази після проведення повторної трансформації вектором, що містить Cre рекомбіназу [196], транз'єнтної експресії [203] або індукцибельній експресії гену рекомбінази [197] в геномі трансгенної рослини. В лабораторії Maliga була показана можливість видалення селективних маркерів за допомогою Cre/*lox* системи рекомбінації з хлоропластного геному [204, 205].

При створенні безмаркерних трансгенних рослин томату, що містять ген стилбенсинтази винограду (*vst1*), була використана індукована саліциловою кислотою експресія гену *cre* [201]. Ген *cre* під контролем промотору PR-белку (PR1-а) та селективний ген *nptII* у векторі були розміщені між двома *lox* сайтами. Видалення з геному регенерантів рослин томату генів *cre* та *nptII* було індуковано доданою до живильного середовища саліциловою кислотою. Ефективність видалення селективного гену становила 41% від загальної кількості експлантів, які були перенесені на середовище, що містило саліцилову кислоту. Було показано синтез резвератрола (стилбенсинтаза каталізує реакцію синтезу резвератрола з трьох молекул малоніл-СоА та однієї молекули 4-кумарил-СоА) в трансгенних безмаркерних рослинах томату. Резвератрол є антиоксидантом, який блокує вільнорадикальні реакції, протидіючи процесам старіння та пухлиноутворення. За допомогою Cre/*lox* системи рекомбінації також були отримані трансгенні безмаркерні рослини ріпаку та тютюну з геном стилбенсинтази [206, 207]. Для експресії рекомбінази була використана тканиноспецифічна активація експресії гену *cre* (насіннево-специфічний напіновий промотор), завдяки якій відбувалась ексцизія селективного гену *bar* та гену *cre*. Показано, що ефективність видалення селективного гену *bar* сягала 81%. З використанням Cre/*lox* системи рекомбінації в США був отриманий та дозволений для комерційного використання трансгенний сорт безмаркерної кукурудзи [208].

В роботі [209] була запропонована система для видалення селективних генів, що базується на використанні Cre-lox системи рекомбінації бактеріофагу P1 під контролем мінімального 35S промотора. Запропонований підхід успішно був реалізований на прикладі трансгенних рослин арабідопсису, в яких було підтверджено поступове видалення маркерного гену у наступних поколіннях [210].

В цілому можна констатувати, що успішність технології створення безмаркерних трансгенних рослин з використанням Cre-lox системи рекомбінації підтверджена на багатьох видах і знаходить все більш широке застосування завдяки можливості вирішувати питання пов'язані з комерціалізацією трансгенних рослин.

1.2.2. Сайт-специфічна інтеграція Т-ДНК за допомогою системи рекомбінації Cre/lox

Рекомбіназну активність Cre можна використати не лише для ексцизії, а і для інсерції послідовності ДНК у рослинний геном, оскільки Cre може інтегрувати кільцеву молекулу ДНК у лінійну, якщо кожна з них містить loxP. Спрямована інтеграція Т-ДНК у визначену ділянку геному вирішує проблему залежності рівня експресії перенесених генів від «ефекту положення» та множинних вставок, які зумовлюють «замовчування генів» внаслідок гомології. Ця ідея була успішно реалізована на протопластах тютюну (*Nicotiana tabacum*) при використанні прямої трансформації [211, 212], трансгенних рослинах рису, отриманих біолістичним методом [213, 214], та трансгенних рослинах арабідопсису та тютюну, отриманих за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* [215, 216, 217]. Безпосередньо сайт-специфічна інтеграція Т-ДНК була малоімовірною подією (4%), а в більшості випадків відбувалась випадкова інтеграція Т-ДНК в рослинний геном, і лише після цього відбувалась сайт-специфічна рекомбінація [215].

Використання системи Cre/lox рекомбінації для спрямованої інтеграції Т-ДНК передбачає на першому етапі створення трансгенних рослин, які містять

у геномі сайт рекомбінації. Оскільки інсерція ділянки ДНК, опосередкована рекомбіназою, є зворотною подією і знаходиться під загрозою реверсії, розроблено декілька стратегій, які здатні, після проходження інтеграції, завадити подальшій рекомбіназній активності. Так, для контролю експресії гену Cre використовують транзійтну (тимчасову) експресію [211, 215]. Інша стратегія базується на здатності рекомбінази розпізнавати змінені (мутовані) послідовності сайтів, але субстратом для рекомбінації може бути лише певна пара рекомбінаційних сайтів.

Найчастіше мутовані послідовності *loxP* сайту містять нуклеотидні заміни у послідовності спейсера, і оскільки було встановлено, що розмір спейсера (8 п.н.) є визначальним для ефективної рекомбінації, в той час як його послідовність не є критичною, якщо вона ідентична в обох *lox* сайтах, які беруть участь у рекомбінації. Таким чином, рекомбінація відбудеться між парою гомотипових, але не гетеротипових послідовностей. Так, було продемонстровано, що спейсерний мутантний *lox5171* сайт здатний зумовити рекомбінацію в парі з таким самим сайтом, та не є функціональним в парі з *loxP* сайтом дикого типу [218]. Ця властивість була використана у підході, що отримав назву «обмін касети, опосередкований рекомбіназою» (RMCE – recombinaase-mediated cassette exchange) і застосовується для інсерцій ДНК послідовностей в геном рослини [219]. В RMCE селективний маркер, фланкований гетеротиповими *lox* сайтами, вводиться у геном за допомогою генетичної трансформації. Потім потрібна ДНК вводиться у район інсерції селективного гена, замінюючи його шляхом рекомбінації. Кінцевий продукт обміну не здатний вступати у нові раунди рекомбінації, оскільки його фланкують гетеротипові (несумісні) *lox* сайти.

У стратегії інверсії ДНК, що називається FLE_x (flip excision) фрагмент ДНК, який планують інвертувати, фланкований двома парами сумісних гетеротипових сайтів. Рекомбінація між будь-якою з цих двох пар призводить до інверсії ДНК, включно з інверсією внутрішнього сайту *loxP*. Це, в свою чергу, розташовує гомотипові сайти у одній орієнтації і зумовлює ексцизію

ДНК між ними. Кінцевим продуктом є інвертована касета, фланкована двома гетеротиповими сайтами, що не здатні рекомбінувати.

Інший клас мутантних *lox* сайтів – із змінами у структурі інвертованих повторів – також використовують для конструювання стабільних інсерцій та інверсій. У цьому випадку послідовності *loxP* містять нуклеотидні заміни у межах інвертованих повторів, що порушує здатність рекомбінази зв'язуватись із ДНК. Сайт, що містить нуклеотидну заміну у лівому інвертованому повторі (LE мутантний сайт), може рекомбінувати з низькою ефективністю із сайтом, що містить аналогічну заміну у правому інвертованому повторі (RE мутантний сайт). Продукт рекомбінації між LE та RE мутантними сайтами міститиме один сайт дикого типу та один мутантний – LE+RE, що не є субстратом для рекомбіназної реакції.

Створення мутантних сайтів розширило можливості використання системи Cre/*lox* рекомбінації як для спрямованої інтеграції Т-ДНК, так і для ексцизії селективних маркерів. Численні запропоновані стратегії конкурують у зручності та ефективності їх використання для створення трансгенних рослин, які мають необхідний рівень експресії гену інтересу та не містять генів стійкості до антибіотиків. Все це підтверджує той факт, що Cre/*lox* система рекомбінації стала надійним та перспективним інструментом для розв'язання широкого кола фундаментальних та практичних проблем, вирішення яких іншими методами було б набагато складнішим або й неможливим.

Не дивлячись на доскональне вивчення Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 та накопичення великої кількості даних по її використанню для проведення генетичних маніпуляцій у трансгенних рослинах, нам ніколи не траплялись опубліковані дані про можливі регуляторні властивості послідовностей *lox* сайтів. Тоді як в наших дослідженнях коротка генетична послідовність рекомбінаційного сайту *lox*, яку жодне з проаналізованих нами джерел не відносить до регуляторних, забезпечувала стабільну експресію *bar* гену, що розпізнавалась завдяки виникненню у трансгенних рослин стійкості до фосфінотрицину. В роботі було визначено умови, за яких відбувається *lox*-

опосередкована експресія гену в трансгенних рослинах, та доведено можливість використання *lox*-опосередкованої експресії для різних видів рослин та інших перенесених генів.

Розділ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Характеристика реактивів

Для приготування розчинів та живильних середовищ використовували мінеральні солі та цукри, агар (Хімлаборреактив, Україна). В роботі також використовували реактиви:

Таблиця 2.1

Список реактивів, які були використані в роботі

Реактив	Виробник	Реактив	Виробник
Антибіотики		Фітогормони	
канаміцин	Duchefa, Нідерланди	ІОК	Duchefa, Нідерланди
цефотаксим	Борщагівський ХФЗ, Україна	НОК	Duchefa, Нідерланди
тетрациклін	Sigma, США	БАП	Duchefa, Нідерланди
карбеніцилін	Duchefa, Нідерланди	2,4 D	Duchefa, Нідерланди
ріфампіцин	Мосмедпрепараты, Росія	Зеатин	Duchefa, Нідерланди
гентаміцин	Duchefa, Нідерланди	Кінетин	Duchefa, Нідерланди
Гербіциди		ГК ₃	Duchefa, Нідерланди
фосфінотрицин	Duchefa, Нідерланди	2,4 – Д	Duchefa, Нідерланди
Реактиви для молекулярно-біологічного аналізу			
Tris-ОН	Sigma, США	Дезоксинуклеотид трифосфати	Thermo Scientific, (EU) Lithuania
Агароза	Sigma, США	Taq-полімераза	Thermo Scientific, (EU) Lithuania
бромістий етидій	Sigma, США	Triton X-100	Sigma, США
ЕДТА	Sigma, США	ЦТАБ	Sigma, США
Ферменти рестрикції	Promega, Amersham	ДСН	Sigma, США
Реактиви для гістохімічного та флуориметричного аналізу			
X-Gluc	Duchefa, Нідерланди	МЕС	Duchefa, Нідерланди
4-MU	Sigma, США	Кумасі	Serva, ФРН
4-MUG	Sigma, США	меркаптоетанол	Loba Feinchemie, Austria

2.2. Векторні конструкції та бактеріальні штами

Концепція роботи вибудовувалась на припущенні, що саме дизайн вектору - комбінація послідовностей та порядок їх розміщення – створили умови для *lox*-опосередкованої експресії перенесеного гену. Тому в роботі були використані різні варіанти векторів, відмінності в будові яких дозволили зробити висновки стосовно умов, необхідних для проходження *lox*-опосередкованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах.

Для генетичної трансформації використовували бінарні вектори: pICH3737, pICH3744, pICH9414, pICH9393, pICH9702, pICH1754, pICH3831, pICBV19, pICBV16, pICH1567, pCB164, pCB148, pCB108, pCB100, pCB221. Генетичні конструкції pICH3737, pICH3744, pICH9414, pICH9393, pICH9702, pICH1754, pICH3831, pICBV19, pICBV16, pICH1567 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН).

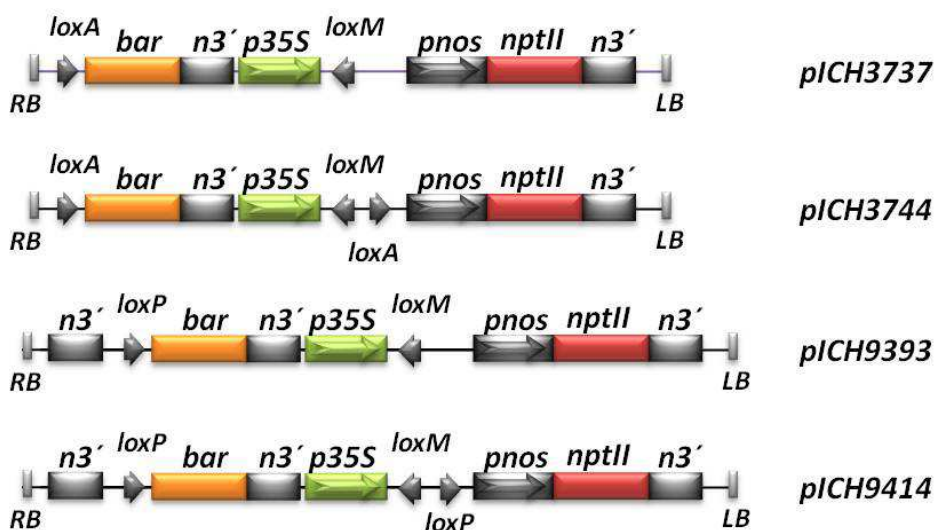


Рис. 2.1. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів pICH3737, pICH3744, pICH9393, pICH9414: *p35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *pnos* – промотор гену нопалінсинтази; *n3'*, *ocs3'* – термінатори генів нопалін- та октопінсинтази; *loxP*, *loxA*, *loxM* – послідовності сайтів рекомбінації бактеріофагу P1; RB, LB - правий та лівий повтори, які обмежують Т-ДНК.

Вектори pICH3737 та pICH3744 містять структурну послідовність *bar* гену без промотору, обмежену інвертованими *loxM* та *loxA* сайтами, біля правого бордеру Т-ДНК. Вектор pICH3744 містить додатковий *loxA* сайт в середині вектору, який знаходиться у прямій орієнтації по відношенню до

першого *loxA* сайту. Т-ДНК вектору також містить селективний ген *npt II*, що знаходиться під контролем *nos* промотора та забезпечує стійкість трансгенних рослин до антибіотику канаміцину (рис. 2.1). Вектори pICH9393 та pICH9414 відрізняються від векторів pICH3737 та pICH3744 тим, що містять *nos* термінатор між послідовністю правого бордеру та *lox* сайту. Також ці вектори містять *lox* сайти дикого типу *loxP* замість мутантних *loxA* сайтів (рис. 2.1).

Вектори pICH9702 та pICH1567 також містять кодуєчу послідовність *bar* гену без промотору, обмежену інвертованими *lox* сайтами, але на відміну від попередніх векторів, ця послідовність знаходиться в середині вектору. Різниця між ними полягає в тому, що у векторі pICH1567 був використаний мутантний *lox* сайт – *loxA*, а у векторі pICH9702 - послідовність *lox* сайту дикого типу *loxP* (рис. 2.2).

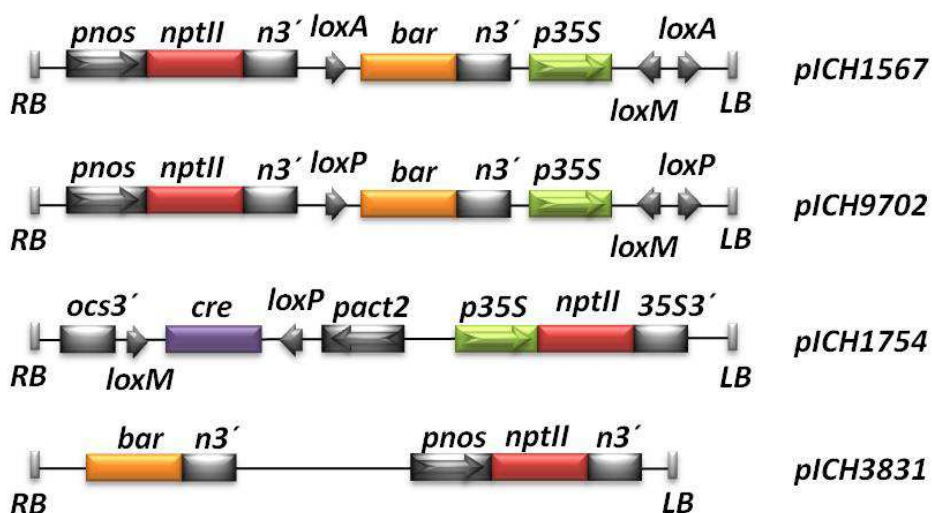


Рис. 2.2. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів pICH1567, pICH9702, pICH3831: *p35S* – промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *pnos* – промотор гену нопалінсинтетази; *n3'*, *ocs3'* – термінатори генів нопалін- та октопінсинтетази; *loxP*, *loxA*, *loxM* – послідовності сайтів рекомбінації бактеріофагу P1; *pact2* – актиновий промотор *Arabidopsis thaliana*; *35S3'* – термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти; *cre* – послідовність гену рекомбінази Cre бактеріофагу P1.

На основі вектора pICH3737 було створено вектор pCB108. В результаті делеції по сайтах ендонуклеаз рестрикції *XhoI* та *Ehe* був вирізаний фрагмент Т-ДНК, який містив послідовність 35S промотору та гену *npt II*. Таким чином вектор pCB108 містить послідовності *lox* сайту та *bar* гену без промотору біля правого бордеру без додаткового селективного гену. У векторі pCB148

послідовність *loxA* сайту була замінена (розщеплення ендонуклеазами рестрикції *Bam*HI та *Ecl*136II) на АТ-багату послідовність міжгенного спейсеру між генами *petB* (гену цитохромного b_6/f комплексу) та *psbB* (гену фотосистеми II) з пластоми тютюну (рис. 2.3).

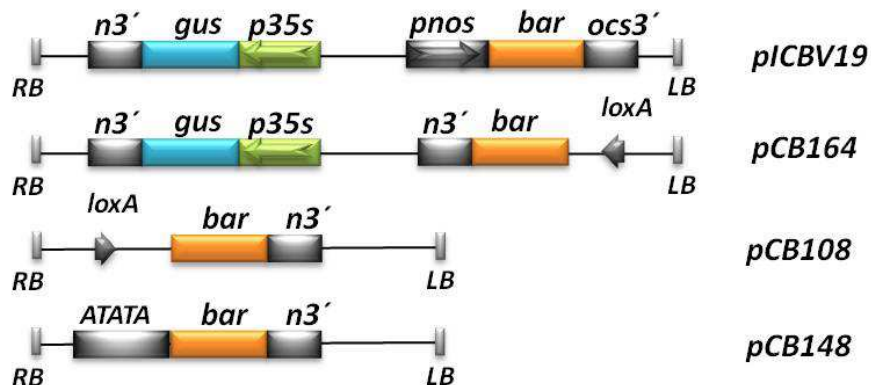


Рис. 2.3. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів **pCB164**, **pCB108**, **pCB148**: *ATATA* – АТ-багата послідовність міжгенного спейсера хлоропластної ДНК тютюну; *gus* - ген β -глюкуронідази; *n3'*, *ocs3'*– термінатори генів нопалін- та октопінсинтези; *loxA* – послідовність сайту рекомбінації бактеріофагу P1.

Вектор pCB100 (рис. 2.4) був створений на основі вектора pICH9393 (рис. 2.1), в якому послідовність *bar* гену без промотора було замінено на послідовність *gus* гену з вектора pICBV19 (також без промотора) (рис. 2.3). При конструюванні вектору ділянка із селективним геном *npt II*, що надає трансгенним рослинам стійкість до антибіотику канаміцину, не змінювалась. Послідовність, що включає *bar* ген, незалежний 35S промотор та *lox* сайт в середині вектору, була видалена за допомогою ендонуклеаз рестрикції *Sac*I та *Pst*I. Лінійний фрагмент вектору очищали із гелю після електрофоретичного розділення продуктів рестрикції. Очистку проводили за допомогою набору для виділення фрагментів ДНК (Gel extraction kit, Thermo Scientific, (EU) Lithuania). Також проводили очистку фрагменту, що містить структурну частину *gus* гену, який було вирізано з вектору pCB19 також за допомогою ендонуклеаз рестрикції *Sac*I та *Pst*I. Використання одних й тих самих ендонуклеаз рестрикції при вирізанні фрагменту та розщепленні плазмиди дало змогу провести лігування очищеного лінійного вектору та структурної частини гену *gus* без

додаткових маніпуляцій. Реакцію лігування проводили за допомогою ДНК лігази (Gel extraction kit, Thermo Scientific, (EU) Lithuania), згідно рекомендацій, що надані у супровідних документах. Продуктами лігування трансформували *Escherichia coli* штаму XL1-Blue, відбирали стійки до антибіотику колонії, плазмідну ДНК яких перевіряли рестриктивним картуванням.

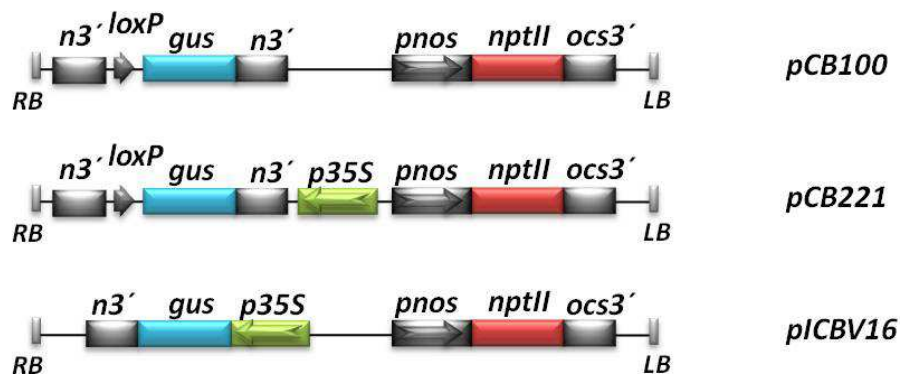


Рис. 2.4. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів **pCB100**, **pCB221**, **pICBV16**: *gus* - ген β -глюкуронідази; *n3'*, *ocs3'* – термінатори генів нопалін- та октопінсинтетази; *loxP* – послідовність сайту рекомбінації бактеріофагу P1.

В результаті був отриманий вектор pCB100, що містить структурну послідовність *gus* гену без промотора, а також *loxP* сайт та *nos* термінатор біля правого бордеру (рис. 2.4). На основі вектора pCB100 був створений вектор pCB221, в який було додано послідовність енансеру 35S промотору в середині вектора безвідносно до послідовності будь-якого з генів. Послідовність 35S промотору була вирізана з вектору pICBV16. Плазміда була «розлінієна» ендонуклеазою рестрикції *EcoR1*, а виступаючий 3' кінець видалений (утворений «тупий» кінець) за допомогою фрагмента Кльонова (Thermo Scientific, (EU) Lithuania). Потім вставка була вирізана ендонуклеазою рестрикції *NcoI*. Підготовка вектора pCB100 проходила у три етапи: розщеплення ендонуклеазою рестрикції *PstI*, обробка фрагментом Кльонова, розщеплення ендонуклеазою рестрикції *NcoI*.

Коректно зібрані бінарні векторні конструкції переносили в *Agrobacterium tumefaciens* штаму GV3101 методом електропорації з використанням MicroPulser Electroporator (BioRad, США).

2.3. Трансформація *A. tumefaciens* методом електропорації

Трансформацію *A. tumefaciens* проводили методом електропорації відповідно до рекомендацій, що запропоновані у супровідних документах до приладу. Суспензійну культуру агробактерії штаму GV3101, що нарощувалась протягом ночі, осаджували центрифугуванням. Отриманий осад тричі промивали стерильною дистильованою водою, ресуспендували у невеликому об'ємі дистильованої води та фасували по 100 мкл у стерильні пробірки епендорф. До отриманих компетентних клітин агробактерії додавали 1-5 мкл плазмідної ДНК та проводили електропорацію. Після цього до суспензії додавали 1 мл рідкого середовища LB [220] та інкубували при температурі 28⁰С протягом 6-ти годин. Отриману бактеріальну культуру висівали на агаризоване середовище LB, доповнене відповідними антибіотиками (ріфампіцин 50 мг/л, гентаміцин 25 мг/л, карбеніцилін 50 мг/л або канаміцин 100 мг/л в залежності від вектору) та інкубували протягом 3-х діб в темноті при температурі 28⁰С. Отримані на селективному середовищі агробактеріальні колонії переносили в рідке середовище з відповідними антибіотиками та вирощували на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі 28⁰С протягом 48 годин. Для підтвердження факту пренесення ДНК вектору до агробактерії проводили виділення плазмідної ДНК з бактеріальної суспензії та її рестрикційний аналіз.

Отримані агробактеріальні лінії з відповідним вектором вирощували на рідкому середовищі LB з додаванням відповідних антибіотиків (ріфампіцин 50 мг/л, гентаміцин 25 мг/л, карбеніцилін 50 мг/л або канаміцин 100 мг/л в залежності від вектору) на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі 28⁰С протягом 48 годин.

2.3.1. Виділення плазмідної ДНК

Виділення плазмідної ДНК проводили лужним методом [221] з деякими модифікаціями. *E. coli* штам XL-Blue, що несе один з бінарних векторів, вирощували в рідкому середовищі LB з додаванням 10 мг/л тетрацикліну та відповідних антибіотиків на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при температурі

37⁰С протягом ночі. Бактеріальну суспензію переносили в центрифужні пробірки 1,5 мл (Eppendorf, США) та осаджували центрифугуванням 6 тис. об/хв. протягом 5 хв. Отриманий осад ресуспендували у 200 мкл розчину 1 (50 мМ глюкоза, 25 мМ Tris-HCl pH 8,0, 10 мМ ЕДТА), додавали 400 мкл лізуючої суміші (0,2 NaOH, 1% ДСН) та інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хв. Потім додавали 600 мкл 3 М розчину ацетату калію та інкубували на льоду 20 хв, після чого осаджували центрифугуванням при 15 тис. об/хв., при 4⁰С протягом 15 хв. Супернатант, який містив розчинену плазмідну ДНК, переносили в нові пробірки, проводили очищення сумішшю хлороформ/ізоаміловий спирт (24 : 1) та центрифугували при 15 тис. об/хв., протягом 5 хв. Водну фазу переносили в нові пробірки та додавали 0,6 об'єму ізопропанолу для осадження плазмідної ДНК. Через 15-20 хв. отриманий осад осаджували центрифугуванням (6 тис. об/хв., 5 хв.), промивали 70% етанолом підсушували та розчиняли у 20-40 мкл стерильної деіонізованої води.

2.4. Рослинний матеріал

В дослідницькій роботі для експериментів з генетичної трансформації використовували асептичні рослини тютюну (*Nicotiana tabacum*) сорту Wisconsin, *Nicotiana africana* як модельні об'єкти та рослини салату (*Lactuca sativa*) сорту Одеський кучерявий. Крім того, рослини *Nicotiana benthamiana*, які вирощувались в умовах теплиці, використовувались для експериментів з транз'єнтної експресії. Насіння тютюнів було надано Банком зародкової плазми рослин світової флори Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України.

2.5. Поверхнева стерилізація насіння та умови культивування рослин

Для введення в культуру *in vitro* насіння тютюну та салату стерилізували, витримуючи протягом 1 хв. у 70% етиловому спирті, а потім 15 хв. у 50% розчині комерційного препарату Domestos, що містить ~ 5% гіпохлориту натрію. Далі насіння багаторазово відмивали стерильною дистильованою водою та

висівали на безгормональне агаризоване живильне середовище. Насіння пророщували при температурі $+24^{\circ}\text{C}$ та 16-годинному світловому періоді.

Як базове живильне середовище для культивування рослин та експлантів *N. tabacum* та *N. africana* використовували середовище MS [222], а для культивування рослин та експлантів салату - середовище B5 [223]. Стерилізацію живильних середовищ проводили за допомогою автоклавування при 121°C протягом 25 хв.

2.6. Генетична трансформація рослин, опосередкована *A. tumefaciens*

Генетичну трансформацію рослин проводили за допомогою *A. tumefaciens* штам GV3101, яка була трансформована відповідним вектором. Спільне культивування сегментів асептичних рослин та розведеної суспензії *A. tumefaciens* проводили протягом 12-36 годин, використовуючи розведення нічної культури у 3-4 рази. Для цього нічну бактеріальну культуру осаджували при 6 об/хв., 4°C протягом 10 хв. та ресуспендували у відповідному об'ємі рідкого середовища MS. До отриманої бактеріальної суспензії додавали ацетосирінгон до кінцевої концентрації 0,2 мМ та культивували протягом 2-ох годин на ротаційному шейкері (200 об./хв.).

2.6.1. *Nicotiana africana*

Для агробактеріальної трансформації рослин *N. africana* використовували коріння, листки та міжвузля рослин, що зростали в асептичних умовах. Корені попередньо інкубували протягом 3-4-ьох днів на середовищі для індукції калюса MS4 (табл. 2.1).

При проведенні спільного культивування з агробактерією, експланти занурювали в агробактеріальну суспензію та інкубували протягом 20-30 хв. Після цього експланти переносили на агаризоване середовище MS4 та продовжували спільне культивування ще 48 годин, в темряві, при 24°C . Надалі експланти відмивали стерильною дистильованою водою. Далі корені

інкубували 10-14 днів (до візуалізації калусних тканин в місцях ушкодження коренів) на середовищі MS4, що містило 500 мг/л цефотаксиму.

Таблиця 2.2

**Склад живильних середовищ,
які були використані для регенерації рослин.**

Середовище	Солі та вітаміни	Гормони	Амінокислоти*	Інші складові
MS	макро- та мікросолі MS, вітаміни Мореля			сахароза – 30 г/л
MSR	макро- та мікросолі MS, вітаміни Мореля	БАП - 1,0 мг/л; НОК – 0,1 мг/л		сахароза – 30 г/л
MS4	макро- та мікросолі MS, вітаміни Мореля	2,4-Д -2,0 мг/л НОК – 1,0 мг/л; БАП - 0,1 мг/л; кінетин - 0,1 мг/л		сахароза – 30 г/л
MSZ	макро- та мікросолі MS, вітаміни Мореля	НОК – 0,5 мг/л; зеатин - 1 мг/л;	L-глутамин 200 мг/л	сахароза – 30 г/л, аденін – 40 мг/л
MST	макро- та мікросолі MS, вітаміни Мореля	тїдіазурон 1-2 мг/л НОК – 0,05 мг/л	гліцин - 200 мг/л	сахароза – 30 г/л
B5	макро- та мікросолі B5, вітаміни Мореля			сахароза – 30 г/л
B5R	макро- та мікросолі B5, вітаміни Мореля	кінетин - 3,0 мг/л НОК – 0,1 мг/л	L-глутамин 200 мг/л	сахароза – 30 г/л, полівініл-піролідон 400 мг/л

*- амінокислоти додавали до живильного середовища лише у тих випадках, коли не проводилась селекція з використанням фосфінотрицину.

Кореневі експланти, на яких розпочалось утворення калюсу, переносили на середовище для регенерації MSZ (табл. 2.2) з селективним антибіотиком канаміцином в концентрації 50 мг/л. Раз на два тижні експланти переносили на

свіже регенераційне середовище, поступово зменшуючи концентрацію цефотаксиму. Через 16-18 тижнів спостерігалась масова регенерація рослин *N. africana*. Укорінення регенерантів проводили на безгормональному середовищі MS.

Міжвузля та листкові експланти після проведення спільного культивування з агробактеріальною суспензією одразу переносили на середовище для регенерації. Середовище, що містило 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НОК (MSR), було більш ефективним для регенерації рослин з листкових експлантів, ніж середовище з іншими комбінаціями регуляторів росту: MSZ та MST (див. табл. 2.2). В експериментах, в яких в якості експлантів були використані міжвузля, найбільш ефективним виявилось середовище MSZ, що містило в якості регуляторів росту 1 мг/л зеатину та 0,5 мг/л НОК. Отримані пагони були перенесені на селективне безгормональне середовище MS для вкорінення.

2.6.2. *Nicotiana tabacum*

Генетичну трансформацію тютюну проводили методом спільного культивування сегментів листків асептичних рослин з рідкою агробактеріальною культурою протягом ночі на ротаційному шейкері (200 об./хв.) при 24⁰С. Для цього 0,2 мл нічної агробактеріальної суспензії додавали до 20 мл рідкого середовища MS, яке містило ацетосирінгон в кінцевій концентрації 0,2 мМ. Після спільного культивування експланти просушували на стерильному фільтрувальному папері та переносили на агаризоване регенераційне середовище MSR - середовище MS, до якого було додано 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НОК (табл. 2.1), селективний агент канаміцин в концентрації 100 мг/л та цефотаксим, для елімінації бактерії, в концентрації 800 мг/л.

Укорінення регенерантів проводили на безгормональному середовищі MS, яке містило канаміцин в концентрації 100 мг/л.

2.6.3. *Lactuca sativa*

Для генетичної трансформації *Lactuca sativa* використовували сім'ядолі тижневих асептичних проростків, як було запропоновано [224]. При проведенні спільного культивування з агробактерією застосовували вакуум-інфільтрацію, яку проводили згідно Kishchenko et al., [225]. Розведену нічну культуру агробактерії використовували для інфільтрації, яку проводили шляхом зниження тиску у вакуумній камері до 0,05 атм. Після проведення інфільтрації експланти залишали на стерильному вологому фільтрувальному папері ще протягом доби при кімнатній температурі. Регенерація рослин салату проводилась на середовищі B5R доповненому 800 мг/л цефотаксиму, а також 25 мг/л канаміцину для селекції, і відбувалась приблизно через 2-4 тижні культивування. Після спільного культивування з агробактерією ефективність регенерації складала близько 50-60%. Укорінення рослин проводили на середовищі B5, доповненому 0,4 мг/л НОК, 500 мг/л полівінілпіралідону, 5 мг/л фосфінотрицину.

2.7. Генетична трансформація рослин *N. tabacum* за допомогою біолістичного методу

Біолістичну трансформацію листків тютюну проводили згідно [226]. Плазмідну ДНК виділяли з нічної культури *E.coli* XL-blue, використовуючи QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Promega, США). Для абсорбції плазмідної ДНК на мікрочастинках вольфраму (Tungsten M-17 Microcarriers, 1,1 мкм, BioRad, США) 10 мкл ДНК (1 мкг/мкл) додавали до 50 мкл суспензії частинок вольфраму (0.06 мг/мл в 50% розчині гліцерину), розфасованих у 1,5 мл пробірки Eppendorf. До отриманої суспензії додавали 10 мкл розчину PEG/MgCl₂ (50% PEG 2000, 5 М MgCl₂). Після інкубації, що тривала 20 хв. при кімнатній температурі, для осадження частинок проводили центрифугування на мікроцентрифузі протягом 0,5 хв., після чого супернатант відбирали, а осад ресуспендували у 60 мкл абсолютного етанолу. Листки асептичних рослин були розміщені на агаризованому середовищі MSR, до якого було додано манітол у

концентрації 0,2 М, на відстані 14 см від отвору «генної гармати». Для проведення бомбардменту тиск у вакуумній камері було зменшено до 0,05 атмосфер. В експериментах для кожної з конструкцій було використано десять чашок Петрі (десять пострілів). Після проведення бомбардменту чашки Петрі з експлантами залишали на декілька днів на тому ж середовищі в напівтемряві при кімнатній температурі. Через 3-4 доби листки різали на невеликі сегменти і переносили на середовище для регенерації MSR, яке містило 100 мг/л канаміцину.

2.8. Адаптація рослин в ґрунті та обробка гербіцидом

В умовах теплиці отримані трансгенні рослини вирощували при температурі +24⁰С та 16-годинному світловому періоді. Для перевірки стійкості рослин, що росли в теплиці, до фосфінотрицину проводили обробку розчином препарату Basta (Bayer Crop Science, ФРН) - активна речовина глюфозинат амонію 150 г/л. Для оприскування рослин використовували концентрацію препарату Basta 2,5 мл/л.

2.9. Аналіз рослин, отриманих в результаті генетичної трансформації

2.9.1. Молекулярно-біологічний аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції

Для доведення інтеграції трансгенів в геном рослин, які було відібрано після генетичної трансформації на селективному середовищі, проводили ПЛР-аналіз сумарної рослинної ДНК, яку виділяли за допомогою ЦТАБ методу згідно [227] з деякими модифікаціями. Сегменти листків рослин (200-300 мг), видаливши центральну жилку, заморожували при -70⁰С. Заморожений рослинний матеріал розтирали в охолоджених ступках, переносили в пробірки 1,5 мл (Eppendorf, США) та додавали буфер для екстракції ДНК (100 мМ Tris-HCl, 20 мМ ЕДТА, 1,4 М NaCl, 2% ЦТАБ, 40 мМ меркаптоетанол). Отриману суспензію інкубували при 56⁰С протягом 20 хв., після чого проводили

депротеїнізацію, додавши рівний об'єм суміші хлороформ/ізоаміловий спирт (24 : 1). Отриману суміш розділяли на дві фази центрифугуванням протягом 5 хв., при 14 тис. об/хв. Верхню фазу відбирали і проводили додаткове очищення розчиненої ДНК сумішшю хлороформ/ізоаміловий спирт. Водну фазу переносили у нові пробірки та додавали буфер для осадження ДНК (50 мМ Tris-HCl, 10 мМ EDTA, 1% ЦТАБ.). Отриману суміш інкубували при кімнатній температурі 20-60 хв. та осаджували при 14 тис. об/хв., 5 хв. Осад розчиняли у 400 мкл 1,2 М NaCl та за необхідності (при наявності недорозчинених залишків) прогрівали при 56⁰С протягом 15-60 хв. ДНК із водної фази переосаджували двома об'ємами 96% етилового спирту протягом ночі. Надалі ДНК осаджували центрифугуванням 14 тис. об/хв., 5 хв. Отриманий осад двічі промивали 70% етиловим спиртом, підсушували та розчиняли у 40 мкл деіонізованої стерильної води. Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили згідно рекомендації [221] на ампліфікаторі Mastercycler personal (Eppendorf, США). Загальний об'єм суміші становив 20 мкл: 1 мкл (приблизно 100 нг) сумарної рослинної ДНК, 2 мкл сольового буфера (10 мМ Tris-HCl, рН 9,0, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,01% Тритон X-100), 2 мкл суміші дезоксинуклеотидтрифосфатів (Thermo Scientific, (EU) Lithuania) із розрахунку 200 мкМ кожного в реакційній суміші, 0,5 мкл кожного з праймерів (0,2 мкМ), 0,1 мкл Taq-полімерази (Thermo Scientific, (EU) Lithuania) та 15 мкл стерильної деіонізованої води.

Як позитивний контроль для реакції ампліфікації використовували плазмідну ДНК векторів, за допомогою яких проводили генетичну трансформацію рослин. Плазмідну ДНК для проведення експериментів виділяли з нічної культури *E. coli*, використовуючи лужний метод [221], як описано в п. 2.3.1.

В таблиці 2.3 представлена інформація про нуклеотидні послідовності праймерів, які використовували в роботі для проведення ПЛР, температуру реасоціації та розмір очікуваного фрагменту, що синтезується в результаті реакції.

Таблиця 2.3

Праймери, які були використані для проведення ПЛР

Ген	Назва	Нуклеотидна послідовність	Темпера- тура реасоціації	Розмір продукту ампліфікації
<i>bar</i>	bar36/fw	5'ATGAGCCCAGAACGACGCCCCGGCC 3'	65 ⁰ C	409 п. н.
	bar36/rv	5'GCATGCGCACGGTCGGGTCGTTGG 3'		
	bar37/fw	5'CCGTACCGAGCCGCAGGAAC 3'	65 ⁰ C	463 п.н.
	bar37/rv	5'CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC 3'		
<i>npt II</i>	kan51/fw	5'CCTGAATGAACTCCAGGACGAGGCA 3'	65 ⁰ C	622 п.н.
	kan51/rv	5'GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG 3'		
	kan53/fw	5'GAGGCTATTCGGCTATGACTG 3'	60 ⁰ C	840 п.н.
	kan53/rv	5'CAAGCTCTTCAGCAATATCACG 3'		
<i>gusA</i>	gus25/fw	5'CGATGCGGTCACTCATTACGGC 3'	60 ⁰ C	809 п.н.
	gus25/rv	5'GCCTGTAAGTGCCTTGCTGAG 3'		
	gus34/fw	5'TGGGTGGACGATATCACCGTGCTGA 3'	56 ⁰ C	423 п.н.
	gus34/rv	5'GGCCCCAATCCAGTCCATTAATGCG 3'		
noster/ <i>bar</i>	noster/fw bar37/rv	5`-GTTGCCGGTCTTGCGATGATTATC-3` 5`-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGAC-3`	65 ⁰ C	870 п.н.
actpr/ <i>bar</i>	actpr/fw bar37/rv	5`-AGCTATTTCTGATTCAATCAGGG-3` 5`-CTCGGCCGTCCAGTCGTAG-3`	65 ⁰ C	320 п.н.

2.9.2. Аналіз за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у поєднанні зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР)

Для доведення у трансгенних рослин наявності експресії перенесених генів на рівні транскрипції проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Сумарну РНК з рослинних

тканин виділяли за методикою [228]. Для видалення ДНК домішків з отриманого препарату РНК проводили його обробку дезоксирибонуклеазою I, вільною від рибонуклеаз (Thermo Scientific) при 37°C протягом години. Синтез першого ланцюга кДНК на матриці РНК здійснювали, користуючись наборами Thermo Scientific. В пробірці на льоду готували 11 мкл суміші, яка містила 1 мкг РНК, 0,2 мкг праймерів-гексомерів та воду. Приготовлену суміш інкубували при 70°C протягом 5 хв., знову охолоджували та додавали 4 мкл 5х буферу (250 мМ Tris-HCl, pH 8,3, 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, 50 мМ дитіотрейтолу), 1 мкл інгібітору рибонуклеаз (20 одиниць/мкл), 2 мкл суміші 10 мМ дезоксинуклеотидтрифосфатів. Після інкубації при 25°C протягом 5 хв. додавали 2 мкл зворотної транскриптази вірусу лейкозу мишей Молоні (20 одиниць/мкл) та проводили реакцію при 37°C протягом години. Реакцію зупиняли прогріванням при 70°C протягом 10 хв.

Далі 2 мкл отриманої реакційної суміші використовували як матрицю для ПЛР із специфічними праймерами до відповідного трансгену. В якості негативного контролю для ЗТ-ПЛР використовували реакційну суміш, яка не містила ревертази.

Електрофорез ампліфікованих фрагментів проводили в однократному трис-ацетатному агарозному гелі в присутності бромистого етидію. Для приготування агарозного геля використовували 1% агарозу фірми Sigma. Як маркер довжини нуклеотидних фрагментів були використані 1 т. п. н. маркери фірм GibcoBRL та Thermo Scientific.

2.9.3. Гістохімічний аналіз активності β -глюкуронідази

Аналіз експресії гену β -глюкуронідази проводили згідно [101] в 100 мМ фосфатному буфері pH 7,0, який містив 1 мМ X-Gluc, 10 мМ натрієвої солі етилендіамінтетраоцтової кислоти, 0,1% Тритон X-100, 2,5 мМ K₄[Fe(CN)₆], 2,5 мМ K₃[Fe(CN)₆], 2 мМ дитіотрейтолу, 0,1% диметилсульфоксиду та 20% метанолу при 37°C протягом ночі. Після проведення ферментативної реакції

хлорофіл з тканин видаляли, інкубуючи експланти у розчині 70% етанолу протягом 3-10 діб.

2.9.4. Флуориметричний метод визначення активності

β -глюкуронідази

Кількісну оцінку білку GUS в листках трансгенних рослин оцінювали за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції речовини 4-MU (4-Methylumbelliferone), що утворюється при розщепленні 4-MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) ферментом β -глюкуронідазою [101]. Вимірювання флуоресценції проводили в кюветах об'ємом 3 мл на спектрофлуориметрі PerkinElmer LS5, використовуючи довжину хвилі збудження 365 нм, а емісії - 455 нм. Концентрацію 4-MU в пробі визначали за допомогою калібровочної кривої, побудованої на основі стандартних розведень цієї речовини.

2.9.4.1. Екстракція загального водорозчинного білку з листків рослин

Для виділення загального білку 100-150 мг листової тканини гомогенізували в охолоджених ступках в екстракційному буфері при 4°C, використовуючи співвідношення буфера до тканини 2:1. Екстракційний буфер містив 50 мМ NaH_2PO_4 , 10 мМ Na-ЕДТА, 0,1% Тритон X-100, 0,1% натрій лауроїлсаркозин. Отриману суспензію та осаджували при 15 тис. об/хв., при 4°C протягом 15 хв. Після центрифугування 50 мкл екстракту відбирали та додавали до 250 мкл аналізуючого буферу (екстракційний буфер, доповнений 4-MUG до концентрації 1мМ) і провели інкубацію отриманої суміші при 37°C. Через годину інкубації реакцію зупиняли розчином 200 мМ Na_2CO_3 . Для цього 50 мкл суміші відбирали і додавали до 2,95 мл розчину Na_2CO_3 , а отриманий розчин переносили в кювету і проводили вимірювання інтенсивності флуоресценції. Кількість білку β -глюкуронідази оцінювали за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції речовини 4-MU (продукту ферментативного розщеплення 4-MUG) та співвідносили її із загальною кількістю білку в кожній пробі.

2.9.4.2. Вимірювання концентрації сумарного розчинного білку

Кількість тотального розчинного білку у первинному екстракті було визначено за методикою Bradford *et al.* [229]. Для приготування реагенту Бредфорда 10 мг кумасі синій (Coomassie Brilliant Blue G-250, Serva, ФРН) розчиняли у 5 мл етилового спирту, додавали 10 мл ортофосфорної кислоти та доводили до об'єму 100 мл дистильованою водою. Отриманий розчин фільтрували через паперовий фільтр та використовували для визначення концентрації тотального білку в екстракті. Оптичне поглинання суміші при довжині хвилі 595 нм вимірювали через 3 хв. після внесення реагенту на спектрофотометрі BioPhotometer (Eppendorf, США). Як стандарт для визначення концентрації білку було використано розчин бичачого сироваткового альбуміну.

2.10. Агроінфільтрація рослин *N. benthamiana*

Агроінфільтрацію проводили згідно [230, 231] з деякими модифікаціями. Нічну культуру *A. tumefaciens* штам GV3101, яка була трансформована відповідним вектором, осаджували при 6 об/хв., 4°C протягом 5 хв. та ресуспендували у буфері для інфільтрації (10 мМ МЕС, pH 5,5; 10 мМ MgSO₄). Для інфільтрації готували бактеріальну суспензію, що містила один з дослідних векторів, та вектор pICH6692, який містить ген білку P19 вірусу костистої карликовості томатів. Цей білок є супресором пост-транскрипційного та індукованого вірусами сайлесінгу генів в рослинах [232, 233] і використовується в інфільтраційній суспензії для запобігання «замовчування генів». Бактеріальні суспензії змішували у рівних об'ємах та розводили до кінцевої оптичної густини (OD⁶⁰⁰) для кожної суміші 0,6-0,8. Надалі проводили інфільтрацію агробактеріальною суспензією рослин *N. benthamiana*, що вирощувались в теплиці, за допомогою стерильних одноразових шприців на 2 мл (без голок). Визначення транз'єнтної експресії проводили на четверту добу після інфільтрації.

2.11. Статистична обробка експериментальних даних

Експериментально отримані дані обробляли за допомогою методів статистичного аналізу [234]. Для встановлення достовірності різниці у кількості фосфінотрицин-стійких трансформованих рослин, при трансформації рослин різними векторами, а також при порівнянні вибірок, отриманих при трансформації рослин *N. africana* та *N. tabacum* застосовували тест Ст'юдента (рівень значимості 5%) [234]. В тих випадках, коли порівнювали приблизно рівну кількість трансформантів, похибку різниці між кількістю фосфінотрицин-стійких трансформованих рослин обчислювали за формулою для рівновеликих вибірок (множин) (коли кількість однієї групи відрізняється від кількості другої менше ніж на 25%):

$$S_{dp} = \sqrt{\frac{m_1(n_1 - m_1)}{n_1} + \frac{m_2(n_2 - m_2)}{n_2}};$$

n_1 и n_2 – кількість трансформантів для кожного з двох векторів, що порівнюються;

m_1 и m_2 – кількість фосфінотрицин-стійких трансформованих рослин для кожного з двох векторів, що порівнюються.

Оскільки в нашій роботі було отримано майже вдвічі більше рослин *N. africana*, трансформованих вектором pICH3737, ніж рослин, трансформованих іншими векторами, то для порівняння результатів цієї групи з іншими групами була використана формула для нерівновеликих вибірок:

$$S_{dp} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2} \left(1 - \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}\right) \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}};$$

Величину t_ϕ добчислювали за формулою:

$$t_\phi = \frac{m_1 - m_2}{S_{dp}};$$

Величину t_ϕ , яка має розподілення Ст'юдента, порівнювали з її критичною точкою t_{st} для 5%-ного рівня значимості, якому відповідає вирогідність $P=0,05$ та числа ступенів свободи $k=n_1+n_2 - 2$. При $t_\phi \geq t_{st}$ різниця між кількістю

фосфінотрицин - стійких рослин визнається статистично достовірною. Риски на діаграмах відповідають довірчим інтервалам (рівень вірогідності 0,95).

Розділ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Генетична трансформація рослин *N. africana***3.1.1. Розробка методики генетичної трансформації *N. africana***

Представники роду *Nicotiana* широко використовуються в біотехнології, і не лише завдяки наявності важливих сільськогосподарських ознак, але і як зручні модельні об'єкти. Африканський тютюн, *Nicotiana africana* Merxm., відносно недавно описаний вид [235], єдиний, відомий на сьогоднішній день, представник роду *Nicotiana*, виявлений в Африці. При гібридизації з *N. tabacum* рослин *N. africana* не вдалося отримати життєздатні гібриди [236]. Застосування методів культури *in vitro* дало можливість подолати несумісність цих двох видів, та були отримані ЦЧС рослини при гібридизації *N. africana* x *N. tabacum* [237, 238]. Тестування *N. africana* на стійкість до збудників різних хвороб у *Solenaceae* показало, що рослинам притаманна стійкість до Y-вірусу картоплі. Було показано, що рослини *N. africana* виявили високий рівень резистентності до шести різних ізолятів цього вірусу, виділених з тютюну та картоплі, що належать до груп PVY^{NW}, PVY^{NZ} та PVY^{NTN}. Ці дані дозволяють розглядати *N. africana* як можливого кандидата для включення в біотехнологічні програми з перенесення цінних ознак в культурні сорти рослин. При гібридизації з *N. africana* була отримана гібридна лінія тютюну, стійка до Y-вірусу картоплі [239]. Опубліковано дані по регенерації рослин *N. africana* з протопластів [240]. В той же час ми не зустрічали робіт по генетичній трансформації *N. africana*, тоді як цей метод розширює можливості використання в біотехнології рослин цього виду.

В нашій роботі були підібрані умови генетичної трансформації та вперше створені трансгенні рослини *N. africana*. Для трансформації рослин *N. africana* було використано декілька методик, кожна з яких дозволила отримати

трансгенні рослини, але ефективність трансформації була різною (Табл. 3.1). Так, метод агробактеріальної трансформації листкових дисків, який зазвичай успішно використовується для трансформації пасльонових, наприклад, *N. tabacum*, *Petunia hybrida* [241], *Lycopersicon esculentum* [242], виявився неефективним для трансформації *N. africana*. Незважаючи на те, що були підібрані умови для регенерації рослин з листкових експлантів та міжвузлів [243], використання цих експлантів в експериментах з агробактеріальної трансформації було малоефективним. Загальні результати трансформації *N. africana* представлено в таблиці 3.1.

Табл. 3.1

**Ефективність отримання трансгенних рослин *N. africana*
за допомогою різних методів трансформації.**

метод транс-формації	тип експлантів	кількість отриманих регенерантів	кількість отриманих трансгенних рослин	ефективність трансформації, %*
Агро транс-формація	<i>листові диски</i>	142	3	2,15±0,05
	<i>корені</i>	203	110	54,95±2,05
	<i>міжвузля</i>	107	3	17,6
Пряма транс-формація	<i>листові диски</i>	19	12	64,05±2,55

* - оцінювали як співвідношення числа отриманих трансформантів до загальної кількості рослин-регенерантів в експерименті; наведено середнє значення за результатами двох експериментів та середню квадратичну похибку середнього значення.

Наведені дані свідчать, що ефективним в наших експериментах був метод прямої трансформації. Через 2 місяці після початку експерименту, приблизно 50% експлантів гинуло, а на тих, що лишились формувались центри регенерації. Ще протягом 2-3 місяців проходила регенерація рослин (рис. 3.1). Було проведено лише по одному експерименту для кожної з плазмід, в одному з

них 61,5%, а в другому 66,6% регенерантів виявились трансформантами. Однак, слід звернути увагу на той факт, що ефективність регенерації на селективному середовищі в цих експериментах була дуже низькою. Крім того, необхідно враховувати, що в експериментах з прямої трансформації листків *N. africana* гинуло 50% експлантів. Отже, навіть при високій ефективності трансформації, число трансформантів, отриманих в експерименті, є незначним.



Рис. 3.1. Регенерація рослин *N. africana* з листкових дисків після трансформації методом бомбардування частинками вольфраму.

При використанні корневих експлантів для трансформації *N. africana* регенерація трансформованих рослин проходила через стадію калюсу. При інкубації коренів на середовищі MS4 було відмічено утворення калюсу в місцях ушкодження експлантів (рис. 3.2-а).



Рис. 3.2. Утворення калюсу та регенерація рослин *N. africana* з корневих експлантів після агробактеріальної трансформації:

а – утворення калюсу через 2 тижні після трансформації на селективному середовищі, що містить 50 мг/л канаміцину; *б, в* – регенерація пагонів через 8 (*б*) та 16 (*в*) тижнів після трансформації.

При подальшому культивуванні на середовищі для регенерації, що містить селективний антибіотик, калюс продовжував активно рости. Через 4-5 місяців після трансформації калюс був вкритий зеленими пагонами (рис. 3.2-в). Отримані пагони вкорінювались на безгормональному середовищі, яке містило селективний агент канаміцин. Ми вважаємо, що цей метод є оптимальним для трансформації *N. africana*, так як висока регенераційна здатність експлантів поєднується з високою ефективністю трансформації.

3.1.2. Визначення селективної концентрації антибіотиків та гербіцидів для *N. africana* в культурі *in vitro*

Однією з умов вдалого проведення експериментів з генетичної трансформації рослин є використання оптимальної концентрації селективних агентів для відбору трансформованих клітин. Оскільки досить невелика кількість клітин рослинного експланту після співкультивування з агробактерією містить перенесену чужорідну ДНК, важливо створити умови, за яких трансформована клітина має переваги перед рештою клітин експланту. Відтворити такі умови стає можливим завдяки використанню селективних маркерних генів. Експресія цих генів в трансгенних клітинах надає переваги в умовах селективного тиску перед рештою клітин експланту, завдяки чому вони проліферують та дають початок трансформованим рослинам.

Різні види рослин значно відрізняються за чутливістю до різних селективних агентів [244, 245, 246], тому один з етапів генетичної трансформації нової культури – це визначення оптимальної концентрації селективного агенту. В наших експериментах вектори для трансформації містили ген стійкості до антибіотику канаміцину (*nptII*) та ген стійкості до гербіциду фосфінотрицину (*bar*). При використанні канаміцину як селективного агенту було встановлено, що антибіотик в концентрації 50 мг/л значно пригнічує індукцію калюсу на корневих експлантах *N. africana* (частота калюсогенезу 10%), а при 100 мг/л калюс не утворюється і експланти відмирають. Регенерація на селективному середовищі з антибіотиками є для

рослин сильним стресом, наслідком якого є гіперметилування ДНК, яке в свою чергу може стати причиною «замовчування» перенесених генів [247]. Тому вважається доцільним не використовувати «критичні» концентрації селективного агенту для селекції трансгенних рослин. Для *N. africana* ми зупинились на концентрації канаміцину 50 мг/л у середовищі для регенерації та такій самій концентрації для вкорінення пагонів на безгормональному середовищі.

В наших експериментах фосфінотрицин не використовувався на стадії регенерації рослин *N. africana*. Тестування трансгенних рослин на чутливість до цього гербіциду проводилось при вкоріненні пагонів на селективному середовищі. Було встановлено, що при застосуванні 2,5 мг/л фосфінотрицину при вкоріненні нетрансгенних пагонів спостерігали значне зниження темпів росту та вкорінення лише 10% рослин на безгормональному середовищі. При збільшенні концентрації фосфінотрицину до 5 мг/л нетрансгенні пагони *N. africana* взагалі не вкорінювались та гинули на селективному середовищі. Оскільки селекція на фосфінотрицині проводилась для сформованих трансгенних рослин, для створення більш жорстких умов селекції для укорінення рослин ми використовували саме «критичну» концентрацію фосфінотрицину - 5 мг/л. В подальшому виявлені концентрації селективних агентів ми використовували для відбору трансгенних тканин після генетичної трансформації *N. africana*.

3.1.3. Отримання та дослідження трансгенних рослин *N. africana*, які містять *lox* сайти рекомбінації

В результаті експериментів з агробактеріальної трансформації рослин *N. africana* векторами pICH3744, pICH3737 були отримані рослини, які вкорінювались на безгормональному середовищі MS, доповненому 50 мг/л канаміцину. Для доведення трансгенної природи отриманих канаміцинстійких рослин *N. africana* проводили ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до послідовностей генів *nptII* (kan51/fw та kan51/rv) та *bar* (bar37/fw

та *bar37/rv*) (див. табл. 2.3). Аналіз підтвердив наявність *bar* та *nptII* гену в геномах рослин (рис. 3.3), стійких до канаміцину.

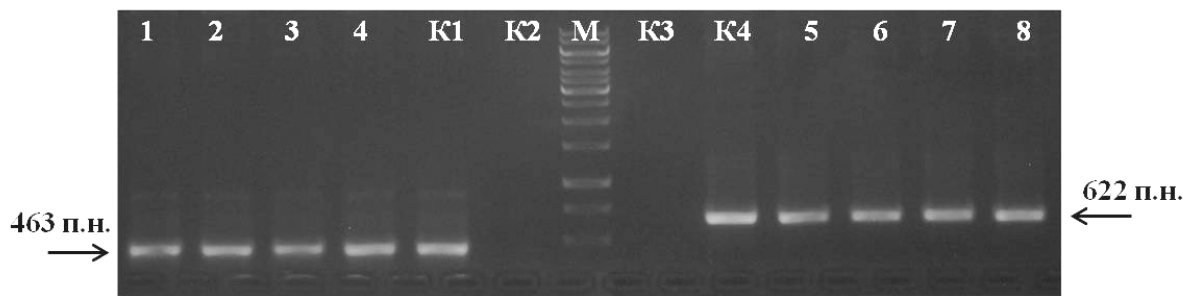


Рис. 3.3. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу тотальної ДНК рослин *N. africana*, стійких до канаміцину, з використанням праймерів до *bar* та *nptII* генів:

М - ДНК маркер, O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); K1 – позитивний контроль, вектор pICH3737 з праймерами до *bar* гену; K2 - негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини *N. africana*, з праймерами до *bar* гену; 1-4 - ДНК клонів *N. africana*, стійких до канаміцину з праймерами до *bar* гену; K3 - негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини *N. africana* з праймерами до *nptII* гену; K4 - позитивний контроль, вектор pICH3737 з праймерами до *nptII* гену; 5-8 - ДНК клонів *N. africana*, стійких до канаміцину з праймерами до *nptII* гену.

В результаті проведених експериментів з агробактеріальної трансформації рослин *N. africana*, векторами pICH3737 та pICH3744 на селективному середовищі з канаміцином (50 мг/л), було відібрано декілька десятків рослин, які були протестовані на середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину. Виявилось, що більшість трансгенних рослин (приблизно 80%) проявляють ознаку стійкості до гербіциду в умовах *in vitro* – вкорінюються на селективному середовищі (рис.3.4-а).

Отримані трансгенні рослини були висаджені в ґрунт в умовах теплиці, де вони вирощувались при температурі 25°C та 16-годинному освітленні. Рослини, що адаптувалися до росту в ґрунті, були оброблені розчином гербіциду Basta в концентрації 2,5 мл/л. Проведений тест показав, що отримані трансгенні рослини *N. africana* є стійкими до гербіциду і в умовах теплиці (рис. 3.4-б,в). Насіння отриманих трансгенних ліній *N. africana* було поверхнево простерилізоване та висаджене на живильне середовище MS для проростання. Проростки були перенесені на селективне живильне середовище MS, що містить 5 мг/л фосфінотрицину, для визначення чутливості нащадків трансгенних рослин до гербіциду. Ми вивчали успадкування ознаки стійкості

до гербіциду у трансгенних рослин *N. africana*. У однієї з досліджених ліній всі проростки залишились зеленими та продовжували рости на селективному середовищі (рис. 3.4-а). У двох інших ліній приблизно $\frac{3}{4}$ проростків були стійкими до гербіциду, а чверть проростків біліли, зупинялись у рості і з часом гинули (рис. 3.4-є, показано стрілками). Отже, в наступному поколінні трансгенних рослин *N. africana* за ознакою стійкості до фосфінотрицину ми спостерігали розщеплення у співвідношенні 3:1.

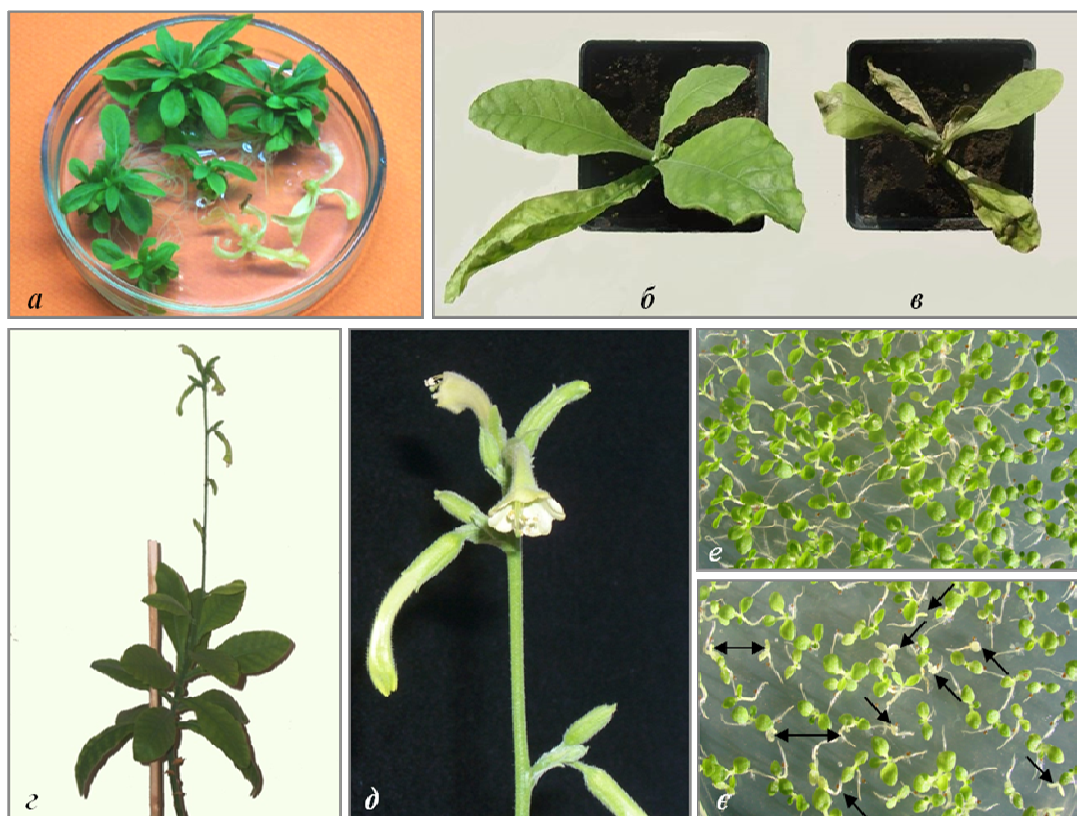


Рис. 3.4. Виявлення стійкості трансгенних рослин *N. africana* до фосфінотрицину: а - вкорінення трансгенних рослин *N. africana*/pICH3737 на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину; б-в – результати обробки рослин розчином гербіциду Basta в концентрації 2,5 мл/л в умовах теплиці: б – трансгенна рослина *N. africana*, трансформована *A. tumefaciens* (вектор pICH3737), в - контрольна рослина дикого типу; з-д – квітуєча трансгенна рослина *N. africana* в умовах теплиці; е-є – Т1 проростки *N. africana* на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину: е – проростки трансгенної лінії *N. africana*/pICH3737/18 стійкі до фосфінотрицину, є – проростки трансгенної лінії *N. africana*/pICH3737/10, в яких за ознакою стійкості до гербіциду спостерігали розщеплення у співвідношенні 3:1; стрілки вказують на проростки, що побіліли та перестали рости на селективному середовищі.

Генетичні конструкції pICH3737 та pICH3744 містять безпромоторний *bar* ген (рис. 2.1), тому стійкість отриманих трансгенних рослин до гербіциду

була неочікуваною. Оскільки безпромоторний *bar* ген знаходився біля правого бордеру у векторі (RB), то конструкції, які були використані в наших експериментах, мали будову, подібну до таких, що використовуються для промотор трепінгу (так звані промотор-виявляючі вектори). Як вже згадувалось (розділ 1 п. п. 1.1.2.8), в таких векторах безпромоторний маркерний ген знаходиться біля правого бордеру, а експресія відбувається внаслідок випадкового транскрипційного злиття цього гену з промотором в рослинному геномі [127-139]. Значення частоти транскрипційного злиття, що доповідається в роботах різних авторів, суттєво відрізняється. В роботі Koncz et al. [128] в рослинах *Arabidopsis thaliana* та *N. tabacum* експресію репортерного гену *aph* (3)II спостерігали у 25% трансформантів. Були опубліковані результати трансформації рослин різних видів вектором, що містить біля правого бордеру ген β -глюкуронідази без промотору [133]. Частота трансформованих рослин, у яких спостерігалась експресія *gus* гену в листках рослин, складала 22% для тютюну, 28% для арабідопсису та 23 % для картоплі. При цьому слід зазначити, що такі високі показники виникли завдяки тому, що були враховані всі рослини, в яких на певному етапі спостерігалась, навіть дуже слабка, експресія гену β -глюкуронідази в якійсь частині рослини. В роботах, метою яких був пошук послідовності, що забезпечує стабільну конститутивну експресію, частота транскрипційного злиття була значно меншою.

Так Foster et al. [137] доповідали, що лише одна з тисячі трансгенних рослин тютюну демонструвала конститутивну експресію такого ж рівня, що забезпечує 35S промотор, при розміщенні гену *gus* біля правого бордеру у промотор-виявляючому векторі, що складає 0,1%. В роботі з трансформантами рису в аналогічних умовах експресію спостерігали у 4,8% трансгенних рослин [248]. Були також опубліковані результати, згідно з якими експресія безпромоторного *luc* гена спостерігалась у 3,7% трансгенних рослин [249]. В наших експериментах більш ніж 80% трансгенних рослин виявились стійкими до фосфінотрицину. Ми припускаємо, що в цих трансгенних рослинах відбувається стабільна експресія *bar* гену. Активність фосфінотрицину

базується на блокуванні фермента глютамінсинтетази, наслідком чого є численні порушення метаболізму рослини: пригнічення фотосинтезу та біосинтезу білків, накопичення аміаку [250, 251]. Тому лише стабільна експресія *bar* гену, продуктом якого є фосфінотрицин ацетил трансфераза - фермент, що нейтралізує фосфінотрицин - здатна забезпечити ріст та вкорінення трансгенних рослин на селективному середовищі. Отримані трансгенні рослини *N. africana* є стійкими до селективної концентрації фосфінотрицину в культурі *in vitro* та при перенесенні в ґрунт. Також ця ознака успадковується нащадками (T1) цих рослин, що підтверджує стабільність та високий рівень експресії. Крім того, паралельно з нашими експериментами були отримані результати ще декількох незалежних досліджень співробітників відділу генетичної інженерії ІКБГІ, в яких, в результаті трансформації інших видів рослин генетичними конструкціями pICH3737 та pICH3744, що містять безпромоторний *bar* ген, були отримані рослини стійкі до фосфінотрицину. Так, в роботі Сахно Л. А., при використанні вищезгаданих векторів, були отримані трансгенні рослини ріпаку, стійкі до гербіциду [252]. Також, були отримані стійкі до фосфінотрицину рослини цукрового буряку, картоплі [160] та орігофрагмусу. Ці результати підтвердили високу частоту виникнення стійких до гербіциду трансгенних рослин та стабільність експресії *bar* гену.

Ми припустили можливий вплив *lox* сайту, розміщеного між *bar* геном та правим бордером, на експресію *bar* гену в трансгенних рослинах, оскільки наявність *lox* сайту є відмінністю, що відрізняє вектори pICH3737 та pICH3744 від типових промотор-виявляючих векторів. Вплив *lox*-сайту на експресію *bar* гену, перш за все, підтверджується тим фактом, що частота виникнення фосфінотрицин-стійких рослин є дуже високою. Тому, на наш погляд, експресія *bar* гену в цих рослинах не може бути результатом випадкового транскрипційного злиття структурної частини гену *bar* з регуляторною послідовністю в геномі трансгенної рослини.

Для підтвердження нашого припущення про наявність впливу *lox* сайту на експресію *bar* гену був визначений контрольний вектор для трансформації

рослин - pICH3831, в якому *bar* ген розміщений біля правого бордеру, але без *lox* сайту. В трансгенних рослинах, що отримані при трансформації рослин вектором pICH3831, експресія *bar* гену можлива лише як результат транскрипційного злиття кодуєчої послідовності *bar* гену з регуляторною послідовністю в геномі. Порівняння результатів трансформації цим вектором та векторами pICH3737 і pICH3744 дає змогу оцінити частоту виникнення стійких до фосфіотрицин рослин при наявності *lox* сайту біля правого бордеру та без нього.

Крім того, були створені вектори в яких, для запобігання проходження через *bar* ген РНК полімерази при випадковому транскрипційному злитті трансгена та промотора генома рослини, додано термінатор між правим бордером та *lox* сайтом.

Отримавши цікавий практичний результат і при цьому не маючи однозначного пояснення для *lox*-опосередкованої експресії *bar* гену, ми проводили дослідження в декількох напрямках з метою з'ясувати умови, при яких відбувається ця експресія. Так, ми вирішили дослідити «ефект положення» послідовності *lox-bar* у векторі, а саме, як вплине розміщення цього «тандему» в середині конструкції та біля лівого бордеру. Крім того, одним з наших завдань було перевірити можливість використання таких векторів для експресії інших генів. На основі векторів, при використанні яких відбувається *lox*-опосередкована експресія *bar* гену, були створені конструкції, де сайт рекомбінації *lox* розміщений замість промоторної послідовності гену *gus*. Як відомо, ген *gus* кодує фермент β-глюкуронідазу і є зручним маркерним геном, що широко застосовується в векторах для генетичної трансформації рослин [101]. Саме цей ген використовують найчастіше для оцінки ефективності та специфічності нових промоторних послідовностей, оскільки, з одного боку, він дозволяє завдяки простій гістохімічній реакції оцінити наявність експресії трансгену в тканинах рослини (з'являється синє забарвлення), а з іншого, використовуючи метод спектрофлуориметрії, провести кількісну оцінку ефективності експресії [105, 108, 109, 110, 253, 254].

3.2. Отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* з векторами, що містять послідовність *-lox-bar-*

В нашій подальшій роботі були проведені експерименти з генетичної трансформації рослин *N. africana* векторами, що містять термінатор між правим бордером та послідовністю *-lox-bar-* (вектори pICH9393 та pICH9414), векторами, що містять послідовність *-lox-bar-* в середині вектору (вектори pICH91567 та pICH9702), та контрольним вектором pICH3831, який містить *bar* ген без промотору біля правого бордеру, але не містить *lox* сайтів (рис. 2.1). Також всі ці вектори були використані в експериментах з генетичної трансформації тютюну. Трансформацію тютюну проводили згідно протоколу, який описано в пункті 2.6.2. Через 2-3 місяці селекції на живильному середовищі MSR, яке містило 100 мг/л канаміцину и 500 мг/л цефотаксиму, численні пагони формувались по краях листових дисків. Отримані рослини укорінювали на безгормональному селективному середовищі, яке містило 100 мг/л канаміцину. Трансгенна природа рослин, що вкорінилися на канаміцині, була підтверджена за допомогою ПЛР з праймерами, специфічними для *nptII* та *bar* генів. Стійкі до канаміцину трансгенні рослини тютюну були перевірені на стійкість до гербіциду фосфінотрицину в умовах *in vitro*. Для цього проводили вкорінення пагонів на безгормональному селективному середовищі, що містило 5 мг/л фосфінотрицину. Узагальнений результат проведених експериментів з рослинами *N. africana* та *N. tabacum* представлено на рисунку 3.5.

При використанні в експериментах з трансформації конструкцій, що містять *lox*-сайт біля правого бордеру, кількість рослин, в яких відбувалась експресія безпромоторного *bar* гену, склала від 71,8 до 88,4% від загальної кількості трансформантів. При використанні плазмиди pICH3831, яка також містить безпромоторний *bar* ген біля правого бордеру, але не містить *lox*-сайту, в експериментах була отримана лише одна стійка рослина.

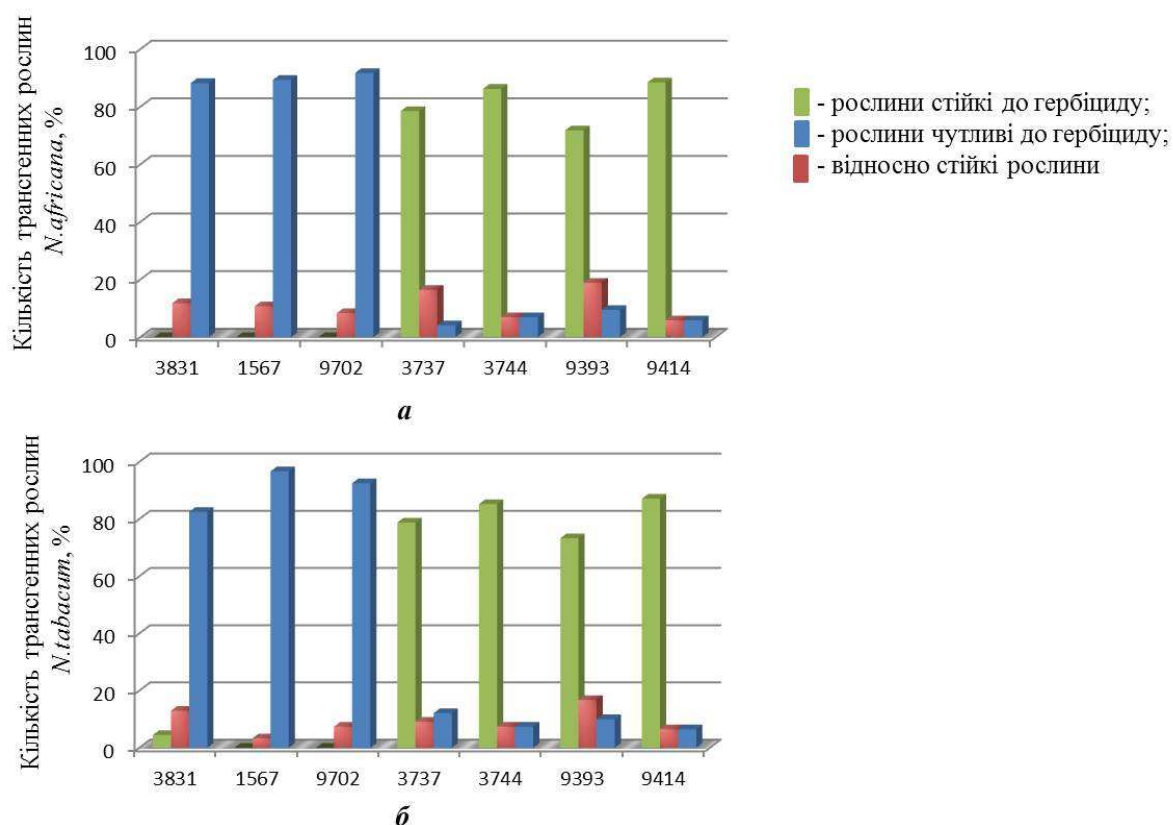


Рис. 3.5. Порівняння кількості стійких та чутливих до фосфінотрицину трансгенних рослин *N. africana* та *N. tabacum* після трансформації векторами, що містять послідовність - *lox* – *bar*:

по осі X – вектори, що використовувались для трансформації, по осі Y – кількість трансгенних рослин *N. africana* (а) та *N. tabacum* (б) у відсотках.

Деякі рослини складно було однозначно віднести до стійких або нестійких, оскільки вони зберігали зелене забарвлення листків, але росли дуже повільно та не вкорінювались на селективному середовищі. Такі трансформанти ми відносили до відносно стійких, а їх кількість складала приблизно 5% від загальної кількості трансформантів в експерименті.

Порівнюючи кількість фосфінотрицин-стійких рослин в кожному експерименті, можна зробити висновок, що *nos* термінатор, розміщений перед *lox*-сайтом в конструкціях pICH9393 та pICH9414, не мав негативного впливу на *lox*-опосередковану експресію *bar* гену в трансгенних рослинах. Кількість стійких рослин в експериментах з цими плазмідами була навіть більшою, ніж в експериментах з плазмідами pICH3737 та pICH3744. Також відмінність цих векторів полягає в тому, що вони містять *lox* сайт дикого типу – *loxP*, тоді як

конструкції pICH3737 та pICH3744 містять мутований сайт *loxA*. Однак, при порівнянні результатів цих експериментів статистичними методами (розділ 2.10), було показано, що на 5%-вому рівні значимості різниця між числом стійких до фосфінотрицину рослин, трансформованих плазмідами pICH3737 та pICH9393, а також pICH3744 та pICH9414, не є статистично достовірною. В той же час кількість стійких до фосфінотрицину рослин була більшою при використанні для трансформації плазмід, що містять додатковий *loxA* (*loxP*) сайт, розташований у прямій орієнтації відносно *loxA* (*loxP*) сайту, розміщеного біля правого бордеру, і тому створені більш сприятливі умови для проходження рекомбінації. Але різниця в кількості стійких до фосфінотрицину рослин при використанні цих векторів також не є статистично достовірною.

Очевидною є різниця при використанні плазмід, які містили послідовність *-lox-bar-* (pICH1567 та pICH9702), при порівнянні їх з будь-якою іншою з конструкцій, що відповідають схемі RB-*lox-bar* -. При трансформації рослин *N. africana* та *N. tabacum* плазмідами pICH1567 та pICH9702, що містять *lox* сайт та безпромоторний *bar* ген в середині конструкції, стійких до фосфінотрицину рослин отримано не було. Для вектору pICH3831, що не містить *lox* сайтів, була отримана одна стійка до фосфінотрицину рослина тютюну.

Узагальнюючи отримані дані можна зробити два основні висновки:

- результати досліджень *lox*-опосередкованої експресії *bar* гену для видів *N. africana* та *N. tabacum* не мають статистично достовірних відмінностей;
- експресія *bar* гену, що розпізнавалась завдяки виникненню у трансгенних рослин ознаки стійкості до фосфінотрицину, спостерігалась лише для векторів, у яких біля сайту ініціації транскрипції *bar* гену був розміщений *lox* сайт (*-lox-bar-*), та лише у тих випадках, коли послідовність *-lox-bar-* знаходилась біля правого бордеру (RB-*lox-bar-*).

Для подальшої роботи було вирішено використовувати рослини тютюну, оскільки *N. tabacum* є зручним модельним об'єктом, що дозволяє протягом 2-3 місяців отримати трансгенні рослини, тоді як експерименти з *N. africana*

потребують 5-6 місяців. Узагальнені результати повторних експериментів з генетичної трансформації *N. tabacum* за допомогою *A. tumefaciens* векторами, що містять послідовність *-lox-bar-*, представлені на рисунку 3.6.

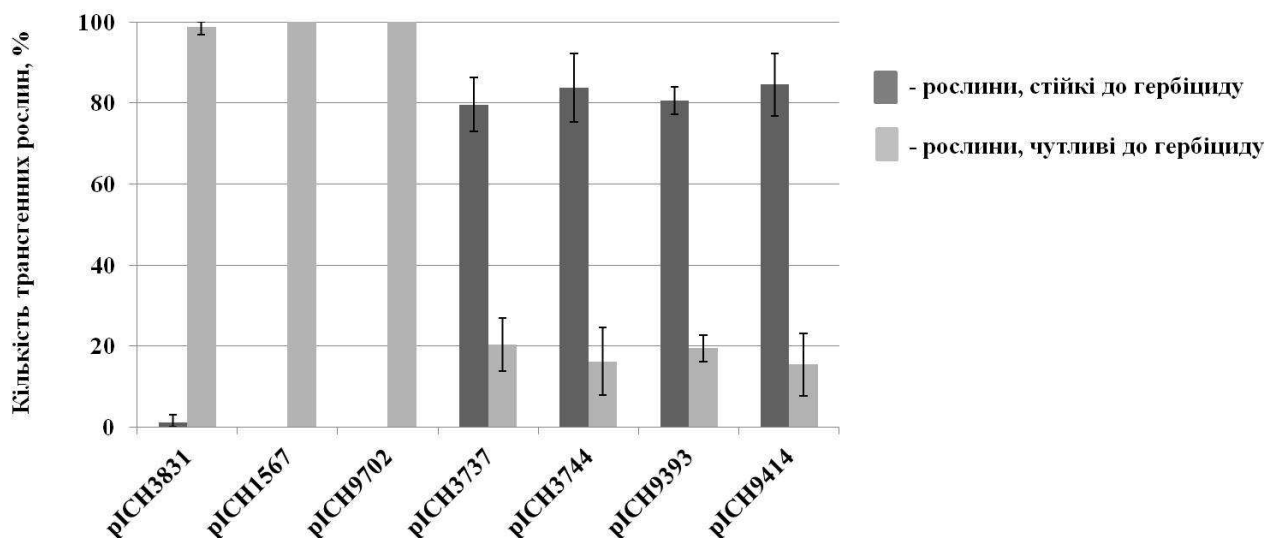


Рис. 3.6. Порівняння кількості стійких та чутливих до фосфінотрицину трансгенних рослин *N. tabacum* після трансформації векторами, що містять послідовність *-lox-bar-*:

по осі X – вектори, що використовувались для трансформації, по осі Y – кількість трансгенних рослин *N. tabacum* у відсотках. Представлені дані відображають середні значення згідно результатів трьох незалежних експериментів з трансформації. Риски на діаграмах відповідають довірчим інтервалам (рівень вірогідності 0,95).

За результатами цієї серії експериментів було підтверджено, що при трансформації рослин векторами, в яких *lox* сайт розміщений безпосередньо біля правого бордеру та перед структурною послідовністю *bar* гену (RB-*lox-bar-*), відбувалась експресія *bar* гену, яка розпізнавалась завдяки виникненню у трансгенних рослин ознаки стійкості до фосфінотрицину. Частота виникнення стійких рослин є дуже високою, і при умові відбору рослин на іншому селективному агенті (канаміцині), сягала 85%.

Як вже обговорювалось вище, виникнення такого високого відсотку рослин, в яких проходить експресія *bar* гену не може пояснюватись транскрипційним злиттям з випадковим промотором в геномі рослини. Додатково це було підтверджено результатами трансформації типовим за своєю будовою промотор-виявляючим вектором - pICH3831, який в наших

експериментах був використаний як контроль. У двох повторних експериментах з генетичної трансформації тютюну вектором pICH3831 жодної рослини, стійкої до фосфінотрицину, отримано не було (рис. 3.7.).

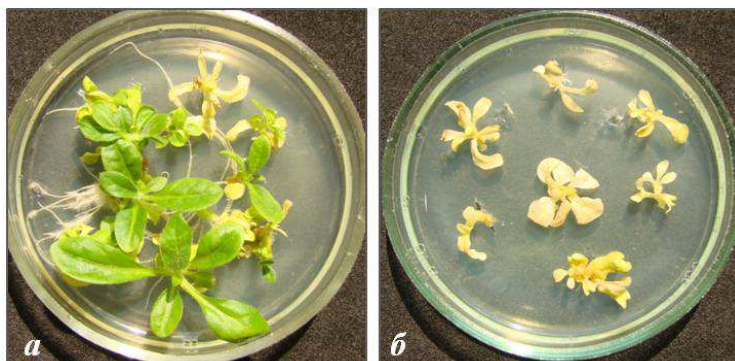


Рис. 3.7. Вкорінення рослин *N. tabacum* на безгормональному селективному середовищі, яке містить фосфінотрицин (5 мг/л), після *A. tumefaciens*-опосередкованої трансформації векторами pICH3737 (а) та pICH3831 (б).

Можливість *lox*-опосередкованої експресії перенесеного *bar* гену була виявлена, коли для генетичної трансформації рослин *N. africana* були використані вектори, що містять *lox*-сайт та *bar* ген без промотору біля правого бордеру Т-ДНК, а також ген *nptII* під контролем *nos* промотору. У більшості трансгенних рослин (80%) відбувалась експресія *bar* гену, що підтверджувалось стійкістю рослин до гербіциду як в умовах *in vitro*, так і в умовах теплиці. Такі ж результати були отримані і при трансформації цими векторами рослин *N. tabacum*. Експериментально доведено, що розміщення термінатору між правим бордером та *lox* сайтом не впливає на експресію *bar* гену, тоді як при розміщенні послідовності -*lox*- *bar*- в середині вектору - *lox*-опосередкована експресія не відбувається.

3.2.1. Молекулярно-біологічний аналіз рослин, що регенерували на селективному середовищі

Для доведення трансгенної природи отриманих канаміцинстійких рослин тютюну проводили ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до послідовностей генів *nptII* (kan51/fw та kan51/rv) та *bar* (bar37/fw та bar37/rv)

(див. табл. 2.3). З рисунку 3.8. видно, що в результаті ампліфікації утворюються фрагменти ДНК очікуваного розміру: 622 п.н. для гену *nptII* та 463 п. н. для гену *bar*.

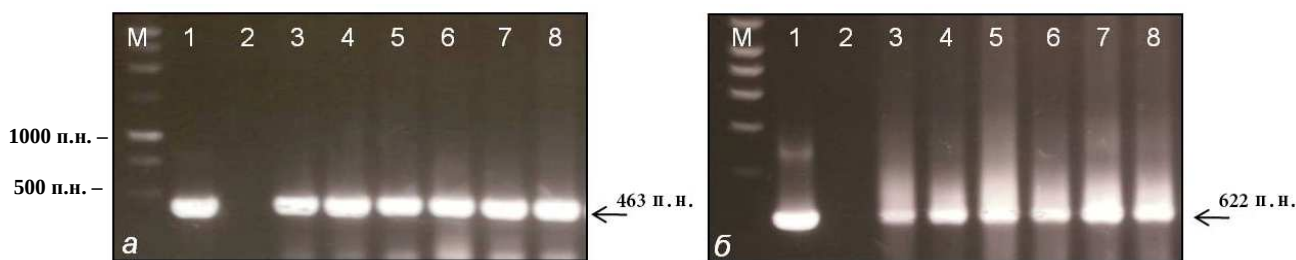


Рис. 3.8. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу тотальної ДНК рослин тютюну, стійких до канаміцину, з використанням праймерів до *bar* та *nptII* генів:

М - ДНК маркер, O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); 1 – позитивний контроль, плазмідна ДНК вектор pICH3737; 2 - негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини тютюну; 3-8 - ДНК рослин-регенерантів тютюну, стійких до канаміцину, з праймерами до *bar* (а) та *nptII* (б) генів.

Результат трансформації векторами pICH9393 та pICH9414, в яких, для запобігання проходження через *bar* ген РНК полімерази при випадковому транскрипційному злитті трансгена та промотора генома рослини, додано термінатор між правим бордером та *lox* сайтом, виявився для нас несподіваним. Отримані результати переконливо свідчать, що розміщення термінатору між правим бордером та *lox* сайтом (рис. 2.1) не впливає на експресію *bar* гену.

Припускаючи теоретичну можливість «втрати» термінатору в процесі інтеграції Т-ДНК, оскільки термінатор межує безпосередньо з правим бордером, ми проводили додатковий ПЛР аналіз з використанням форвардного праймеру до *nos* термінатора та реверсного праймеру до *bar* гену (*noster/fw* та *bar37/gv*, див. табл. 2.3) для того, щоб переконатись, що в геномі трансгенних рослин, стійких до фосфінотрицин, перед *bar* геном зберігається послідовність *nos* термінатора. В результаті ампліфікації був отриманий фрагмент ДНК очікуваного розміру, що підтверджує незмінність розміщення *nos* термінатору по відношенню до *bar* гену в геномі трансгенних рослин (рис. 3.9, доріжки 1-6) порівняно з його розміщенням у векторі pICH9414 (рис. 3.9, доріжка K+).

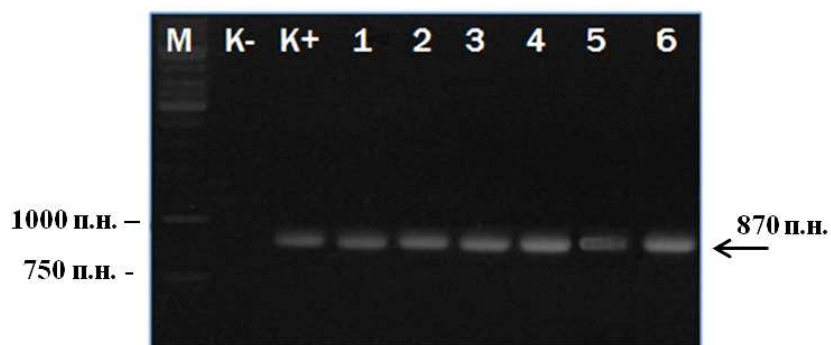


Рис. 3.9. Електрофореграма результатів ПЛР тотальної ДНК трансгенних рослин тютюну (вектори pICH9393 та pICH9414) з використанням праймерів до пос термінатору (форвардний) та *bar* гену (реверсний):

М - ДНК маркер, O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); К- - негативний контроль, ДНК рослини дикого типу; К + - позитивний контроль, плазмідна ДНК вектор pICH9393; 1-6 – ДНК трансгенних рослин тютюну, трансформованих векторами pICH9393 (1-3) та pICH9414 (4-6).

Отриманий результат, додатково підтверджує, що *lox*-опосередкована експресія *bar* гену не може бути результатом випадкового транскрипційного злиття, оскільки РНК полімераза II, що була ініційована найближчим промотором, мала б від'єднатися, дійшовши до послідовності термінатора. Ці міркування все більше створювали підґрунтя для припущень, що *lox* сайт, оскільки це АТ-багата послідовність ДНК, спрацьовує як регуляторна послідовність, створюючи умови для ініціації транскрипції та зв'язування РНК полімерази II [42, 43, 44, 45]. Але навіть теоретично, такий «мінімальний промотор» забезпечував би лише базовий рівень експресії *bar* гену, якого, на нашу думку, було б недостатньо для формування стабільної ознаки стійкості до фосфіотрицину.

Для доведення експресії *bar* гену на рівні транскрипції в трансформованих рослинах проводили полімеразну ланцюгову реакцію, поєднану зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Як позитивний контроль використовували трансгенні рослини тютюну, трансформовані вектором pICBV19, який містить ген *bar* під контролем *nos* промотору (рис. 2.3).

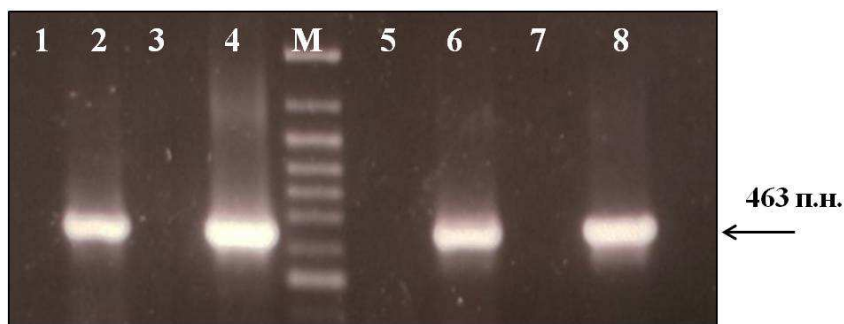


Рис. 3.10. Електрофореграма результатів ПЛР кДНК, синтезованої за допомогою реверсивної транскриптази з РНК трансгенних рослин тютюну, з праймерами до *bar* гену (*bar37/fw* та *bar37/rv*):

1 - негативний контроль з кДНК, синтезованої з РНК нетрансгенної рослини; 4 - позитивний контроль з кДНК, синтезованої з РНК рослини, трансформованої плазмідною рICBV19; 2, 6, 8 – кДНК, синтезована з РНК рослин, трансформованих плазмідною рICN3737; 3, 5, 7 - контроль: ті самі проби, але без використання реверсивної транскриптази; М - ДНК маркер, 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL).

Сумарну РНК виділяли з листків трансгенних рослин та обробляли дезоксирибонуклеазою I, вільною від рибонуклеаз. Щоб переконатися у відсутності домішок ДНК в препаратах РНК, проводили ПЛР аналіз з використанням відповідних праймерів, специфічних до гену *bar* (*bar37/fw* та *bar37/rv*, див. табл. 2.3). Відсутність сигналу на доріжках 3, 5 та 7 вказує на чистоту РНК-препаратів (рис. 3.10).

Виділену РНК трансгенних рослин тютюну використовували для синтезу кДНК. Таким чином, за допомогою ЗТ-ПЛР аналізу було підтверджено, що в стійких до фосфінотрицину рослинах *N. tabacum*, трансформованих вектором рICN3737, відбувається транскрипція *bar* гену (рис. 3.10, доріжки 2, 6 та 8).

3.2.2. Експерименти з векторами, що містять *bar* ген між *lox* сайтами в середині конструкції

Результати агробактеріальної трансформації тютюну та *N. africana* векторами рICN1567 та рICN9702, в яких послідовність *-lox-bar-* розміщена в середині конструкції, переконливо свідчать, що *lox* сайт не може функціонувати як самостійна регуляторна послідовність. В експериментах з цими векторами не було знайдено жодної трансгенної рослини, стійкої до фосфінотрицину. Такий

результат було отримано при стандартній схемі наших експериментів, коли селекція трансгенних рослин проходила на канаміцині, а рослини, відібрані таким чином, надалі тестувалися на стійкість до фосфінотрицину. Також ми провели декілька експериментів з агробактеріальної трансформації рослин цими векторами, в яких після спільного культивування з *A. tumefaciens* селекцію трансгенних рослин проводили безпосередньо на селективному середовищі, що містить фосфінотрицин. За нашими розрахунками при безпосередній селекції ми змогли б відібрати стійкі трансгенні рослини, навіть якщо вони виникають з дуже малою частотою. Але в експериментах з генетичної трансформації векторами pICH1567, pICH9702 рослини, стійкі до фосфінотрицину при безпосередній селекції також не виникали, експланти гинули на селективному середовищі (рис.3.11-б).

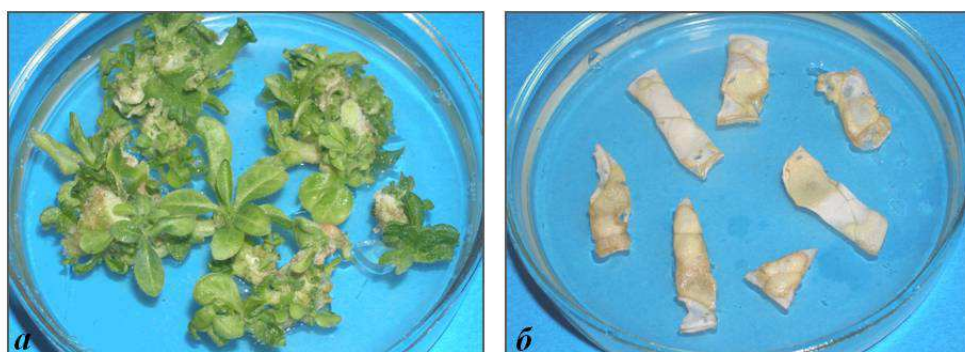


Рис 3.11. Регенерація рослин *N. tabacum* на селективному середовищі (5 мг/л фосфінотрицину) через 2 місяці після трансформації *A. tumefaciens*, що містила вектори pICH3737 (а) та pICH9702 (б).

Як контроль в цьому експерименті ми використовували вектор pICH3737, в якому *lox* сайт розміщений безпосередньо біля правого бордеру перед структурною частиною *bar* гену (RB-*lox*-*bar*). При трансформації тютюну вектором pICH3737 пряма селекція була цілком успішною (рис.3.11 -а) та в результаті були відібрані стійкі до фосфінотрицину трансгенні рослини.

Вектори pICH1567 та pICH9702 були люб'язно надані компанією Icon Genetics. Вони були секвеновані, і ми мали змогу переконатись, що послідовність *bar* гену та рамка зчитування у цих векторах не порушені. Але той факт, що використання цих векторів для трансформації взагалі не

призводить до появи стійких до фосфінотрицину рослин, змусив нас додатково перевірити функціональність *bar* гену. В нас була така можливість завдяки тому, що вектори, на яких базувались ці дослідження, були створені для вивчення функціонування системи рекомбінації бактеріофага P1 у рослинному геномі. Дизайн векторів передбачав, що *bar* ген, обмежений у векторі *lox* сайтами, потрапляє під контроль промотору лише після проходження рекомбінації, і лише тоді стає можливою експресія цього гену, що і дозволяє відібрати трансгенні рослини, в яких пройшла рекомбінація, на селективному середовищі з фосфінотрицином. Для реалізації такої схеми передбачалось використання додаткових векторів, в яких сайти рекомбінації обмежують послідовність гену *cre*. Цей ген кодує фермент Cre-рекомбіназу, що забезпечує проходження рекомбінації між ділянками ДНК, які обмежені сайтами рекомбінації *lox* [186-191].

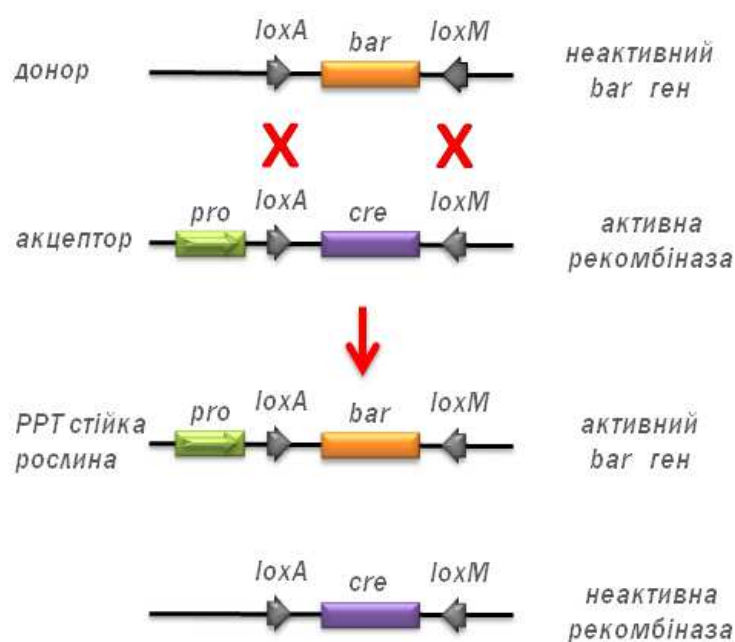


Рис. 3.12. Схема рекомбінації ділянок ДНК між *lox* сайтами, використана у робочих векторах:
pro – промотор, який забезпечує експресію гену рекомбінази *cre*.

Запропонована схема (рис. 3.12) передбачає, що один з векторів є *донором* (наприклад, pICH9702) - той, що містить *bar* ген без промотора, а

інший акцептором (pICH1754). В результаті рекомбінації за участі Cre-рекомбінази, *bar* ген потрапляє під контроль промотору гену *cre*, тоді як ген *cre* вбудовується замість *bar* гену та втрачає промотор, завдяки чому стає неможливою подальша рекомбінація. Як з'ясувалось, використання такої схеми експерименту для векторів, в яких послідовність *-lox-bar-* знаходиться біля правого бордеру, є неможливим, оскільки «незапланована» експресія *bar* гену виключає можливість проведення селекції на подію рекомбінації. Але можливість дослідження рекомбінації залишилась для рослин, трансформованих векторами, в яких послідовність *-lox-bar-* розміщена в середині конструктора. Як обговорювалось вище, такі рослини не були стійкими до фосфінотрицину, тому були використані для повторної трансформації вектором pICH1754, що містить ген *cre*, обмежений *lox* сайтами (див. рис. 2.2). Після проведення повторної трансформації регенерація та селекція рослин проводилась на середовищі, що містить фосфінотрицин (рис. 3.13).

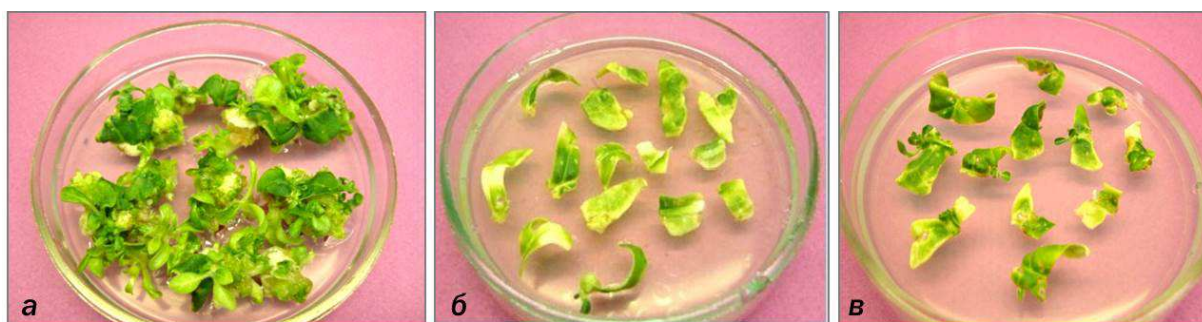


Рис 3.13. Регенерація рослин *N. tabacum* на селективному середовищі (5 мг/л фосфінотрицину) через 2 місяці:

а – після трансформації трансгенних рослин тютюну pICH9702 агробактерією, що містила вектор pICH1754; *б* - після трансформації рослин тютюну дикого типу агробактерією, що містила вектор pICH1754(контроль); *в* – експланти трансгенних рослин тютюну pICH9702 на регенераційному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину через 2 місяці (контроль).

Для даного експерименту були поставлені два контролі: експланти трансгенних рослин pICH9702 без трансформації вектором pICH1754, та експланти рослини тютюну дикого типу, протрансформовані агробактерією, яка містить вектор pICH1754. В результаті проведених експериментів, рослини стійкі до гербіциду, були отримані лише при проведенні подвійної

трансформації векторами pICH9702 та pICH1754. В жодному з контролів не відбувалась регенерація рослин на селективному середовищі, що містило 5 мг/л фосфінотрицину (рис. 3.13).

Аналізуючи отримані результати, ми припускаємо, що внаслідок перебування в одному геномі послідовностей Т-ДНК векторів pICH9702 та pICH1754 відбулась рекомбінація, в результаті якої *bar* ген потрапив під контроль промотору. Для підтвердження цієї події був проведений аналіз за допомогою ПЛР з використанням форвардного праймеру до актинового промотора та реверсного праймеру до *bar* гену (actpr/fw та bar37/rv, див. табл. 2.3) (рис. 3.14).



Рис. 3.14. Електорофореграма результатів ПЛР тотальної ДНК подвійних трансформантів тютюну (вектори pICH9702 та pICH1754) з використанням праймерів до актинового промотору (форвардний) та *bar* гену (реверсний):

М - ДНК маркер, O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); K1- негативний контроль, ДНК трансгенної рослини тютюну, трансформованої вектором pICH9702; K2 - негативний контроль, ДНК трансгенної рослини тютюну, трансформованої вектором pICH1754; 1-5 – ДНК подвійних трансформантів тютюну (вектори pICH9702 та pICH1754).

Ми переконались, що вектор pICH9702 має повноцінну структурну послідовність *bar* гену, яка, при наявності відповідних регуляторних елементів, забезпечує синтез фосфінотрицинацетилтрансферази і тим самим формує у трансгенної рослини нову ознаку – стійкість до фосфінотрицину.

Після трансформації тютюну агробактерією, яка містить вектор pICH1754, також була проведена і селекція на середовищі, яке містить 100 мг/л канаміцину, оскільки цей вектор містить ген *nptII*. Також цей вектор містить послідовність гену рекомбінази Cre/lox системи рекомбінації бактеріофагу P1

cre (див. рис. 2.2). В результаті проведених експериментів з трансформації були відібрані рослини, які вкорінились на середовищі, що містить 100 мг/л канаміцину. Трансгенна природа цих рослин була підтверджена аналізом за допомогою ПЛР з праймерами до *nptII* гену.

В результаті проведеного експерименту ми отримали додатковий доказ того, що при порівнянні векторів pICH3737, pICH3744 та pICH1567, pICH9702 відсутність експресії *bar* гену пояснюється тільки розміщенням послідовності *bar* гену в середині вектору. Отже, саме розміщення *lox* сайту та послідовності *bar* гену біля правого бордеру є вирішальним фактором для *lox*-опосередкованої експресії цього гену.

3.3. Пряма трансформація тютюну методом бомбардування частинками вольфраму

Експерименти з прямої трансформації рослин тютюну векторами, що містять *lox* сайти та безпромоторний *bar* ген, були проведені за такою ж схемою, як і експерименти з агробактеріальної трансформації: регенерація та селекція рослин на середовищі, що містить 100 мг/л канаміцину, та тестування отриманих рослин на стійкість до фосфінотрицину.

Після бомбардування листків тютюну частинками вольфраму з нанесеними на них ДНК плазмід (див. розділ 2.7.) експланти тютюну протягом тижня інкубували на регенераційному середовищі без селективного тиску, а надалі регенерація рослин відбувалась на середовищі, що містило 100 мг/л канаміцину. Приблизно через місяць інкубації на експлантах в місцях проникнення частинок формувалася калюс та відбувалась регенерація рослин (рис. 3.15-а, б). Сформовані рослини були перевірені на наявність в їх геномі *bar* та *nptII* генів за допомогою ПЛР з відповідними праймерами. Тестування на стійкість до гербіциду отриманих трансгенних рослин в умовах *in vitro* проводили, висаджуючи рослини на селективне середовище, що містило 5 мг/л фосфінотрицину (рис. 3.15 в).



Рис 3.15. Отримання трансгенних рослин тютюну методом бомбардування частинками вольфраму:

a , *б* - регенерація рослин *N. tabacum* на селективному середовищі (100 мг/л канаміцину) через 1 (*a*) та 2 (*б*) місяці після бомбардування листків тютюну частинками вольфраму з нанесеною на них плазмідною, *в* – тестування на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину, трансгенних рослин тютюну, отриманих методом прямої трансформації.

Дані, представлені в таблиці 3.2, свідчать, що, на відміну від агробактеріальної трансформації, абсолютна більшість трансгенних рослин, отриманих внаслідок бомбардування, не були стійкими до фосфінотрицину.

Таблиця 3.2

Результати тестування на селективному середовищі, яке містить 5 мг/л фосфінотрицину, трансгенних рослин, отриманих методом прямої трансформації плазмідами, що містять послідовність - *lox- bar-* .

Вектор	Кількість трансгенних рослин, отриманих в експериментах з прямої трансформації тютюну			
	загальна кількість	чутливі до фосфінотрицину	стійкі до фосфінотрицину	відносна стійкість
pICH3737	30	28	1	1
pICH3744	35	31	0	4
pICH9393	30	25	1	4
pICH9414	28	27	0	1
pICH3831	29	29	0	0
pICH1567	30	30	0	0
pICH9702	31	31	0	0

Лише дві рослини – одна з вектором pICH3737, а інша з вектором pICH9393 – сформували корені та розвивались на середовищі, що містило

5 мг/л фосфінотрицину. Але при цьому ще 10 рослин були виділені нами в категорію «відносно стійких». Такі рослини не гинули на селективному середовищі, залишались зеленими, але відрізнялись дуже уповільненим ростом, і тому важко було однозначно віднести їх до «стійких» або «чутливих».

Ми вважаємо, що виникнення трансгенних рослин тютюну, відносно стійких до фосфінотрицину, може бути результатом «замовчування генів». Як відомо, біолістична трансформація, або бомбардування частинками, використовується як альтернативний метод генетичної трансформації рослин, для яких агробактеріальна трансформація є малоефективною, наприклад, для злакових [255, 256]. Основним же недоліком методу біолістичної трансформації є те, що в результаті прямого перенесення генів шляхом бомбардування експлантів частинками з нанесеною на них плазмідною ДНК виникає більша кількість, порівняно з агробактеріальною трансформацією, множинних вставок та тандемних повторів [257, 258, 259]. Продубльовані таким чином перенесені ДНК послідовності можуть призводити як до значного зменшення експресії трансгенів, так і до повного їх «замовчування».

Але навіть враховуючи відносно стійкі трансгенні рослини, отримані в цьому експерименті, очевидним, на нашу думку, є той факт, що *lox*-опосередкована експресія залежить від методу трансформації і відбувається в трансгенних рослинах, отриманих методом агробактеріальної трансформації.

3.4. *Lox*-опосередкована експресія *bar* гену, при розміщенні *lox* сайту біля лівого бордеру

Одним з завдань даної роботи було дослідити можливість *lox*-опосередкованої експресії *bar* гену, при розміщенні *lox* сайту біля лівого бордеру. На базі вектору pICBV16 був створений вектор pCB164 (рис. 2.3). Ця конструкція містить також *gus* ген під контролем 35S промотору, але не містить додаткового селективного гену. В цьому експерименті ми також досліджували можливість використання безпромоторного *bar* гену та *lox* сайту біля лівого бордеру як селективного гену у векторі. При цьому експресія маркерного гену

β -глюкуронідази під контролем 35S промотору додатково підтверджуватиме трансгенну природу отриманих рослин.

Оскільки цей вектор не містить іншого селективного маркера, а має лише ген стійкості до фосфінотрицину, то була використана інша схема експерименту та, відповідно, інша система оцінки ефективності цього вектору. Після співкультивування експлантів листків тютюну з агробактеріальною суспензією, що містила вектор pCB164, регенерацію рослин проводили на селективному середовищі, доповненому 5 мг/л фосфінотрицину. Щоб порівняти ефективність цього вектору з такими, що мають загальну схему RB-*lox-bar*, ми використали плазмиду pICH3737 для експериментів за такою ж схемою в якості контролю. Приблизно через два місяці культивування на селективному середовищі підраховували кількість експлантів, на яких формувався каллус та утворювались пагони. Як видно з рис. 3.16, ефективність регенерації в таких умовах при трансформації конструкцією pCB164 була нижчою ніж для вектору pICH3737.

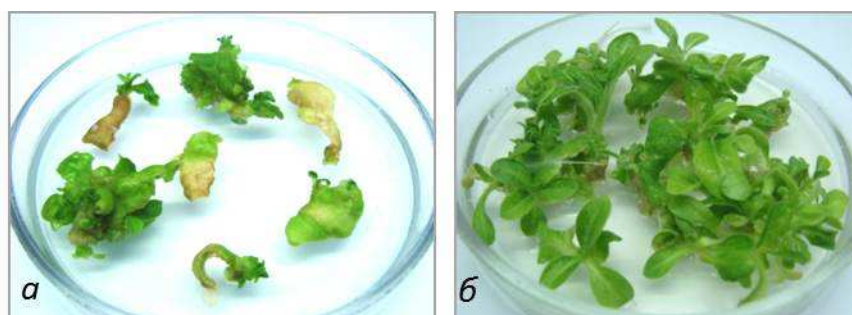


Рис. 3.16. Регенерація рослин тютюну на селективному середовищі, яке містить 5 мг/л фосфінотрицину через 2 місяці після трансформації конструкціями, що мають *lox* сайт поблизу від бордерів T-ДНК: а – після спільного культивування з агробактерією, що містить вектор pCB164; б - вектор pCB3737.

Але, незважаючи на нижчу ефективність, були отримані трансгенні рослини тютюну, а безпромоторний *bar* ген з *lox* сайтом замість промотору біля лівого бордеру були використані як селективний ген при відборі трансформантів. Трансгенна природа отриманих, стійких до фосфінотрицину рослин, була підтверджена аналізами за допомогою ПЛР з праймерами до *bar* гену (*bar36/fw* та *bar36/rv*) (див. табл. 2.3). З рисунку 3.17. видно, що в результаті ампліфікації утворюються фрагмент ДНК очікуваного розміру

409 п.н. (рис. 3.17-а). Для визначення експресії гена *gus*, який міститься в Т-ДНК вектору рСВ164, проводили гістохімічний аналіз трансгенних рослин. В отриманих трансгенних рослинах тютюну рСВ164, по результатам гістохімічного аналізу, була підтверджена експресія гену β -глюкуронідази (рис. 3.17-б).

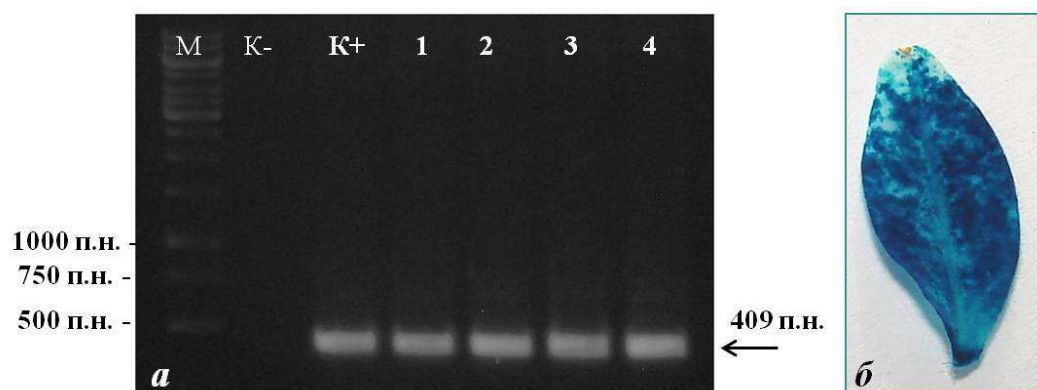


Рис. 3.17. Аналіз трансгенних рослин тютюну, що були протрансформовані вектором рСВ164:

а- електрофореграма результатів ПЛР аналізу тотальної ДНК рослин, з використанням праймерів до *bar* гену; К- – негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини *N. tabacum* з праймерами до *bar* гену; К+ - позитивний контроль, вектор рСВ164 з праймерами до *bar* гену; 1-4 - ДНК клонів *N. tabacum*, стійких до фосфінотрицину з праймерами до *bar* гену; б – результат гістохімічного аналізу активності β -глюкуронідази в листках трансгенних рослинах тютюну рСВ164.

За результатами проведених експериментів було підтверджено можливість *lox*-опосередкованої експресії *bar* гену, при його розміщенні біля лівого бордеру з *lox* сайтом замість промотора.

Наступний крок наших досліджень також був пов'язаний з прямою селекцією на середовищі з фосфінотрицином трансгенних рослин, в яких відбувається *lox*-опосередкована експресія *bar* гену. У векторі рСВ108, створеного на основі вектора рІСН3737, була делетована частина, що містить додатковий *lox* сайт, а також незалежний 35S промотор та *nptII* ген (див. п. 2.2, рис. 2.3). В результаті було отримано вектор, який містив лише *lox* сайт та кодуєчу послідовність *bar* гену, обмежену бордерами Т-ДНК. Оскільки послідовність *lox* сайту містить багато аденін-тимін пар основ [186, 191] (рис. 1.3), то цілком ймовірно, що ця послідовність може бути місцем зв'язування РНК полімерази II та функціонувати як мінімальний промотор (див. п. 1.1.1.1.)

[44-47]. Тому ми вирішили створити вектор, в якому *lox* сайт було замінено на випадкову АТ-багату послідовність та дослідити можливість експресії *bar* гену при використанні такого вектора для генетичної трансформації. У векторі pCB148 *lox* сайт було замінено на АТ-багату послідовність міжгенного спейсеру *petB-psbB* хлоропластної ДНК тютюну (див. п. 2.2, рис. 2.3). Таким чином ми отримали два подібні вектори, один з яких містив *lox* сайт перед безпромоторним *bar* геном, а інший - випадкову АТ багату послідовність. Ефективність регенерації для конструкції pCB108 була відчутно нижчою, ніж при використанні вектору pICH3737. Після трансформації експлантів тютюну агробактерією, що містить вектор pCB148, регенерація рослин на селективному середовищі не відбувалась взагалі. Узагальнені результати експериментів, в яких ми оцінювали ефективність регенерації на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину, після агробактеріальної трансформації векторами pCB164, pCB108 та pCB148 представлені на рисунку 3.18.

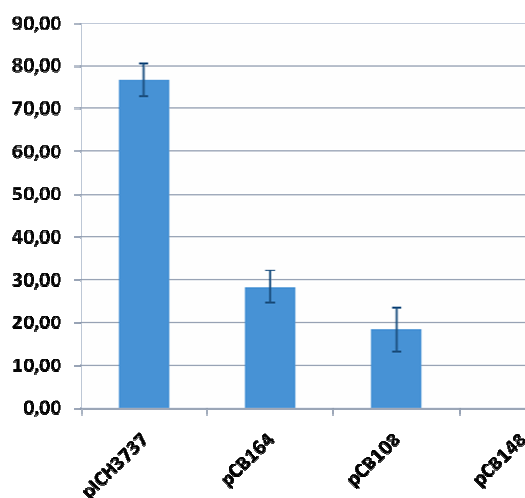


Рис. 3.18. Ефективність регенерації рослин тютюну на селективному середовищі, після трансформації конструкціями, що містять *lox* сайт поблизу бордерів Т-ДНК.

Ефективність регенерації оцінювали як співвідношення кількості експлантів, що дають зелені пагони на селективному середовищі, до загальної кількості експлантів в експерименті. Представлені дані відображають середнє значення, згідно результатів трьох експериментів та середню квадратичну похибку середнього значення.

Як видно з діаграми після трансформації вектором pCB164 регенерація відбувалась лише на 30% експлантів, тоді як для вектору pICH3737 цей показник склав біля 80%.

Значне зниження ефективності регенерації ми спостерігали і для вектору рСВ108. На наш погляд, той факт, що ця конструкція виявилась менш ефективною порівняно з рІСН3737, пов'язаний з тим, що вектор рІСН3737 містить повнорозмірний 35S промотор, який згідно з публікаціями [22-24] має енхансерну послідовність, що впливає на експресію генів, розміщених у тому ж векторі.

3.4.2. Дослідження *lox* опосередкованої транзійтної експресії *bar* гену

Для проведення експериментів з транзійтної експресії були використані рослини *N. benthamiana*, що вирощувались в умовах теплиці. Найбільш ефективною транзійтна експресія була в рослинах, що характеризуються швидким приростом біомаси, до початку цвітіння рослин. В наших умовах це були 3-4 тижневі рослини *N. benthamiana*, вирощені з насіння. Листки рослини були інфільтровані бактеріальною суспензією, що містила один з дослідних векторів, та вектор рІСН6692, який містить ген білку Р19 вірусу костистої карликовості томатів. Цей білок є супресором пост-транскрипційного та індукованого вірусами сайлесінгу генів в рослинах [232, 233] і використовується в інфільтраційній суспензії для запобігання «замовчування генів». Також невеликий фрагмент кожного з експериментальних листків був інфільтрований вектором рІСН5290, що містить маркерний ген зеленого флуоресцентного білку (*gfp*) [260]. Зручність використання гену *gfp* полягає в тому, що продукт його експресії - білок GFP (green fluorescent protein) має здатність до флюоресценції в зеленій області спектру (498 нм) при опроміненні ультрафіолетом (395 нм), завдяки чому є можливість детектувати наявність цього білку в нативній рослині [261, 262]. Таким чином, ми мали змогу переконатись, що в інфільтрованому листку відбувається транзійтна експресія (рис. 3.19-а). Інфільтровані листки (див. п. 2.10), в яких було зафіксовано накопичення білку GFP на четвертий день після інфільтрації, були оброблені розчином гербіциду Basta. Треба відмітити, що процедура інфільтрації є травматичною для листків і може спричинити відмирання листків через деякий

час після цієї процедури. Тому, як контроль в наших експериментах були використані листки, інфільтровані вектором pICBV16, який не містить гену *bar*. Як позитивний контроль був використаний вектор pICBV19, який містить ген *bar* під контролем 35S промотору. На рисунку 3.19 представлені результати обробки гербіцидом Basta листків рослин *N. benthamiana*, інфільтрованих векторами, що містять послідовність *lox-bar*, та контрольними векторами.

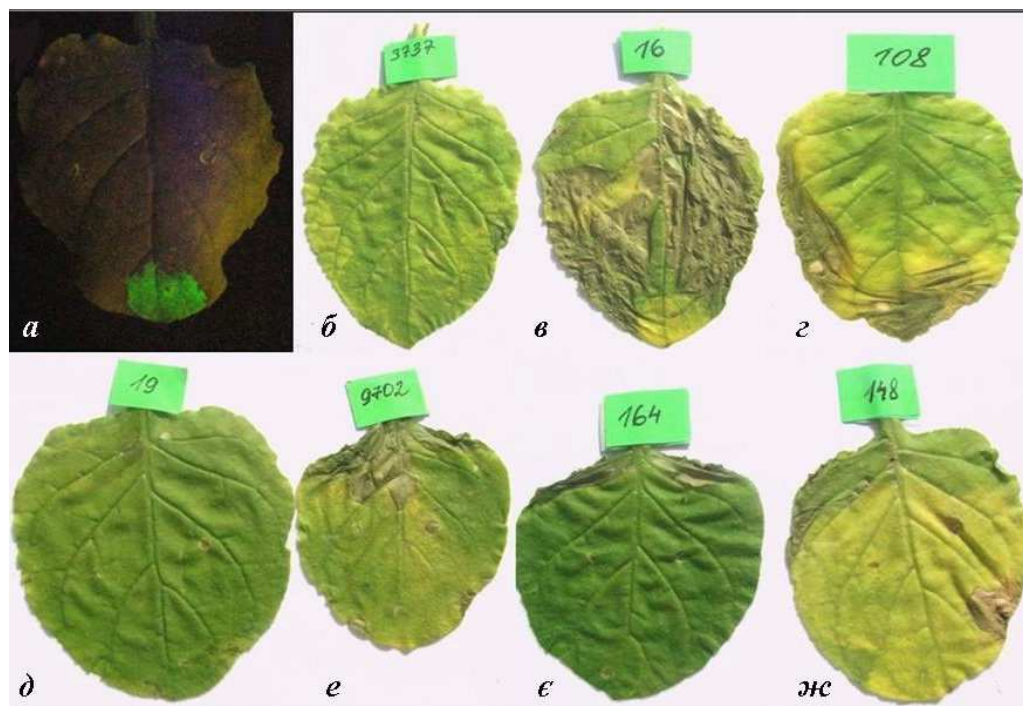


Рис. 3.19. Результати обробки гербіцидом Basta листків рослин *N. benthamiana*, інфільтрованих векторами, що містять послідовність *lox-bar*:

a – транзійтна експресія гену *gfp* (вектор pICN5290) при опроміненні листка ультрафіолетом; *б-ж* – результати обробки гербіцидом Basta (через тиждень після обробки) листків, інфільтрованих різними векторами: *б* – листок, інфільтрований вектором pICN3737; *в* – негативний контроль – листок, інфільтрований вектором pICBV16 (вектор не містить гену *bar*), *д* – позитивний контроль, інфільтрація вектором pICBV19 (вектор містить ген *bar* під контролем 35S промотору); *г, е, є, ж* – інфільтрація векторами pCB108, pICN9702, pCB164 та pCB148 відповідно.

Як видно на рисунку 3.19-в, після обробки розчином гербіциду Basta ми можемо спостерігати значне ураження зон інфільтрації в експерименті з контрольним вектором pICBV16, тоді як позитивний контроль, вектор pICBV19, залишився зеленим та майже не ураженим (рис. 3.19-д). Майже не ураженими залишились листки, інфільтровані векторами pICN3737 та pCB164

(рис. 3.19-б, є), що містять безпромоторний *bar* ген та *lox* сайт біля правого та лівого бордерів відповідно, тоді як листки, інфільтровані векторами pICH9702, pCB108, pCB148 (рис. 3.19-г, е, ж) пожовкли та значно втратили тургор (ця ознака не помітна на фотографіях).

Узагальнюючи результати експериментів з вивчення *lox*-опосередкованої транз'єнтної експресії *bar* гену можна констатувати, що в цілому ці результати збігаються з результатами стабільної трансформації. Стійкими до обробки гербіцидом Basta були зони інфільтрації листків векторами pICH3737 та pCB164, які при стабільній трансформації також забезпечували виникнення трансгенних рослин, стійких до фосфінотрицину.

3.6. Дослідження *lox*-опосередкованої експресії гену *gus*

Для оцінки ефективності та специфічності *lox*-опосередкованої експресії в трансгенних рослинах були використані вектори з маркерним геном *gus*, що кодує фермент β-глюкуронідазу, та послідовністю *lox* сайту замість промотору. Вектор pCB100, який був створений на основі конструкції pICH9393 (рис. 2.4), містив структурну послідовність *gus* гену без промотора, а також *lox* сайт та *nos* термінатор біля правого бордеру. Крім того, отриманий вектор не містив послідовності незалежного 35S промотору, яка присутня у векторі pCB9393 та інших векторах для яких було показано *lox*-опосередковану експресію *bar* гену. Як уже обговорювалось вище, можна припустити, що на експресію *bar* гену в цих векторах впливає незалежний 35S промотор, оскільки, згідно опублікованим даним, вже було продемонстровано вплив енансерів 35S промотору на експресію інших генів у векторі. Крім того, в нашій роботі при порівнянні векторів, що забезпечують *lox*-опосередковану експресію *bar* гену, найменш ефективним виявився вектор pCB108, що не містив послідовності незалежного 35S промотору (рис. 2.3). Враховуючи ці міркування, було створено вектор pCB221 (рис. 2.4), аналогічний вектору pCB100, що містив послідовність *gus* гену без промотора біля правого бордеру, але додатково містив послідовність 35S промотору в середині конструкції. 35S промотор у

векторі був розміщений таким чином, що ініційована ним РНК полімераза II не могла спричинити експресію гену *gus*, і єдиним можливим проявом цієї регуляторної послідовності у векторі міг бути вплив енхансерів 35S промотору. Крім того, в даному експерименті для порівняння було використано вектор pICBV16, в якому експресія *gus* гену відбувається під контролем 35S промотору.

3.6.1. Транзйєнтна *lox*-опосередкована експресія гену *gus*

На першому етапі цього експерименту ми проводили порівняння запропонованих регуляторних послідовностей в умовах транзйєнтної експресії. Для отримання транзйєнтної експресії гену *gus* проводили інфільтрацію листків *N. benthamiana* агробактеріальною суспензією, до складу якої входила агробактерія з одним з трьох векторів, що містив *gus* ген (pCB100, pICBV16 та pCB221), а також вектор pCB6692 (див. п. 2.10). Детекцію експресії гену *gus* проводили на четвертий день після інфільтрації. Для цього вирізали зони інфільтрації з листків *N. benthamiana*, проводили гістохімічний аналіз та візуальне порівняння інтенсивності синього забарвлення в кожному з варіантів.

Аналізуючи отримані дані, можна зробити висновок, що навіть при візуальному порівнянні інтенсивності синього забарвлення можна спостерігати відмінність між векторами pCB100, pICBV16 та pCB221 при транзйєнтній експресії (рис. 3.20-а). У порівнянні з контролем, вектором pICBV16, в якому *gus* ген знаходиться під контролем 35S промотору, транзйєнтна *lox*-опосередкована експресія *gus* гену при використанні вектора pCB100 є досить слабкою. Але у векторі pCB221, який, на відміну від вектора pCB100, містить в середині вектору послідовність 35S промотору, ми спостерігали значне збільшення експресії *gus* гену.

Для кількісної оцінки експресії гену *gus* за допомогою флуориметричного методу проводили виділення тотального білку з інфільтрованих листків рослин *N. benthamiana*. До розчину тотального білку додавали 4-MUG, що є субстратом β -глюкуронідази та при розщепленні цим ферментом утворює речовину 4-MU,

якій притаманна флуорисценція. Кількість білку β -глюкуронідази оцінювали за накопиченням та інтенсивністю флуоресценції речовини 4-MU та співвідносили її з загальною кількістю білку в кожній пробі (відповідно до Jefferson et al. [101]). Отримані результати представлені на рис. 3.20-б.

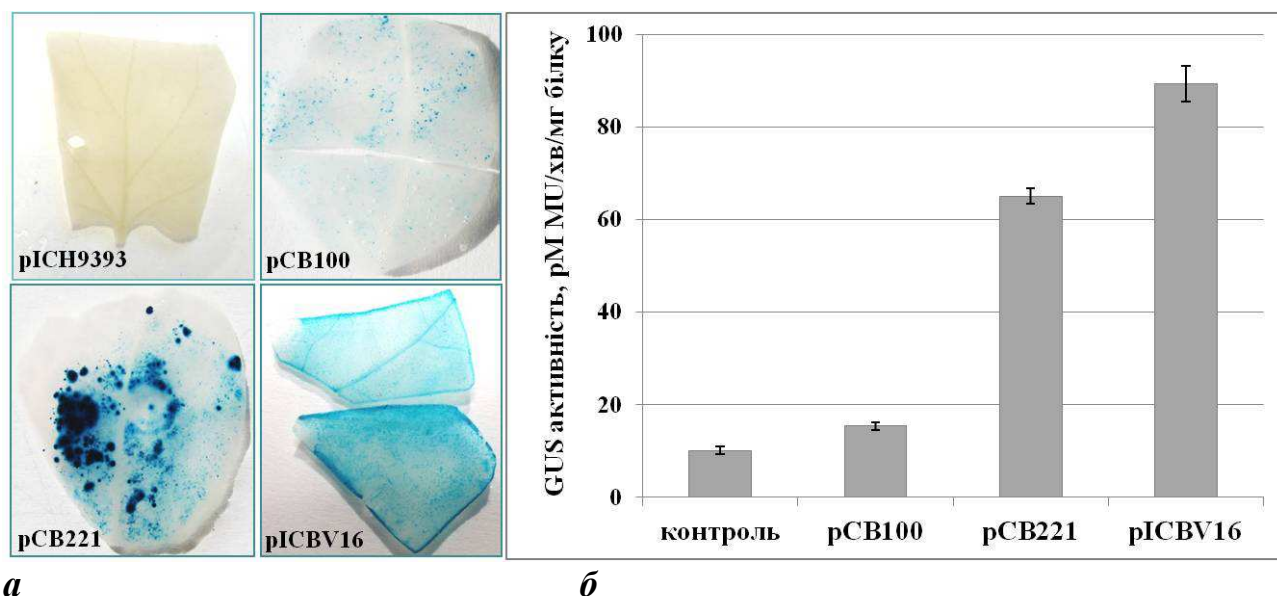


Рис. 3.20. Результати аналізу GUS активності при транзйентній *loх*-опосередкованій експресії *gus* гену:

а – результати гістохімічного аналізу; *б* - кількісна оцінка білку GUS в листках *N. benthamiana* після інфільтрації векторами, що містять *gus* ген, визначена методом флуориметричного аналізу; вектор pICBV16 - *gus* ген під контролем 35S промотору, вектори pCB100 та pCB221 містять послідовність RB-*loх*-*gus*, контроль – вектор pICH9393 – не містить гену *gus*. Представлені дані відображають середнє значення, згідно результатів трьох незалежних вимірювань та середню квадратичну похибку середнього значення GUS активності.

В цілому, можна констатувати, що результати кількісного аналізу за допомогою флуориметричного методу співпадають з результатами гістохімічного аналізу активності β -глюкуронідази для кожного з векторів. Згідно даним, отриманим методом флуориметричного аналізу, активність білку GUS при інфільтрації листків вектором pCB100 (під час транзйентної експресії), є більшою від значення негативного контролю (вектор pICH9393) та відчутно збільшується при використанні вектора pCB221.

Проведені дослідження підтверджують можливість транзйентної *loх*-опосередкованій експресії *gus* гену. Оскільки відмінність між векторами pCB100 та pCB221 полягає лише у наявності послідовності 35S промотора у Т-

ДНК вектора pCB221, то можна також зробити висновок про вплив енхансера 35S промотора на транз'єнтну *lox*-опосередковану експресію.

3.6.2. *Lox*-опосередкована експресія *gus* гену в стабільно трансформованих рослинах тютюну

Після проведення спільного культивування експлантів рослин тютюну з агробактерією, яка містить вектори pCB100, pICBV16 та pCB221, згідно з методикою (див. розділ 2, п. 2.6.2.), регенерація рослин проводилась на селективному середовищі, що містить 100 мг/л канаміцину, оскільки всі три вектори містили селективний ген *nptII* (рис. 2.6). Гістохімічний аналіз експресії β -глюкуронідази показав, що первинний калюс, який утворювався по зрізах експлантів тютюну на селективному середовищі, що містить 100 мг/л канаміцину, виявляв активність β -глюкуронідази у всіх трьох варіантах трансформації (рис. 3.21).

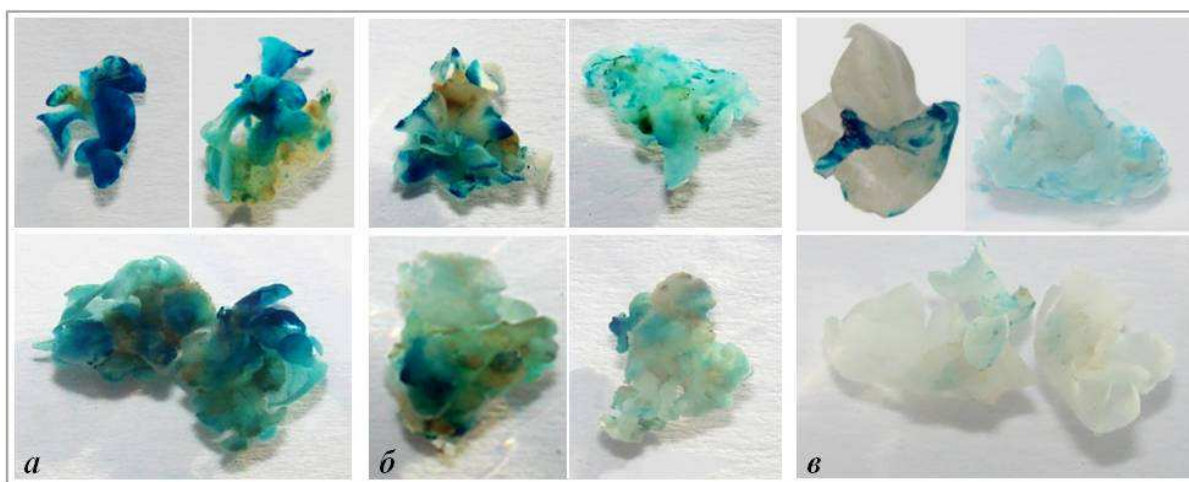


Рис. 3.21. Результат гістохімічного аналізу активності β -глюкуронідази в тканинах калюсу та первинних регенерантів *N. tabacum* після проведення трансформації рослин тютюну векторами pICBV16 (а), pCB221 (б) та pCB100 (в).

Слід зазначити, що інтенсивність забарвлення та частота виникнення GUS позитивних ліній після генетичної трансформації вектором pICBV16 була більшою у порівнянні з векторами pCB100 та pCB221.

Сформовані рослини були висаджені на безгормональне живильне середовище MS, яке також містило 100 мг/л канаміцину. Рослини, що

вкорінювались на селективному середовищі, були відібрані для проведення подальшого аналізу наявності та експресії в них перенесених генів. Для доведення трансгенної природи отриманих канаміцинстійких рослин тютюну проводили ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до послідовностей генів *nptII* (kan51/fw та kan51/rv) та *gus* (gus34/fw gus34/rv) (див. табл. 2.3).

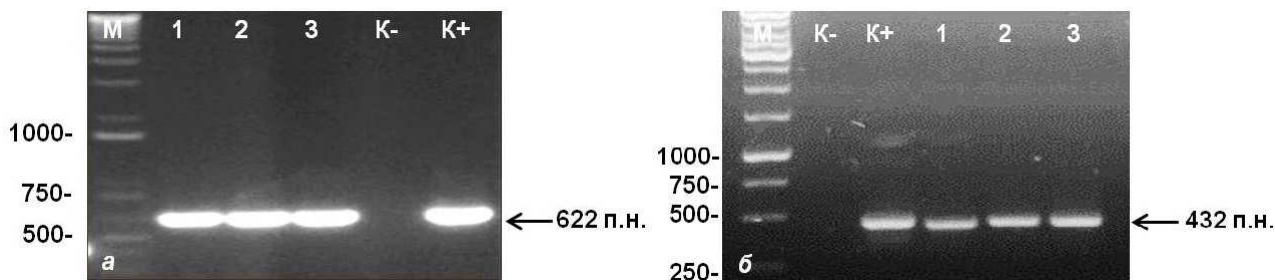


Рис. 3.22. Електрофореграма результатів аналізу за допомогою ПЛР тотальної ДНК рослин тютюну, отриманих після трансформації вектором pCB221, з використанням праймерів до *nptII* (а) та *gus* (б) генів:

М - ДНК маркер, O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); K+ – позитивний контроль ДНК плазмиди pCB221; K- - негативний контроль, ДНК нетрансформованої рослини тютюну; 1-3 - ДНК рослин-регенерантів тютюну, стійких до канаміцину, з праймерами до *nptII* (а) та *gus* (б) генів.

З рисунку 3.22. видно, що в результаті ампліфікації утворюються фрагменти ДНК очікуваного розміру: 622 п.н. для гену *nptII* та 432 п.н. для гену *gus*. Надалі, на стадії регенерації рослин, для трансгенних ліній після трансформації вектором pCB100, ми спостерігали зменшення інтенсивності забарвлення та кількості трансгенних ліній, що мали блакитне забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу активності β -глюкуронідази. Менш вираженим було зменшення інтенсивності експресії гену *gus* та, відповідно, активності β -глюкуронідази для трансгенних ліній після трансформації вектором pCB221.

Більшість відібраних трансгенних рослин, трансформованих вектором pCB100, згідно результатів гістохімічного аналізу, не мали β -глюкуронідазної активності. Приблизно 8% регенерантів мали блакитне забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу, на стадії формування пагонів – до

вкорінення рослин. І лише декілька трансгенних ліній зберегли GUS активність після укорінення та формування рослини в умовах *in vitro*. Було проаналізовано приблизно дві сотні регенерантів pCB100, що вирости на селективному середовищі, серед яких лише 3 лінії зберегли невисокий рівень активності β -глюкуронідази (1,5% трансформантів) (рис. 3.23-б).

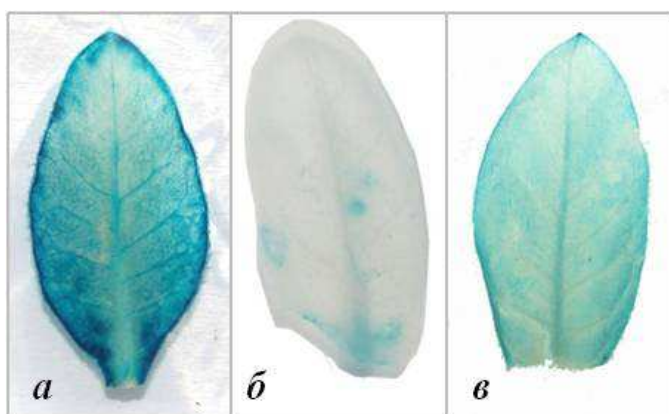


Рис. 3.23. Результат гістохімічного аналізу експресії β -глюкуронідази в листках трансгенних рослин тютюну з векторами pICBV16 (а), pCB100 (б) та pCB221 (в).

Після трансформації рослин тютюну вектором pCB221 частота виникнення рослин, які мали блакитне забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу, була на порядок вищою, ніж для вектора pCB100, і складала приблизно 10%. Інтенсивність блакитного забарвлення GUS-позитивних ліній pCB221 також була більшою, ніж для GUS-позитивних ліній pCB100, хоча і меншою, ніж для контрольного вектора pICBV16 (рис. 3.23).

GUS-позитивні рослини, в яких проходила *lox*-опосередкована експресія *gus* гену, були відібрані для подальшого аналізу активності експресії β -глюкуронідази в цих рослинах та порівняння отриманих даних з активністю цього гену в трансгенних рослинах під контролем 35S промотору. Для цього трансгенні лінії тютюну висаджували в ґрунт в умовах теплиці та проводили виділення тотального білку з листків трансгенних рослин pCB100, а також трансгенних рослин pICBV16 та pCB221. Результати флуориметричного аналізу представлені на рисунку 3.24.

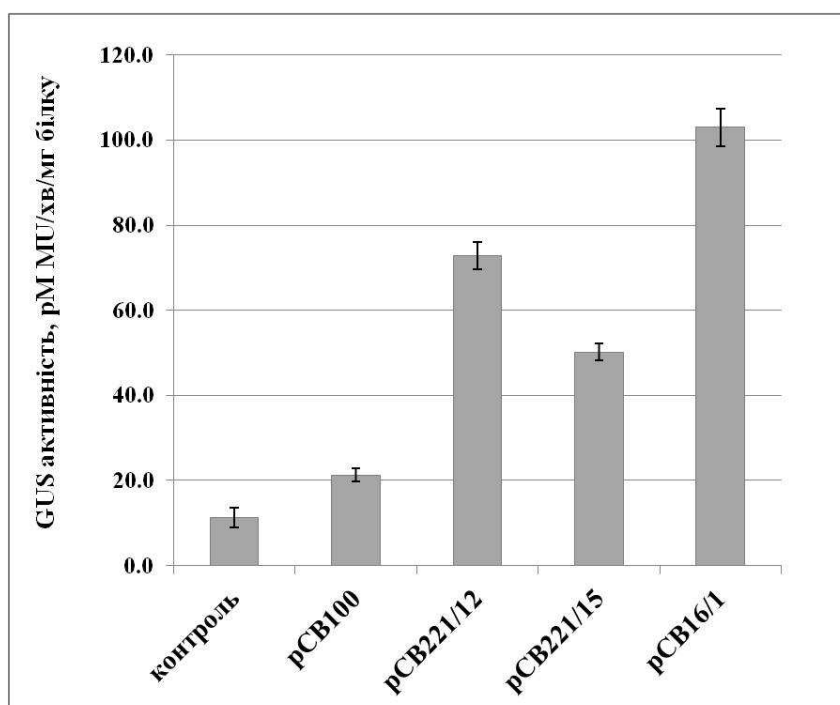


Рис. 3.24. Кількісна оцінка білку GUS в листках трансгенних рослин тютюну, визначена методом флуориметричного аналізу:

по осі X - назви ліній трансгенних рослин, в яких активність *gus* гену була підтверджена за допомогою гістохімічного аналізу. Представлені дані відображають середнє значення згідно результатів трьох незалежних вимірювань в листках однієї рослини (висадженої в ґрунт) та середню квадратичну похибку середнього значення GUS активності.

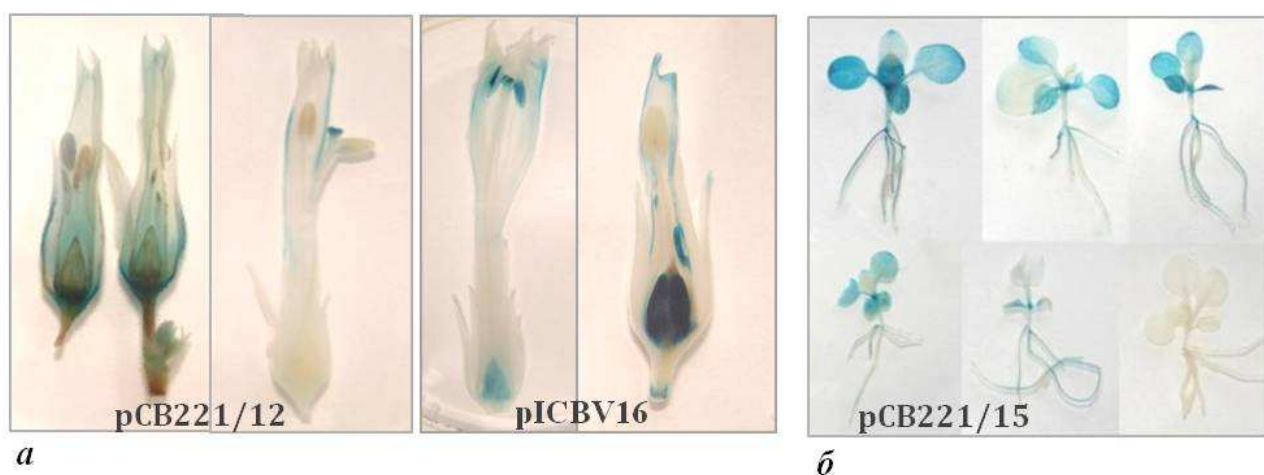


Рис. 3.25. Результат гістохімічного аналізу експресії β -глюкуронідази в генеративних органах (а) та проростках (б) трансгенних рослин тютюну з векторами pICBV16 та pCB221.

Відібрані трансгенні лінії тютюну, в яких проходила *lox*-опосередкована експресія *gus* гену, в умовах теплиці квітнули та, після самозапилення, зав'язували насіння. Методом гістохімічного аналізу була підтверджена

експресія гену β -глюкуронідази в листках рослин, що вирощуються в теплиці, в генеративних органах, а також в Т1 проростках з насіння трансгенних рослин, трансформованих вектором pCB221 (рис. 3.25).

Отримані дані переконливо демонструють вплив енхансеру 35S промотору на *lox*-опосередковану експресію *gus* гену. При наявності послідовності 35S промотору у тій самій Т-ДНК, ми спостерігали суттєве збільшення як кількості трансгенних рослин, які демонстрували GUS активність, так і рівню експресії *gus* гену у GUS-позитивних трансгенних рослинах.

3.7. Аналіз послідовності RB-*lox in silico*

Комп'ютерний аналіз RB-*lox* послідовності за допомогою програми Plant CARE та бази даних PLACE [119, 120] виявив ТАТА мотиви в послідовності *loxA* сайту (вектори pICH3737 та pICH3744), що знаходяться на відстані 94 bp, 82 bp та 72 bp відносно сайту ініціації транскрипції (рис. 3.26-а). Так само ТАТА-послідовності виявлені і в послідовності *loxP* сайту (вектор pICH9393 та pICH9414). Декілька послідовностей, що ототожнюють з регуляторними елементами, були виявлені в ділянці, що межує з *lox* сайтом: СААТ бокс, ATGCAAAT мотив, TGA-елемент та ATCT мотив, який частково перекривається з СААТ боксом (рис. 3.26-а). Згідно з загальноприйнятим визначенням ТАТА бокс – це послідовність, що зазвичай входить до складу *корового* (мінімального) еукаріотичного промотору [44-47]. Після зв'язування одного з факторів транскрипції з ТАТА-боксом запускається каскад подій, результатом яких є формування преініціаторного комплексу та ініціація РНК полімерази II [46, 47]. Завдяки цьому мінімальний промотор здатен забезпечити базовий рівень експресії гену, що відбувається у клітинах всіх типів. СААТ-бокс входить до послідовності еукаріотичного промотора яку виділяють як *проксимальний промотор* [58-61]. Транскрипційний фактор, що зв'язується з СААТ-боксом та активує транскрипцію РНК полімеразою II, відомий як NF-Y (Nuclear Factor Y) [64]. Ми можемо зробити припущення, що

комбінація цих послідовностей, при розміщенні *lox* сайту у векторі біля правого бордеру, створила можливості для експресії трансгену.

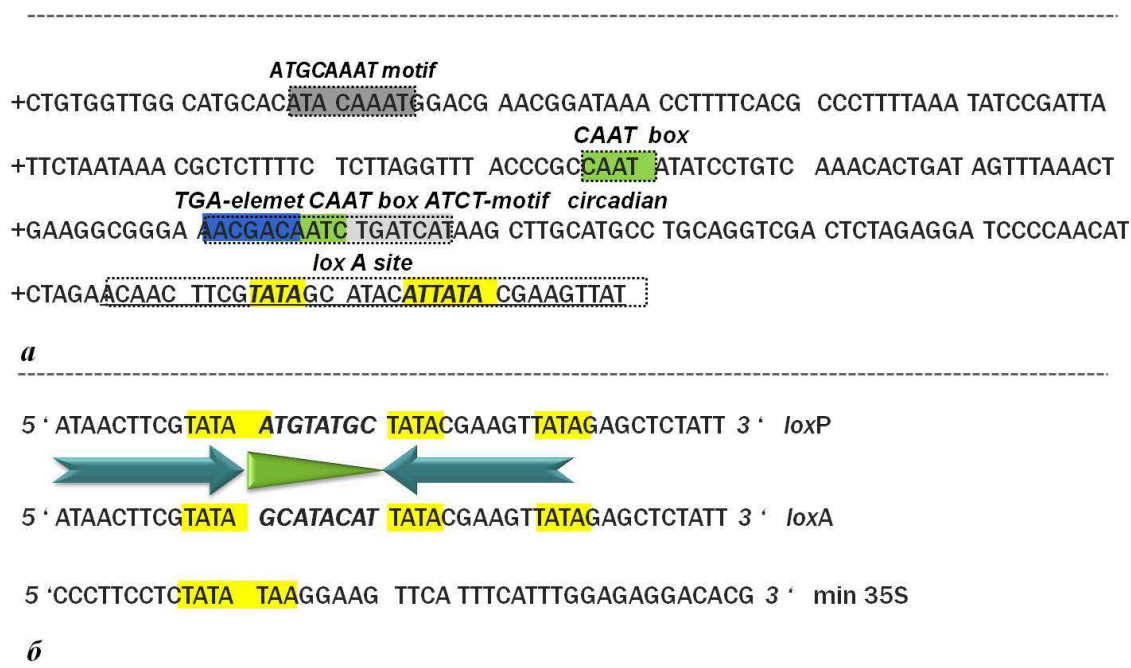


Рис. 3.26. Результати аналізу *in silico* послідовності *lox* сайту та прилеглих районів:

a - послідовність RB-*lox* ділянки вектору pICH3737 (ймовірні регуляторні послідовності, визначені програмою Plat CARE, виділено кольором: TATA бокс виділено жовтим, CAAT бокс - зеленим, послідовність *lox* сайту обведено пунктиром); **б** - порівняння послідовності *loxA*, *loxP* сайтів та мінімального 35S промотору: жирним курсивом прописано послідовність спейсеру *lox* сайтів – області, яка була змінена при створенні мутантного (*loxA*) сайту, TATA бокс виділено жовтим.

Також ми проводили порівняльний аналіз послідовностей *loxA* та *loxP* сайтів. Сайт *loxP* - нативна послідовність бактеріофагу P1, що складається з двох інвертованих повторів (13 п.н.), розділених асиметричним спейсером (8 п.н.) [186, 191]. *LoxA* – мутований сайт рекомбінації, що містить нуклеотидні заміни у послідовності спейсера. Аналізуючи ці дві послідовності, можна констатувати, що заміни в області спейсера не вплинули на TATA послідовності, притаманні *loxP* сайту, оскільки вони розміщені в області інвертованих повторів (рис. 3.26-б). Цей висновок цілком збігається з результатами наших попередніх досліджень, оскільки використання в експериментах з генетичної трансформації векторів з *loxA* та *loxP* сайтами не

мало статистично достовірних відмінностей по частоті виникнення рослин стійких до фосфінотрицину (див. п. 3.2). Порівняння *lox* сайту та мінімального 35S промотору підтверджує малу ступінь гомології між цими послідовностями.

Проведений аналіз послідовності RB-*lox* та дані флуориметричного аналізу експресії *gus* гену дають підстави стверджувати, що *lox*-опосередкована експресія, найімовірніше, є результатом взаємодії виявлених коротких регуляторних послідовностей *lox* сайту, правого бордеру та енхансеру незалежного 35S промотора, розміщеного у векторі.

3.8. Генетична трансформація рослин салату *Lactuca sativa* векторами, що містять *lox* сайт та *bar* ген біля правого бордеру

Ми проводили генетичну трансформацію сім'ядольних експлантів салату сорту «Одеський кучерявий». Сім'ядольні експланти як зручний об'єкт для агробактеріальної трансформації були запропоновані для цього виду в роботі [224] і надалі успішно використовувались при створенні трансгенних рослин цього виду [263].

3.8.1. Визначення селективної концентрації канаміцину та фосфінотрицину для рослин *Lactuca sativa* в культурі *in vitro*

В нашій роботі регенерація рослин салату відбувалась на середовищі B5R, до складу якого входив полівінілпіролідон (500 мг/л). Полівінілпіролідон (ПВП) - водорозчинний полімер, що адсорбує фенольні сполуки, які виділяються деякими рослинами при регенерації в культурі *in vitro* [264, 265]. Завдяки цим властивостям ПВП сприяє зменшенню потемніння середовища та підвищує ефективність регенерації деяких культур [266]. При цьому ми не зустрічали публікацій, в яких описано можливу взаємодію ПВП з селективними агентами. Підбираючи оптимальну концентрацію фосфінотрицину та канаміцину, нам також важливо було з'ясувати можливий вплив ПВП в концентрації 0,05 % на чутливість салату до селективного агенту. Для цього використовували середовище з трьома різними концентраціями канаміцину (5,

12,5 та 25 мг/л) та двома концентраціями фосфінотрицину (2,5 та 5 мг/л) і два варіанти середовища: один містив 0,5 % ПВП (10000), інший – без нього. При використанні селективного агента канаміцину на основі якісного (рис. 3.27) та кількісного (табл. 3.3) аналізу ефективності регенерації можна стверджувати про зменшення селективного тиску в середовищі, яке містило 0,5 % ПВП.

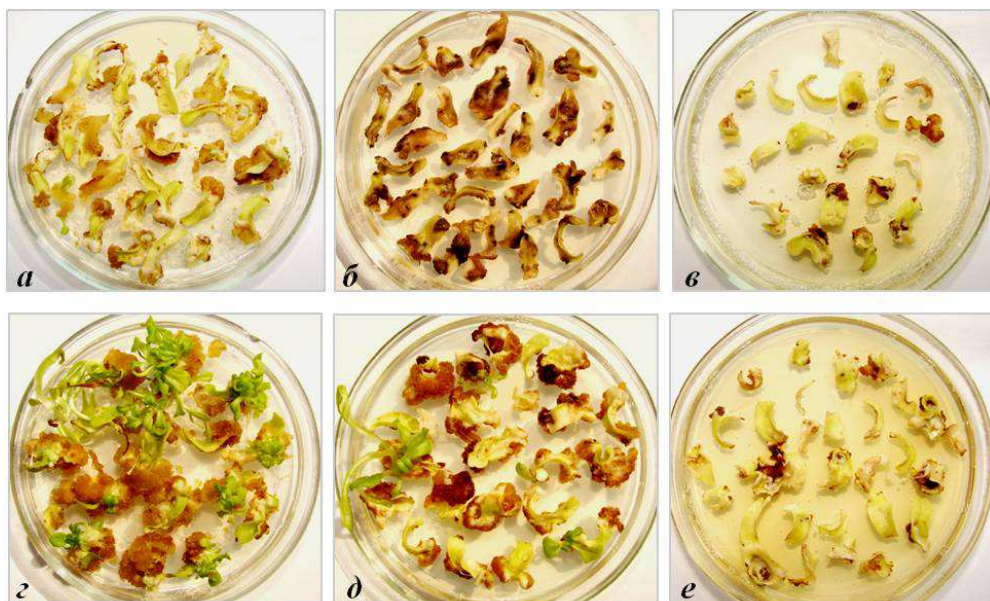


Рис. 3.27. Вплив ПВП на регенерацію салату на селективному середовищі з різною концентрацією канаміцину:

а, б, в – середовище, що містить 5, 12,5 та 25 мг/л канаміцину відповідно без додавання ПВП;
г, д, е – середовище, що містить 5, 12,5 та 25 мг/л канаміцину та 500 мг/л ПВП.

Такий вплив може бути пов'язаний зі здатністю ПВП частково зв'язувати антибіотики і таким чином зменшувати їх вплив на селекцію трансформантів. Як видно з рисунку 3.27 та при порівнянні даних представлених у таблиці 3.3, якщо не використовувати у середовищі ПВП, то селективною для канаміцину є концентрація 5 мг/л: ефективність регенерації становить всього 5,5 %, тоді як при додаванні ПВП у середовище для регенерації – збільшується до 61,4 %.

Можна зробити висновок, що при додаванні ПВП у середовище для регенерації селективна концентрація канаміцину для рослин *L. sativa* повинна бути збільшена до 25 мг/л. В той же час ми не спостерігали впливу ПВП у середовищі на селективну концентрацію фосфінотрицину, яка становила 5 мг/л.

Таблиця 3.3

Ефективність регенерації салату та утворення калюсу (у відсотках) на селективному середовищі з різними концентраціями канаміцину (Км).

Варіант	Ефективність регенерації рослин та утворення калюсу* (у відсотках) на кожному з експериментальних середовищ					
	5 мг/л Км	5 мг/л Км + 500 мг/л ПВП	12,5 мг/л Км	12,5 мг/л Км + 500 мг/л ПВП	25 мг/л Км	25 мг/л Км + 500 мг/л ПВП
Калюс	85,8±1,8	100,0	24,7±4,7	85,5±0,9	11,8±1,8	15,6±1,8
Регенерація	5,5±1,7	61,4±2,6	0	16,8±1,4	0	0

*Ефективність регенерації та калюсоутворення оцінювали як співвідношення кількості експлантів, що дають зелені пагони або калюс на селективному середовищі, до загальної кількості експлантів в експерименті.

3.8.2. Отримання та дослідження трансгенних рослин салату, в яких проходить *lox*-опосередкована експресія *bar* гену

В результаті експериментів з агробактеріальної трансформації *L. sativa* векторами pICH3737, pICH9393 на середовищі B5R (див. табл. 2.2), яке містило 0,05% ПВП та 25 мг/л канаміцину, відбувалась регенерація рослин салату, які вкорінювались на безгормональному середовищі. Для доведення трансгенної природи отриманих канаміцинстійких рослин салату проводили ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до послідовностей генів *nptII* та *bar*. Аналіз підтвердив наявність *bar* та *nptII* генів в геномах рослин, стійких до канаміцину.

В результаті експериментів були отримані трансгенні рослини *L. sativa*, які містять послідовності *lox* сайту та *bar* гену біля правого бордеру, і показано, що у більшості трансгенних рослин (57% та 64%), відібраних на канаміцині, спостерігається ознака стійкості до фосфінотрицину (табл. 3.4). Нижча частота виникнення стійких до фосфінотрицину рослин в цих експериментах, на наш погляд, пояснюється особливостями цієї культури в умовах *in vitro*. Рослини цього виду вкорінюються з меншою ефективністю, ніж *N. tabacum*, тому при

пересадках на живильному середовищі частина рослин гине навіть без селективного тиску.

Таблиця 3.4

**Узагальнені результати трансформації рослин салату
конструкціями pICH3737 та pICH9393.**

Вектор	Кількість регенерантів	Вкорінилось на селективному середовищі, шт.		Кількість рослин, стійких до фосфінотрицину, %
		25 мг/л канаміцину	5 мг/л фосфінотрицину	
pICH3737	118	53	30	57
pICH9393	61	28	18	64

Отримані трансгенні рослини були висаджені в ґрунт в умовах теплиці та обприскані розчином гербіциду Basta в концентрації 2,5 мл/л. Проведений тест показав, що отримані трансгенні рослини салату є стійкими до гербіциду і в умовах теплиці, оскільки після обробки гербіцидом вони залишались зеленими, тоді як контрольні рослини втрачали тургор та гинули протягом двох тижнів. (рис. 3.28-а,б). Трансгенні рослини салату в умовах теплиці квітнули (рис. 3.28-в) та зав'язували насіння. Насіння отриманих трансгенних ліній салату було поверхнево простерилізоване та висаджене на живильне середовище MS для проростання. Проростки були перенесені на селективне живильне середовище MS, що міститло 5 мг/л фосфінотрицину, для визначення чутливості нащадків трансгенних рослин до гербіциду. Ми спостерігали успадкування ознаки стійкості до фосфінотрицину у трансгенних рослин салату: всі проростки залишились зеленими та продовжували рости на селективному середовищі (рис. 3.28-г). Слід зазначити, в жодної з проаналізованих ліній салату ми не спостерігали розщеплення за трансгенною ознакою. Таке успадкування перенесених генів може бути результатом апоміксису, який притаманний рослинам з родини складноцвітних [267], до якої відноситься *L. sativa*.

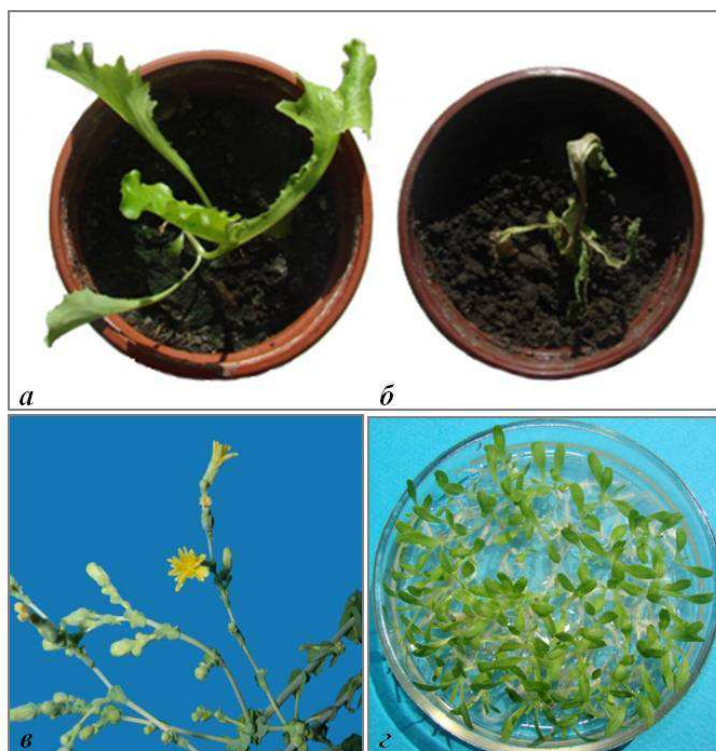


Рис. 3.28. Стійкість до фосфінотрицину трансгенних рослин салату:
а-б – обробка рослин розчином гербіциду Basta, в умовах теплиці: *а* – трансгенна рослина салату, трансформована *A tumefaciens* (вектор pICH3737), *б* - контрольна рослина дикого типу; *в* - цвітіння трансгенних рослин салату в умовах теплиці; *г* - T1 проростки салату на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину.

В результаті наших дослідів були отримані трансгенні рослини салату, стійкі до фосфінотрицину, які містять безпромоторний *bar* ген та *lox* сайт біля правого бордеру. Таким чином, на прикладі рослин *L. sativa* було додатково підтверджено, що вектори, які містять послідовність *lox* біля бордеру Т-ДНК замість промотора у складі перенесеного гену *bar*, можуть бути успішно використані для отримання трансгенних рослин, стійких до гербіциду.

УЗАГАЛЬНЕННЯ

В роботі було запропоновано новий підхід для забезпечення експресії перенесених генів в трансгенних рослинах, з використанням в генетичних конструкціях послідовності *lox* сайтів Cre/*lox* системи рекомбінації (мутантного та дикого типу) біля бордеру Т-ДНК, розміщених замість традиційного промотора у складі перенесеного гену.

Можливість *lox*-опосередкованої експресії перенесених генів була виявлена, коли для генетичної трансформації рослин *N. africana* були використані вектори, що містять *lox* сайт та *bar* ген без промотору біля правого бордеру Т-ДНК, а також ген *nptII* під контролем *nos* промотору. Трансгенні рослини були відібрані на селективному середовищі, що містить канаміцин. При перевірці цих рослин на селективному середовищі, що містить фосфінотрицин, виявилось, що у більшості трансгенних рослин (80%) відбувається експресія *bar* гену. Про експресію *bar* гену свідчила стійкість трансгенних рослин до гербіциду як в умовах *in vitro* так і в умовах теплиці, а також наявність відповідної мРНК в тотальній РНК рослин, що було підтверджено за допомогою ЗТ-ПЛР. Ми припускаємо, що в цих трансгенних рослинах відбувається стабільна експресія *bar* гену, оскільки активність фосфінотрицину базується на блокуванні фермента глютамінсинтетази, наслідком чого є численні порушення метаболізму рослини, що спричиняє її загибель. Тому лише стабільна експресія *bar* гену, продуктом якого є фосфінотрицин ацетил трансфераза - фермент, що нейтралізує фосфінотрицин - здатна забезпечити ріст та вкорінення трансгенних рослин на селективному середовищі. Крім того, стійкість до фосфінотрицину успадковувалась нащадками (Т1) цих рослин, що, на наш погляд, також підтверджує стабільність та високий рівень експресії *bar* гену.

На нашу думку, отриманий результат не міг бути результатом випадкового транскрипційного злиття трансгена та промотора генома рослини, оскільки, згідно до опублікованих даних, частота транскрипційного злиття, при якій відбувається конститутивна експресія трансгену, є набагато нижчою і

складає приблизно 4% від загальної кількості трансгенних рослин. Додатково це було підтверджено за допомогою контрольного вектора pICH3831, в якому *bar* ген розміщено біля правого бордера без *lox* сайтів, а також за допомогою векторів pICH9393 та pICH9414, в Т-ДНК яких, для запобігання проходження через *bar* ген РНК полімерази при випадковому транскрипційному злитті трансгена та промотора генома рослини, було додано термінатор між правим бордером та *lox* сайтом.

Проведені дослідження показали, що *lox*-опосередкована експресія залежить від способу внесення Т-ДНК в рослинний геном і відбувається лише в трансгенних рослинах, отриманих методом агробактеріальної трансформації. Також *lox*-опосередкована експресія залежить від розміщення послідовності *lox-bar*- у векторі. Результати агробактеріальної трансформації *N. tabacum* та *N. africana* векторами pICH1567 та pICH9702, в яких послідовність *-lox-bar*- розміщена в середині контрукції, переконливо свідчать, що в цих трансгенних рослинах не відбувається експресія *bar* гену, що, в свою чергу, підтверджує, що *lox* сайт не може функціонувати як самостійна регуляторна послідовність. В експериментах з цими векторами жодна з отриманих трансгенних рослин не була стійкою до фосфінотрицину. Такий результат був як при стандартній схемі наших експериментів, коли селекція трансгенних рослин проходила на середовищі з канаміцином, а рослини, відібрані таким чином, надалі тестувалися на стійкість до фосфінотрицину, так і в експериментах, в яких після трансформації проводилась безпосередня селекція на середовищі, що містить фосфінотрицин.

За результатами проведених експериментів ми також продемонстрували можливість використання безпромоторного *bar* гену та *lox* сайту біля лівого бордеру як селективного гену у векторах для агробактеріальної трансформації рослин, а також для отримання трансгенних рослин, стійких до гербіциду.

В роботі була показана можливість *lox*-опосередкованої експресії *gus* гену в трансгенних рослинах тютюну, а також можливість транзійентної *lox*-опосередкованої експресії *gus* гену в рослинах *N. benthamiana*. Також, отримані

дані переконливо демонструють вплив енхансеру 35S промотору на *lox*-опосередковану експресію *gus* гену. За наявності послідовності 35S промотору у тій самій Т-ДНК, ми спостерігали суттєве збільшення як кількості трансгенних рослин, які демонстрували GUS активність, так і рівню експресії *gus* гену у GUS-позитивних трансгенних рослинах.

Проведений комп'ютерний аналіз показав наявність послідовностей, що ототожнюються з регуляторними елементами, у послідовності *lox* сайту (ТАТА бокс) та в ділянці, що межує з *lox* сайтом: (CAAT бокс, ATGCAAAT мотив, TGA-елемент та ATCT мотив).

Проведений аналіз *in situ* послідовності RB-*lox* та дані флуориметричного аналізу експресії *gus* гену дають підстави стверджувати, що *lox*-опосередкована експресія, найімовірніше, є результатом взаємодії виявлених коротких регуляторних послідовностей *lox* сайту, правого бордеру та енхансеру незалежного 35S промотора, розміщеного у векторі.

На прикладі рослин таких видів як *N. africana*, *N. tabacum* та *L. sativa* було показано, що вектори, які містять послідовність *lox* біля бордеру Т-ДНК замість промотора у складі перенесеного гену *bar*, можуть бути успішно використані для отримання трансгенних рослин, стійких до гербіциду.

ВИСНОВКИ

В роботі була доведена можливість використання послідовності *lox*-сайту Cre/*lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1, розміщеної біля бордерів T-ДНК, замість промотора перенесеного гену для забезпечення його експресії в трансгенних рослинах.

1. Розроблено ефективну та відтворювану систему генетичної трансформації рослин *Nicotiana africana*, а також отримано стійкі до фосфінотрицину трансгенні рослини цього виду.
2. Досліджено *lox*-опосередковану експресію гену *bar* в трансгенних рослинах *N. africana* та *N. tabacum*. Визначено, що стабільна експресія перенесеного гену *bar* спостерігалась у 80% трансгенних рослин, отриманих методом агробактеріальної трансформації векторами, які містили послідовність *-lox-bar-* біля правого бордеру T-ДНК.
3. Показано можливість *lox*-опосередкованої експресії при розміщенні послідовності *-lox-bar-* біля лівого бордеру T-ДНК та отримані стійкі до фосфінотрицину трансгенні рослини *N. tabacum* з відповідним вектором.
4. Експериментально доведено, що *lox*-опосередкована експресія не відбувається при розміщенні послідовності *-lox-bar-* в середині вектору, а також залежить від способу внесення T-ДНК в рослинний геном і не відбувається в трансгенних рослинах, отриманих методом прямої трансформації.
5. За допомогою молекулярно-біологічного аналізу було підтверджено, що в стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослинах, отриманих в результаті агробактеріальної трансформації вектором, який містить *lox* сайт замість промотора гену *bar* біля правого бордеру, відбувається транскрипція гену *bar*.
6. Показано можливість транз'єнтної *lox*-опосередкованої експресії маркерного *gus* гену в рослинах *N. benthamiana* при агроінфільтрації, а також стабільної *lox*-опосередкованої експресії перенесеного гену *gus* в

трансгенних рослинах тютюну, отриманих методом агробактеріальної трансформації

7. При дослідженні рівня експресії *gus* гену, доведено вплив енхансеру незалежного 35S промотору, розміщеного у векторі, на *lox*-опосередковану експресію. За допомогою комп'ютерного аналізу визначено короткі регуляторні послідовності, що входять до складу ділянки правого бордеру та *lox* сайту (RB-*lox*-).
8. Вектори, що містять послідовність *lox* сайту замість традиційного промотора у складі перенесеного *bar* гену біля правого бордеру Т-ДНК, були успішно використані для отримання трансгенних рослин *Lactuca sativa*, стійких до гербіциду фосфінотрицину.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений / Н.В. Кучук. – Київ : Наукова думка, 1997. – 152 с. - ISBN 966-00-0129-0.
2. Блюм Я. Нова хвиля «зеленої революції». Перспективи застосування в Україні досягнень молекулярної біотехнології та геноміки / Я. Блюм, Ю. Сиволап, Р. Рудий, О. Созінов // Вісн. НАН України. – 2006. – № 3. – С. 21–31.
3. Zhu C. Transgenic strategies for the nutritional enhancement of plants / C. Zhu, S. Naqvi, S. Gomez-Galera [et al.] // Trends Plant Sci. – 2007. – V. 12, № 12. – P. 548–555.
4. Hefferon K. L. Nutritionally enhanced food crops; progress and perspectives / K. L. Hefferon // Int. J. Mol. Sci. – 2015. – V. 16, № 2. - P. 3895-3914.
5. Herrera-Estella L. Chimeric genes as a dominant selectable markers in plant cells / L. Herrera-Estella, M. De Block, E. Messens [et al.] // EMBO J. – 1983. – V. 2, № 6. – P. 987–995.
6. Potenza K. Targeting transgenic expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. / K. Potenza, L. Aleman, C. Sengupta-Gopalan // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 2004. – V. 40, № 1. – P. 1-22.
7. Corrado G. Inducible gene expression systems and plant biotechnology / G. Corrado, M. Karali // Biotechnol. Adv. – 2009. – V. 27, № 6. – P. 733–743.
8. Covey S. Plants combat infection by gene silencing / S. Covey, N. Al-Kaff, A. Lángara, D. Turner // Nature. – 1997. - V. 385, № 6619. – P. 781–782.
9. Ratcliff F. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. F. Ratcliff, B. D. Harrison, D. C. Baulcombe // Science. – 1997. – V. 276, № 5318. – P. 1558-1560.
10. Ratcliff F. G. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses / F. G. Ratcliff, S. A. MacFarlane, D. C. Baulcombe // The Plant Cell. – 1999. - V. 11, № 7. - P. 1207–1215.

11. Matzke M. A. Homology-dependent gene silencing and host defense in plants / M. A. Matzke, W. Aufsatz, T. Kanno [et al.] // *Adv. Genet.* – 2002. – V. 46. – P. 235-275.
12. Baulcombe D. RNA silencing in plants / D. Baulcombe // *Nature*. – 2004. – V.431, № 7006. - P. 356–363.
13. Al-Kaff N. S. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene / N. S. Al-Kaff, M. M. Kreike, S. N. Covey [et al.] // *Nat Biotechnol.* – 2000. – V. 18, № 9. – P. 995–999.
14. Anami S. Higher plant transformation: principles and molecular tools // S. Anami, E. Njuguna, G. Coussens [et al.] // *Int. J. Dev. Biol.* – 2013. – V. 57, № 6-8. – P. 483-494.
15. Lessard P. A. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants / P. A. Lessard, H. Kulaveerasingam, G. M. York [et al.] // *Metab Eng.* – 2002. – V. 4, № 1. – P. 67–79.
16. Naqvi S. When more is better: multigene engineering in plants / S. Naqvi, G. Farré, G. Sanahuja [et al.] // *Trends Plant Sci.* – 2010. – V.15, № 1. – P. 48–56.
17. Peremarti A. Promoter diversity in multigene transformation / A. Peremarti, R. M. Twyman, S. Gómez-Galera [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2010. – V. 73, № 4-5. – P. 363-378.
18. Matzke A. J. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes / A.J. Matzke, F. Neuhuber, Y. D. Park [et al.] // *Mol Gen Genet.* – 1994.- V. 244, № 3. – P. 219-229.
19. Selker E. U. Gene silencing: repeats that count. / E. U. Selker // *Cell*. – 1999. – V. 97, № 2. – P. 157–160.
20. Muskens M. W. M. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing / M. W. M. Muskens, A. P. A. Vissers, J. N. M. Mol [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2000. – 43, № 2-3. – P. 243–260.

21. Matzke M. A. Transgene silencing by the host genome defence: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates / M. A. Matzke, M. F. Mette, A. J. M. Matzke // Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 43, № 2-3. – P. 401–415.
22. Yoo S. Y. The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene / S. Y. Yoo, K. Bomblies, S. K. Yoo [et al.] // Planta. – 2005. – V. 221, № 4. – P. 523–530.
23. Zheng X. The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters/ X. Zheng, W. Deng, K. Luo [et al.] // Plant Cell Rep. – 2007. – V. 26, № 8. – P. 1195–1203.
24. Bhullar S. Analysis of promoter activity in transgenic plants by normalizing expression with a reference gene: anomalies due to the influence of the test promoter on the reference promoter / S. Bhullar, S. Chakravarthy, D. Pental, P. K. Burma // J. Biosci. – 2009. - V. 34, № 6. – P. 953-962.
25. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак ; пер. с англ. Н. В. Баскакова ; [ред. Н. К. Янковский]. - М.: Мир, 2002. - 589 с. - ISBN 5-03-003328-9.
26. Peach C. Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters / C. Peach, J. Velten // Plant Mol Biol. - 1991. – V. 17, № 1. – P. 49-60.
27. Francis K. E. Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations / K. E. Francis, S. Spiker // Plant J. – 2005. – V. 41, № 3. P. 464-477.
28. Van der Krol A. R. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression / A. R. Van der Krol, L. A. Mur, M. Beld [et al.] // Plant Cell. – 1990. – V. 2, № 4. – P. 291–299.

29. Napoli C. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans / C. Napoli, C. Lemieux, R. Jorgensen // *Plant Cell*. – 1990. – V. 2, № 4. – P. 279–289.
30. Ecker J. R. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA / J. R. Ecker, R. W. Davis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1986 – V. 83, № 15. P. 5372–5376.
31. Hamilton A. J. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants / A. J. Hamilton, D. C. Baulcombe // *Science*. – 1999. – V. 286, № 5441. – P. 950–952.
32. Vaucheret H. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators / H. Vaucheret, M. Fagard // *Trends Genet*. – 2001. – V. 17, № 1. – P. 29–35.
33. Vaucheret H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations / H. Vaucheret // *Genes. Dev*. – 2006. – V. 20, № 7. – P. 759–771.
34. Fire A. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* / A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery [et al.] // *Nature*. – 1998. – V. 391, № 6669. – P. 806–811.
35. Wilkins C. RNA interference is an antiviral defence mechanism in *Caenorhabditis elegans* / C. Wilkins, R. Dishongh, S. Moore [et al.] // *Nature*. – 2005. – V. 436, № 7053. – P. 1044–1047.
36. Jia F. A retrovirus-based system to stably silence hepatitis B virus genes by RNA interference / F. Jia, Y. Zhang, C. Liu // *Biotechnol. Lett*. – 2006. – V. 28, № 20. – P. 1679–1685.
37. Takeshita F. Therapeutic potential of RNA interference against cancer / F. Takeshita, T. Ochiya // *Cancer Sci*. – 2006. – V. 97, № 8. P. 689–696.
38. Matzke M. A. Planting the seeds of a new paradigm / [Электронный ресурс] M. A. Matzke, A. J. M. Matzke // *PLoS Biol*. – 2004. V. 2, № 5. – Режим

доступу:

<http://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0020133>

39. Дорохов Ю. Л. «Умолкание» генов у растений / Ю. Л. Дорохов // Молекулярная биология. – 2007. – Т. 41, № 4. – С. 579–592.
40. Lemon B. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control / B. Lemon, R. Tjian // Genes. Dev. – 2000. – V. 14, № 20. – P. 2551–2569.
41. Butler J. E. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression / J. E. Butler, J. T. Kadonaga // Genes Dev. – 2002. – V. 16, № 20. – P. 2583–2592.
42. Gurley W. B. General transcription factors and the core promoter: ancient roots / W. B. Gurley, K. O'Grady, E. Czarnecka-Verner, S. J. Lawit // Annual Plant Reviews Volume 29: Regulation of Transcription in Plants ; [ed. by K. D. Grassler]. – Oxford : Blackwell Publishing Ltd, 2007. - P. 393 – 415. - ISBN 978-1-4051-4528-2.
43. Venter M. Syntetic promoter engineering / M. Venter, F. C. Botha // Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives ; [ed. by E.-C. Pua, M. R. Davey]. - Berlin : Springer-Verlag, 2010. – P. 393-414 – ISBN 978-3-642-04669-8.
44. Novina C. D. Core promoters and transcriptional control / C. D. Novina, A. L. Roy // Trends Genet. – 1996. – V. 12, № 9. – P. 351-355.
45. Aso T. Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters / T. Aso, J. W. Conaway, R. C. Conaway // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269, № 42. – P. 26575-26583.
46. Hahn S. Yeast TATA-binding protein TFIID binds to TATA elements with both consensus and nonconsensus DNA sequences / S. Hahn, S. Buratowski, P. A. Sharp, L. Guarente // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – V. 86, № 15. – P. 5718–5722.

47. Horikoshi M. Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box / M. Horikoshi, C. K. Wang, H. Fujii [et al.] // *Nature*. – 1989. – V. 341, № 6240. – P. 299–303.
48. Muller F. New problems in RNA polymerase II transcription initiation: matching the diversity of core promoters with a variety of promoter recognition factors / F. Muller, M. A. Demeny, L. Tora // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282, № 20. – P. 14685-14689.
49. Kadonaga J.T. Perspectives on the RNA Polymerase II Core Promoter / J.T. Kadonaga // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* – 2012. – V. 1, № 1. - P. 40–51.
50. Weis L. Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes / L. Weis, D. Reinberg // *FASEB J.* – 1992. – V. 6, № 14. – P. 3300–3309.
51. Martinez E. TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter / E. Martinez, C. M. Chiang, H. Ge [et al.] // *EMBO J.* – 1994. – V. 13, № 13. – P. 3115–3126.
52. Weis L. Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins / L. Weis, D. Reinberg // *Mol. Cell Biol.* – 1997. – V. 17, № 6. – P. 2973–2984.
53. Burke T. W. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters / T. W. Burke, J. T. Kadonaga // *Genes Dev.* – 1996. – V. 10, № 6. - P. 711–724.
54. Burke T. W. The downstream promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila* / T. W. Burke, J. T. Kadonaga // *Genes Dev.* – 1997. – V. 11, № 22. - P. 3020–3031.

55. Kadonaga J. T. The DPE, a core promoter element for transcription by RNA polymerase II // J. T. Kadonaga // *Experimental and molecular medicine*. – 2002. – V. 34, № 4. – P. 259–264.
56. Kutach A. K. The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box in *Drosophila* core promoters / A. K. Kutach, J. T. Kadonaga // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – V. 20, № 13. – P. 4754–4764.
57. Burke T. W. *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters / T. W. Burke, J. T. Kadonaga // *Genes Dev.* – 1996. – V. 10, № 6. – P. 711-724.
58. Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences / P. Bucher // *J. Mol. Biol.* – 1990. – V. 212, № 4. – P. 563–578.
59. Nussinov R. Sequence signals in eukaryotic upstream regions / R. Nussinov // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* – 1990. – V. 25, № 3. – P. 185–224.
60. Maity S. N. Role of the CCAAT-binding protein CBF/NF-Y in transcription / S. N. Maity, B. de Crombrughe // *Trends Biochem. Sci.* – 1998. – V. 23, № 5. – P. 174–178.
61. Mantovani R. A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes / R. Mantovani // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26, № 5. – P. 1135–1143.
62. Shahmuradov I. A. PlantProm: a database of plant promoter sequences / I. A. Shahmuradov, A. J. Gammerman, J. M. Hancock [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31, № 1. - P. 114–117.
63. Testa A. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip experiments uncover a widespread distribution of NF-Y binding CCAAT sites outside of core promoters // A. Testa, G. Donati, P. Yan [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280, № 14. - P. 13606–13615.
64. Sinha S. Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast

- HAP2 and HAP3 / S. Sinha, S. N. Maity, J. Lu // PNAS. – 1995. – V. 92, № 5. – P. 1624–1628.
65. Petroni K. The promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y Transcription Factors / K. Petroni, R. W. Kumimoto, N. Gnesutta [et al.] // The Plant Cell. - 2012. - V. 24, № 12. – P. 4777–4792.
 66. Alva V. On the origin of the histone fold [Электронный ресурс] / V. Alva, M. Ammelburg, J. Söding [et al.] // BMC Structural Biology. – 2007. – V. 7, № 17. – Режим доступа : <http://www.biomedcentral.com/1472-6807/7/17>
 67. Hadjithomas M. Experimental evidence for the role of domain swapping in the evolution of the histone fold / M. Hadjithomas, E. N. Moudrianakis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011. – V. 108, № 33. – P. 13462–13467.
 68. Dolfini D. NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters / D. Dolfini, R. Gatta, R. Mantovani // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. – 2012. — V. 1, № 1. – P. 29–49.
 69. Laloum T. CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? / T. Laloum, S. De Mita, P. Gamas [et al.] // Trends Plant Sci. – 2013. – V. 18, № 3. – P. 157–166.
 70. Grosschedl R. Spacer DNA sequences upstream of the TATA sequence are essential for promotion of H2a gene transcription in vivo / R. Grosschedl, M. L. Birnstiel // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1980. – V. 77, № 12, – P. 7102–7106.
 71. Stockhaus J. Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthetic gene ST-LSI / J. Stockhaus, J. Schell, L. Willmitze // Plant Cell. – 1989. – V. 1, № 8. – P. 805–813.
 72. Buecker C. Enhancers as information integration hubs in development: lessons from genomics / C. Buecker, J. Wysocka // Trends. Genet. – 2012. - V. 28, № 6. - P. 276-284.
 73. Werner M. H. Architectural transcription factors: proteins that remodel DNA / M. H. Werner, S. K. Burley // Cell. – 1997. – V. 88, № 6. P. 733-736.

74. Arnosti D. N. Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? / D. N. Arnosti, M. M. Kulkarni // J. Cell. Biochem. – 2005. – V. 94, № 5. – P. 890–898.
75. Calo E. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? / E. Calo, J. Wysocka // Mol. Cell. – 2013. – V. 49, № 5. – P. 825–837.
76. Bulger M. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. / M. Bulger, M. Groudine // Cell. – 2011. – V. 144, № 3. – P. 327–339.
77. Smallwood A. Genome organization and long-range regulation of gene expression by enhancers / A. Smallwood, B. Ren // Curr. Opin. Cell Biol. – 2013. – V. 25, № 3. – P. 387–394.
78. Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation / M. Bevan // Nucleic Acids Res. – 1984. – V. 12, № 22. – P. 8711-8721.
79. Ellis J. G. The ocs element: a 16 base pair palindrome essential for activity of the octopine synthase enhancer / J. G. Ellis, D. J. Lewellyn, J. C. Walker [et al.] // EMBO J. – 1987. – V. 6, № 11. – P. 3203-3208.
80. An G. Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible / G. An, M. A. Costa, S. B. Ha // Plant Cell. – 1990. - V. 2, № 3. – P. 225-233.
81. Kim S. R. Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter / S. R. Kim, Y. Kim, G. An // Plant Physiol. – 1993. – V. 103, № 1. – P. 97-103.
82. Dai Z. Induction of nopaline synthase promoter activity by H₂O₂ has no direct correlation with salicylic acid / Z. Dai, G. An // Plant Physiol. - 1995 – V. 109, № 4. – P. 1191-1197.
83. Zhang B. Ocs element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis* / B. Zhang, K. B. Singh // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1994. – V. 91, № 7. – P. 2507-2511.
84. Franck A. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA / A. Franck, H. Guilley, G. Jonard [et al.] // Cell. – 1980. – V. 21, № 1. – P. 285–294.

85. Guilley H. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: detection of promoter sequences, and characterization of transcripts / H. Guilley, R. K. Dudley, G. Jonard [et al.] // Cell. – 1982. – V. 30, № 3. – P. 763–73.
86. Odell J. T. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter / J. T. Odell, F. Nagy, N. H. Chua // Nature. – 1985. – V. 313, № 6005. – P. 810–812.
87. Sanders P. R. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants / P. R. Sanders, J. A. Winter, A. R. Barnason [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1987. – V. 15, № 4. – P. 1543–1558.
88. Fang R. X. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants / R. X. Fang, F. Nagy, S. Sivasubramaniam // Plant Cell. – 1989. – V. 1, № 1. – P. 141–150.
89. Benfey P. N. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development / P. N. Benfey, L. Ren, N. H. Chua // EMBO J. – 1990. – V. 9, № 6. – P. 1677–1684.
90. Lam E. Site specific mutations alter *in vitro* factor and change promoter expression pattern in transgenic plants / E. Lam, P. N. Benfey, P. Gilmartin [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1989. – V. 86, № 20. – P. 7890–7894.
91. Lam E. Analysis of tissue-specific elements in the CaMV 35S promoter / E. Lam // Results Probl. Cell Differ. – 1994. – V. 20. – P. 181–196.
92. Bouchez D. The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes / D. Bouchez, J. G. Tokuhsa, D. J. Llewellyn [et al.] // EMBO J. – 1989. – V. 8, № 13. – P. 4197–4204.
93. Kay R. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes / R. Kay, A. Chan, M. Daly, J. McPherson // Science. – 1987. – V. 236, № 4806. – P. 1299–1302.
94. Sanger M. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus

- and the regulated mannopine synthase promoter / M. Sanger, S. Daubert, R. M. Goodman // *Plant Mol Biol.* – 1990. – V. 14, № 3. – P. 433-443.
95. Dey N. Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants / N. Dey, I. B. Maiti // *Plant Mol Biol.* – 1999. – V. 40, № 5. – P. 771-782.
 96. Pattanaik S. Isolation of full-length transcript promoter from the strawberry vein banding virus (SVBV) and expression analysis by protoplasts transient assays and in transgenic plants / S. Pattanaik, N. Dey, S. Bhattacharyya [et al.] // *Plant Sci.* – 2004. – V. 167. – P. 427–438.
 97. Samac D. A. A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*) / D. A. Samac, M. Tesfaye, M. Dornbusch [et al.] // *Transgenic Res.* – 2004. – V. 13, № 4. – P. 349–361.
 98. Кулуев Б. Р. Активность промоторов вируса кольцевой гравировки гвоздики и вируса мозаики георгина в потопластах и трансгенных растениях табака / Б. Р. Кулуев, А. В. Князев, А. В. Чемерис // *Физиология растений.* – 2008. – Т. 55, № 5. – С. 763–770.
 99. Mehrotra R. Designer promoter: an artwork of cis engineering / R. Mehrotra, G. Gupta, R. Sethi [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2011. - V. 75, № 6. – P. 527-536.
 100. Venter M. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering / M. Venter // *Trends Plant Sci.* – 2007. - V. 12, № 3. – P. 118-124.
 101. Jefferson R. A. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants / R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, M. W. Bevan // *EMBO J.* – 1987. – V. 6, № 13. - P. 3901–3907.
 102. Leisner S. M. Structure of the octopine synthase upstream activator sequence / S. M. Leisner, S. B. Gelvin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1988. – V. 85, № 8. – P. 2553–2557.
 103. DiRita V. J. Deletion analysis of the mannopine synthase gene promoter in sunflower crown gall tumors and *Agrobacterium tumefaciens* / V. J. DiRita, S. B. Gelvin // *Mol. Gen. Genet.* – 1987. – V. 207, № 2-3. – P. 233–241.

104. Comai L. Novel and useful properties of a chimeric plant promoter combining CaMV 35S and MAS elements / L. Comai, P. Moran, D. Maslyar // *Plant Mol Biol.* – 1990. – V.15, № 3. – P. 373–381.
105. Mitsuhashi I. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants / I. Mitsuhashi, M. Ugaki, H. Hirochika [et al.] // *Plant Cell Physiol.* – 1996. – V. 37, № 1. – P. 49–59.
106. Ni M. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes / M. Ni, D. Cui, J. Einstein [et al.] // *The Plant Journal.* – 1995. – V. 7, № 4. – P. 661–676.
107. Cazzonelli C. I. In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters / C. I. Cazzonelli, J. Velten // *Transgenic Res.* – 2008. – V. 17, № 3. – P. 437–457.
108. Bhullar S. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel DNA context versus domain swapping / S. Bhullar, S. Chakravarthy, S. Advani [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 132, № 2. – P. 988–998.
109. Acharya S. Efficient chimeric plant promoters derived from plant infecting viral promoter sequences / S. Acharya, R. Ranjan, S. Pattanaik [et al.] // *Planta.* – 2014. – V. 239, № 2. – P. 381–396.
110. Acharya S. Development of an intra-molecularly shuffled efficient chimeric plant promoter from plant infecting Mirabilis mosaic virus promoter sequence / S. Acharya, S. Sengupta, S. Patro [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2014. – V. 169. – P. 103–111.
111. Aoyama T. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants / T. Aoyama, N. H. Chua // *Plant J.* – 1997. – V. 11, № 3. – P. 605–612.

112. Bruce W. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P / W. Bruce, O. Folkerts, C. Garnaat [et al.] // *Plant Cell*. – 2000. – V. 12, № 1. – P. 65–79.
113. Martinez A. Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants / A. Martinez, C. Sparks, C. A. Hart [et al.] // *Plant J*. – 1999. – V. 19, № 1. – P. 97–106.
114. Caddick M. X. An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism / M. X. Caddick, A. J. Greenland, I. Jepson [et al.] // *Nat Biotechnol*. – 1998. – V. 16, № 2. – P. 177–180.
115. Roslan H. A. Characterization of the ethanol-inducible *alc* gene-expression system in *Arabidopsis thaliana* / H. A. Roslan, M. G. Salter, C. D. Wood [et al.] // *Plant J*. – 2001. – V. 28, № 2. – P. 225–235.
116. Rushton P. J. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling / P. J. Rushton, A. Reinstädler, V. Lipka [et al.] // *Plant Cell*. – 2002. – V. 14, № 4. – P. 749-762.
117. Kumar D. Development of a salicylic acid inducible minimal sub-genomic transcript promoter from Figwort mosaic virus with enhanced root- and leaf-activity using TGACG motif rearrangement / D. Kumar, S. Patro, J. Ghosh [et al.] // *Gene*. – 2012. – V. 503, № 1. – P. 36-47.
118. Sahoo D. K. Comparative analysis of synthetic DNA promoters for high-level gene expression in plants / D. K. Sahoo, S. Sarkar, S. Raha // *Planta*. – 2014. – V. 240, № 4. – P. 855-875.
119. Higo K. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 / K. Higo, Y. Ugawa, M. Iwamoto, T. Korenaga // *Nucleic Acids Res*. – 1999. – V. 27, № 1. – P. 297-300.
120. Lescot M. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences / M. Lescot, P. Déhais, G. Thijs // *Nucleic Acids Res*. – 2002. – V. 30, № 1. – P. 325-327.

121. An Y. Q. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues / Y. Q. An, J. M. McDowell, S. Huang [et al.] // Plant J. – 1996. – V. 10, № 1. – P. 107–121.
122. McElroy D. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation / D. McElroy, W. Zhang, J. Cao, R. Wu // Plant Cell. – 1990. – V. 2, № 2. – P. 163-171.
123. Zhang W. Analysis of rice Act1 50 region activity in transgenic rice plants / W. Zhang, D. McElroy, R. Wu // Plant Cell. – 1991. – V. 3, № 11. – P. 1155–1165.
124. Weeks J. T. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) / J. T. Weeks, O. D. Anderson, A. E. Blechl // Plant Physiol. – 1993. – V. 102, № 4. – P. 1077–1084.
125. Gupta P. Assessment of the efficiency of various gene promoters via biolistics in leaf and regenerating seed callus of millets, *Eleusine coracana* and *Echinochloa crusgalli* / P. Gupta, S. Raghuvanshi, A. K. Tyagi // Plant Biotechnol. – 2001. – V. 18, № 4. – P. 275–282.
126. Cornejo M. J. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice / M. J. Cornejo, D. Luth, K. M. Blankenship [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1993. – V. 23, № 3. – P. 567–581.
127. Teeri T. H. Identifikation of plant promoters *in situ* by T-DNA mediated transcriptional fusion to the *nptII* gene / T. H. Teeri, L. Herrera-Estella, A. Depiker [et al.] // EBO J. – 1986. – V. 5, № 8. – P. 1755–1760.
128. Koncz C. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants / C. Koncz, N. Martin, R. Mayerhofer [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1989. – V. 86, № 21. – P. 8467–8471.
129. Herman L. Plant chromosome/marker gene fusion assay for study of normal and truncated T-DNA integration events / L. Herman, A. Jacobs, M. Van Montagu [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1990. – V. 224, № 2. – P. 248–256.

130. Kertbundit S. In vivo random β -glucuronidase gene fusion in *Arabidopsis thaliana* / S. Kertbundit, H. De Greve, F. De Boek [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88, № 12. – P. 5212–5216.
131. Jiang C. Identification of gene in vivo by tagging with T-DNA border linked luciferase genes followed by inverse polymerase chain reaction amplification / C. Jiang, W. H. R. Langridge, A. A. Szalay // Plant. Mol. Biol. Rep. – 1992 – V. 10, № 4 – P. 345–361.
132. Alvarado M. C. Gene trapping with firefly luciferase in *Arabidopsis*. Tagging of stress-responsive genes / M. C. Alvarado, L. M. Zsigmond, I. Kovács [et al.] // Plant Physiol. – 2004. – V. 134, № 1. – P. 18–27.
133. Srinivasan R. Promoter trapping in plant using T-DNA mutagenesis / R. Srinivasan, D. Saha // Molecular Techniques in Crop Improvement: 2nd Edition ; [ed. by S. M. Jain, D. S. Brar]. - Springer Science & Business Media, 2010. – P. 545-577 – ISBN 978-90-481-2966-9.
134. Topping J. F. Functional tagging of regulatory elements in the plant genome / J. F. Topping, W. Wei, K. Lindsey // Development. - 1991. – V. 112, № 4. – P. 1009-1019.
135. Fobert P. R. T-DNA tagging of a seed coat-specific cryptic promoter in tobacco / P. R. Fobert, H. Labbe, J. Cosmopolous [et al.] // Plant J. – 1994. – V. 6, № 4. – P. 567–577.
136. Wei W. A novel nucleic acid helicase gene identified by promoter trapping in *Arabidopsis* / W. Wei, D. Twell, K. Lindsey // Plant J. – 1997. – V. 11, № 6. – P. 1307-1314.
137. Foster P. R. A tobacco cryptic constitutive promoter, tCUP, revealed by T-DNA tagging / P. R. Foster, J. Hattori, H. Labbe [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1999. – V. 41, № 1. – P. 45–55.
138. Puzio P. S. Promoter analysis of *pyk20*, a gene from *Arabidopsis thaliana*. P. S. Puzio, J. Lausen, P. Heinen, F. M. Grundler // Plant Sci. – 2000. – V. 157, № 2. – P. 245-255.

139. Mollier P. Tagging of a cryptic promoter that confers root-specific *gus* expression in *Arabidopsis thaliana* / P. Mollier, B. Hoffmann, M. Orsel, G. Pelletier // Plant Cell Rep. – 2000. – V. 19, № 11. – P. 1076-1083
140. Plesch G. Cloning of regulatory sequences mediating guard-cell-specific gene expression / G. Plesch, E. Kamann, B. Mueller-Roeber // Gene. – 2000. – V. 249, № 1–2. – P. 83–89.
141. Webb K. J. Mesorhizobium loti increases root-specific expression of a calcium-binding protein homologue identified by promoter tagging in *Lotus japonicus* / K. J. Webb, L. Skot, M. N. Nicholson [et al.] // Mol. Plant Microbe Interact. – 2000. – V. 13, № 6. – P. 606-616.
142. DeGreve H. TDNA tagging of the translation initiation factor eIF-4A1 of *Arabidopsis thaliana* / H. DeGreve, V. K. Nguyen, F. Deboeck [et al.] // Plant Science. – 2001. - V. 161, № 4, P. 685-693.
143. Custers J. H. T-DNA tagging of a pathogen inducible promoter in *Arabidopsis thaliana* / J. H. Custers, L. S. Melchers, H. Tigelaar [et al.] // Mol. Plant Pathol. – 2002. – V. 3, № 4. - P. 239-249.
144. Farrar K. EXORDIUM--a gene expressed in proliferating cells and with a role in meristem function, identified by promoter trapping in *Arabidopsis* / K. Farrar, I. M. Evans, J. F. Topping [et al.] // Plant J. – 2003. – V. 33, № 1. – P. 61-73.
145. Sivanandan C. T-DNA tagging and characterization of a cryptic root-specific promoter in *Arabidopsis* / C. Sivanandan, T. P. Sujatha, A. M. Prasad [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1731, № 3. – P. 202-208.
146. Prasad A. M. Cloning and characterization of a pentatricopeptide protein encoding gene (LOJ) that is specifically expressed in lateral organ junctions in *Arabidopsis thaliana* / A. M. Prasad, C. Sivanandan, R. Resminath [et al.] // Gene. – 2005. – V. 353, № 1. – P. 67-79.
147. Thakare D. R. Molecular and histochemical analysis of a T-DNA tagged mutant of *arabidopsis* exhibiting anther-specific GUS expression /

- D. R. Thakare, R. Resminath, N. J. Chikhale [et al.] // J. Plant Biochemistry & Biotechnology. - 2006, V. 15, № 1. – P. 7-13.
148. Buzas D. M. Promoter trapping in *Lotus japonicus* reveals novel root and nodule GUS expression domains. / D. M. Buzas, D. Lohar, S. Sato, // Plant Cell Physiol. – 2005. – V. 46, № 8. – P. 1202-1212.
 149. Irniger S. The yeast actin intron contains a cryptic promoter that can be switched on by preventing transcriptional interference / S. Irniger, C. M. Egli, M. Kuenzler [et al.] // Nucleic Acids Res. –1992. – V. 20, № 18. – P. 4733–4739.
 150. Kapoun A. M. A functional analysis of 5', intronic and promoter regions of the homeotic gene proboscipedia in *Drosophila melanogaster* / A. M. Kapoun, T. C. Kaufman // Development. – 1995. - V. 121, № 7. – P. 2127-2141.
 151. Palmer C. N. Interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha with the retinoid X receptor alpha unmasks a cryptic peroxisome proliferator response element that overlaps an ARP-1-binding site in the CYP4A6 promoter / C. N. Palmer, M. H. Hsu, A. S. Muerhoff [et al.] // J. Biol. Chem. – 1994. – V. 269, № 27. – P. 18083–18089.
 152. Troyanovsky S. M. Activation of the silent human cytokeratin 17 pseudogene-promoter region by cryptic enhancer elements of the cytokeratin 17 gene // S. M. Troyanovsky, R. E. Leube // Eur. J. Biochem. – 1994. – V. 225, № 1. – P. 61-69.
 153. Tee M. K. A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 kb RNA: location of a cryptic CYP21 promoter element / M. K. Tee, G. O. Babalola, P. Aza-Blanc [et al.] // Hum. Mol. Genet. – 1995. – V. 4, № 11. – P. 2109–2116.
 154. Wu K. The cryptic enhancer elements of the tCUP promoter / K. Wu, M. Hu, T. Martin [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2003. – V. 51, № 3. – P. 351–362.

155. Malik K. A constitutive gene expression system derived from the tCUP cryptic promoter elements / K. Malik, K. Wu, X. Q. Li [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2002. – V. 105, № 4. – P. 505-514.
156. Zhou J. Enhanced transgene expression in rice following selection controlled by weak promoters [Електронний ресурс] / J. Zhou, Y. Yang, X. Wang [et al.] // BMC Biotechnol. – 2013. – V. 13, № 29. – Режим доступу: <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/13/29>
157. Pratibha P. Characterization of a T-DNA promoter trap line of *Arabidopsis thaliana* uncovers a cryptic bi-directional promoter / P. Pratibha, S. K. Singh, I. Sharma [et al.] // Gene. – 2013. – V. 524, № 1. – P. 22-27.
158. Щербак Н. Л. Генетическая трансформация растений *Nicotiana africana* Мерхт. плазмидами, содержащими сайты рекомбинации *lox* / Н. Л. Щербак, В. Б. Белокурова, И. К. Комарицкий, Н. В. Кучук // Цитология и генетика. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 3 – 8.
159. Щербак Н. Л. Изучение влияния *lox*-сайтов Cre *lox* системы рекомбинации на экспрессию беспромоторного *bar* гена в трансгенных растениях / Н. Л. Щербак, В. Б. Белокурова, И. О. Гецко [и др.] // Цитология и генетика. – 2006. – Т. 40, № 1. – С. 3 – 9.
160. Shcherbak N. *Lox*-dependent gene expression in transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation / N. Shcherbak, O. Kishchenko, L. Sakhno [et al.] // Cytol Genet. – 2013. – V. 47, № 3. – P. 145 –155.
161. Щербак Н. Л. Дослідження *lox* опосередкованої експресії *gus* гену в трансгенних рослинах тютюну / Н. Л. Щербак, М. В. Кучук // Вісник ХНАУ Сер. Біологія. – 2015. – Вип. 1, № 34. – С. 28-36.
162. Pelletier J. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA / J. Pelletier, N. Sonenberg // Nature. – 1988. – V. 334, № 6180. – P. 320–325.
163. Jang S. K. A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation /

- S. K. Jang, H. G. Krausslich, M. J. Nicklin [et al.] // J. Virol. – 1988. – V. 62, № 8. – P. 2636–2643.
164. Macejak D. G. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA / D. G. Macejak, P. Sarnow // Nature. – 1991. – V. 353, № 6339. – P. 90–94.
 165. Urwin P. Functional characterization of the EMCV IRES in plants / P. Urwin, L. Yi, H. Martin [et al.] // Plant J. – 2000. – V. 24, № 5. – P. 583–589.
 166. Dorokhov Y. L. Polypurine (A)-rich sequences promote cross-kingdom conservation of internal ribosome entry / Y. L. Dorokhov, M. V. Skulachev, P. A. Ivanov [et al.] // PNAS. – 2002. – V. 99, № 8. – P. 5301–5306.
 167. Processes and vectors for producing of transgenic plants : U.S. patent №.: US 7,652,194 B2 / Yu. Gleba, V. Klimyuk, G. Benning, S. Eliby ; assignee : Icon Genetics GmbH, Munich (DE). - PCT Pub. №.: W002/46440 ; filed 7.12.2001 ; pub. date 13. 6.2002.
 168. Boulikas T. Chromatin domains and prediction of MAR sequences / T. Boulikas // Int. Rev. Cytol. – 1995. – V. 162A. – P. 279–388.
 169. Allen G. C. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing / G. C. Allen, S. Spiker, W. F. Thompson // Plant Mol. Biol. – 2000. – Jun. – V. 43, № 2–3. – P. 361–76.
 170. Bode J. Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci / J. Bode, T. Schlake, M. Ríos-Ramírez // Int. Rev. Cytol. – 1995. – V. 162A. – P. 389–454.
 171. Allen G. C. Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells / G. C. Allen, G. E. Hall, L. C. Childs [et al.] // Plant Cell. – 1993. – V. 5, № 6. – P. 603–613.
 172. Van der Geest A. H. M. The b-phaseolin gene is flanked by matrix attachment regions / A. H. M. Van der Geest, G. E. Hall Jr, S. Spiker, T. S. Hall // Plant J. – 1994. – V. 6, № 3. – P. 413–423.
 173. Avramova Z. Matrix attachment regions and transcribed sequences within a long chromosomal continuum containing maize Adh1 / Z. Avramova, P. San

- Miguel, E. Georgieva [et al.] // *Plant Cell*. – 1995. – V. 7, № 10. – P. 1667–1680.
174. Allen G. C. High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco / G. C. Allen, G. E. Hall Jr, S. Michalowski [et al.] // *Plant Cell*. – 1996. – V. 8, № 5. – P. 899–913.
 175. Cheng Z. Tobacco matrix attachment region sequence increased transgene expression levels in rice plants / Z. Cheng, J. Targolli, R. Wu // *Mol. Breeding*. – 2001. – V. 7, № 4. – P. 317–327.
 176. Abranches R. Matrix attachment regions and regulated transcription increase and stabilize transgene expression / R. Abranches, R. W. Shultz, W. F. Thompson [et al.] // *Plant Biotechnol J*. – 2005. – V. 3, № 5. – P. 535–543.
 177. Halweg C. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: a flow cytometric study / C. Halweg, W. F. Thompson, S. Spiker // *Plant Cell*. – 2005. – V. 17, № 2. – P. 418–429.
 178. Sidorenko L. Functional analysis of two matrix attachment region (MAR) elements in transgenic maize plants / L. Sidorenko, W. Bruce, S. Maddock [et al.] // *Transgenic Res*. – 2003. – V. 12, № 2. – P. 137–154.
 179. Chung J. H. A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila* / J. H. Chung, M. Whiteley, G. Felsenfeld // *Cell*. – 1993. – V. 74, № 3. – P. 505–514.
 180. Kellum R. A group of scs elements function as domain boundaries in an enhancer-blocking assay / R. Kellum, P. Schedl // *Mol. Cell. Biol*. – 1992. – V. 12, № 5. – P. 2424–2431.
 181. Ishii K. Chromatin boundaries in budding yeast: the nuclear pore connection / K. Ishii, G. Arib, C. Lin [et al.] // *Cell*. – 2002. – V. 109, № 5. – P. 551–562.

182. Kellum R. A position-effect assay for boundaries of higher order chromosomal domains / R. Kellum, P. Schedl // *Cell*. – 1991. – V. 64, № 5. – P. 941–950.
183. Stief A. A nuclear DNA attachment element mediates elevated and position-independent gene activity / A. Stief, D. M. Winter, W. H. Stratling [et al.] // *Nature*. – 1989. – V. 341, № 6240. – P. 343–345.
184. Nabirochkin S. A nuclear matrix/scaffold attachment region co-localizes with the gypsy retro-transposon insulator sequence / S. Nabirochkin, M. Ossokina, T. Heidmann // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273, № 4. – P. 2473–2479.
185. Hily J. M. A transformation booster sequence (TBS) from *Petunia* hybrid functions as an enhancer-blocking insulator in *Arabidopsis thaliana* / J. M. Hily, S. D. Singer, Y. Yang [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2009. – V. 28, № 7. – P. 1095–1104.
186. Dale E. C. Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase / E. C. Dale, D. W. Ow // *Gene*. – 1990. – V. 91, № 1. – P. 79–85.
187. Medberry S. L. Intra-chromosomal rearrangements generated by Cre-lox site-specific recombination / S. L. Medberry, E. Dale, M. Qin, D. W. Ow // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – V. 23, № 3. – P. 485–490.
188. Stuurman J. Single-site manipulation of tomato chromosomes in vitro and in vivo using Cre-lox site specific recombination / J. Stuurman, M. J. de Vroomen, H. J. J. Nijkamp [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1996. – V. 32, № 5. – P. 901–913.
189. Gilbertson L. Cre-lox recombination: Cre-active tools for plant biotechnology / L. Gilbertson // *Trends Biotechnol.* – 2003. – V. 21, № 12. – P. 550–555.
190. Coppoolse E. R. Size does matter: Cre-mediated somatic deletion efficiency depends on the distance between the target lox-sites / E. R. Coppoolse, M. J. Vroomen, F. Gennip [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – V. 58, № 5. – P. 687–698.

191. Осташ Б. Сайт-специфічні рекомбінази у генетичній інженерії: новітні технології *in vivo* / Б. Осташ // Цитология и генетика. - 2010. – Т. 44, № 4. - С. 61-69.
192. Hoess R. H. Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system / R. H. Hoess, K. J. Abremski // Mol Biol. – 1985. – V. 181, № 3. – P. 351-362.
193. Hoess R. H. The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination / R. H. Hoess, A. Wierzbicki, K. J. Abremski // Nucleic Acids Res. – V. 14, № 5. - P. 2287-2300.
194. Рукавцова Е. Б. Пути создания биобезопасных трансгенных безмаркерных растений / Е. Б. Рукавцова, А. А. Лебедева, Н. С. Захарченко [и др.] // Физиология растений. – 2013. - Т. 60, № 1. – С. 17–30.
195. Miki B. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety / B. Miki, S. McHugh // J. Biotechnol. – 2004. – V. 107, № 3. – P. 193-232.
196. Dale E. C. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome / E. C. Dale, D. W. Ow // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88, № 23. – P. 10558–10562.
197. Zuo J. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic Plants / J. Zuo, Q.-W. Niu, S.G. Moller [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2001. – V. 19, № 2. – P. 157–161.
198. Kebrach S. Site-specific recombination in *Zea mays* / S. Kebrach, H. Lorz, D. Becker // Theor. Appl. Genet. – 2005. – V. 111, № 8. – P. 1608–1616.
199. Li Z. A Cre/loxP mediated self-activating gene excision system to produce marker gene free transgenic soybean plants / Z. Li, A. Xing, B.P. Moon [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2007. – V. 65, № 3. – P. 329–341.
200. Cuellar W. Self-excision of the antibiotic resistance gene *nptII* using a heat inducible Cre-loxP system from transgenic potato / W. Cuellar, A. Gaudin, D. Solorzano [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2006. – V. 62, № 1-2. – P. 71–82.

201. Ma B. G. Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using Salicylic acid-inducible Cre/loxP recombination system with self-excision of selectable marker / B. G. Ma, X. Y. Duan, J. X. Niu [et al.] // Biotechnol. Lett. – 2009. – V. 31, № 1. – P. 163–169.
202. Cao B. Restoring pollen fertility in transgenic male-sterile eggplant by Cre/loxP-mediated site-specific recombination system / B. Cao, Z. Huang, G. Chen [et al.] // Genet. Mol. Biol. – 2010. – V. 33, № 2. – P. 298–307.
203. Gleave A. P. Selectable marker-free transgenic plant without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene / A. P. Gleave, D. S. Mitra, S. Mudge [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1999. – V.40, № 2. – P. 223–235.
204. Lutz K. A. Plastid marker-gene excision by transiently expressed CRE recombinase / K. A. Lutz, M. H. Bosacchi, P. Maliga // Plant J. – 2006. – V. 45, № 3. – P. 447-456.
205. Lutz K. A. Construction of marker-free transplastomic plants / K. A. Lutz, P. Maliga // Curr. Opin. Biotechnol. – 2007. - V. 18, № 2. – P. 107-114.
206. Kopertekh L. Regulated site-specific marker gene excision in transgenic *B. napus* plants / L. Kopertekh, I. Broer, J. Schiemann // Plant Cell Rep. - 2009. - V. 28, № 7. - P. 1075–1083.
207. Kopertekh L. Cre-Mediated Seed-Specific Transgene Excision in Tobacco / L. Kopertekh, K. Schulze, A. Frolov [et al.] // Plant Mol. Biol. - 2010. - V. 72, № 6. - P. 597–605.
208. Ow D.W. GM Maize from Site-Specific Recombination Technology, What Next? // Curr. Opin. Biotechnol. - 2007. - V. 18, № 2. - P. 115–120.
209. Секан А. С. Одноетапне отримання трансформантів *Arabidopsis thaliana*, вільних від маркерних послідовностей, за допомогою сайт-специфічної рекомбіназної системи Cre/loxP під контролем мінімального 35S промотору / А. С. Секан, С. В. Ісаєнков // Доповіді НАН України. – 2014. – № 3. – С. 158–163.

210. Sekan A.S. Transformation effectiveness for *Arabidopsis thaliana* plants by DNA-constructions with site-specific recombinase system Cre/loxP / A.S. Sekan, S.V. Isaenkov // *Biotechnologia Acta*. – 2015. V. 8, № 1. – P. 49-55.
211. Albert H. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome / H. Albert, E. C. Dale, E. Lee [et al.] // *The Plant J*. – 1995. – V.7, № 4. – P. 649–659.
212. Day C. D. Transgene integration into the same chromosome location can produce alleles that express at a predictable level, or alleles that are differentially silenced / C. D. Day, E. Lee, J. Kobayashi [et al.] // *Genes Dev* – 2000. – V. 14, № 22. – P. 2869–2880.
213. Srivastava V. Biolistic mediated site-specific integration in rice / V. Srivastava, D. W. Ow // *Mol. Breed*. – 2002. – V. 8, № 4. P. 345–350.
214. Srivastava V. Cre-mediated site-specific gene integration for consistent transgene expression in rice / V. Srivastava, M. Ariza-Nieto, A. J. Wilson // *Plant Biotechnol. J.* - 2004. – V. 2, № 2. – P. 169–179.
215. Vergunst C. A. Cre/lox – mediated site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of cre / C. A. Vergunst, P. J. J. Hooykaas // *Plant Mol. Biol.* – 1998. – V. 38, № 3. – P. 393–406.
216. Nanto K. *Agrobacterium*-mediated RMCE approach for gene replacement / K. Nanto, K. Yamada-Watanabe, H. Ebinuma // *Plant Biotechnol. J.* -2005. – V. 3, № 2. – P. 203–214.
217. Nanto K. Marker-free site-specific integration in plants / K. Nanto, H. Ebinuma // *Transgenic Res*. – 2008. – V. 17, № 3. P. 337-344.
218. Lee G. Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination / G. Lee, I. Saito // *Gene*. – 1998. – V. 216. - № 1. – P. 55–65.
219. Louwerse J. D. Stable recombinase-mediated cassette exchange in *Arabidopsis* using *Agrobacterium tumefaciens* // J. D. Louwerse,

- M. C. van Lier, D. M. van der Steen [et al.] // Plant Physiol. – 2007. – V. 145, № 4. – P. 1282-1293.
220. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* / G. Bertani // J. Bacteriol. - 1951. – V. 62, № 3. - P. 293–300.
221. Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.) / J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis. - New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. - ISBN 0-87969-309-6.
222. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plantarum. – 1962. – V.15, № 3. - P. 473-497.
223. Gamborg O. L. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley / O. L. Gamborg, D. E. Eveleigh // Can. J. Biochem. – 1968. – V. 46, № 5. – P. 417 – 421.
224. Michelmore R. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / R. Michelmore, E. Marsh, S. Seely, B. Landry // Plant Cell Rep. – 1987. – V. 6, № 6. - P. 439-442.
225. Kishchenko E. M. Production of transgenic sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin / E. M. Kishchenko, I. K. Komarnitskii., N. V. Kuchuk // Cell Biol. Int. - 2005. – V. 29, № 1. – P. 15-19.
226. Christou P. Strategies for variety-independent genetic transformation of important cereals, legumes and woody species utilizing particle bombardment // Euphytica. – 1995. V. 85, № 1. – P. 13–27.
227. Армитидж Ф. Выделение тотальных препаратов нуклеиновых кислот из *A. tumefaciens* / Ф. Армитидж, Р. Уолден, Дж. Дрейпер // Генная инженерия растений. Лабораторное руководство: Пер. с англ./ Под ред. Дж. Дрейпера, Р. Скота, Ф. Армитидж, Р. Уолден. – М.: Мир. - 1991. - С. 76-78. ISBN 5-03-0011854-9

228. Logemann J. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues / J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer // *Annal. Biochem.* – 1987. – V.163, № 1. – P. 16–20.
229. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* - 1976. - № 72. - P. 248-254.
230. Schöb H. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing / H. Schöb, C. Kunz, F. Meins Jr // *Mol Gen Genet.* – 1997. – V. 256, № 5. –P. 581-585.
231. Marillonnet S. *In planta* engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium* / S. Marillonnet, A. Giritch, M. Gils [*et al.*] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2004. – V. 101, № 18 – P. 6852–6857.
232. Qiu W. Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity / W. Qiu, J. W. Park, H. B. Scholthof // *Mol. Plant Microbe Interact.* – 2002. – V. 15, № 3. – P. 269-280.
233. Voinnet O. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus / O. Voinnet, S. Rivas, P. Mestre, D. Baulcombe // *Plant J.* – 2003. – V. 33, № 5. – P. 949–956.
234. Лакин Г. Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1980. – 293 с. – ИВ № 2319.
235. Merxmüller H. *Nicotiana* in der afrikanischen Namib - ein pflanzengeographisches und phylogenetisches ratsel / H. Merxmüller, K. P. Buttler // *Mitt. Bot. München.* – 1975. – №.12. – P. 91–104.
236. Gerstel D. U. Interspecific hybridizations with an African tobacco, *Nicotiana africana* Merxm / D. U. Gerstel, J. A. Burns, L. G. Burk // *J. Hered.* – 1979. – V. 70, № 5. – P. 342–344.

237. Kumashiro T. A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtained by fusion between *Nicotiana tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts / T. Kumashiro, T. Asahi, T. Komari // *Plant Sci.* – 1988. – V. 55, № 3. – 247–254.
238. Nikova V. M. Overcoming hybrid incompatibility between *Nicotiana africana* Merxm. and *N. tabacum* and development of cytoplasmically male sterile tobacco forms / V. M. Nikova, N. A. Zagorska // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1990. – V. 23, № 1. – P. 71–75.
239. Doroszevska T. Transfer of tolerance to different Potato virus Y (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. / T. Doroszevska // *Plant Breeding.* -2009. - V. 129, № 1. – P. 76–81.
240. Rakosy-Tican L. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Nicotiana africana* / L. Rakosy-Tican, L. Menczel // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 1998. – V. 54, № 2. – P. 93–95.
241. Horsh R. B. A simple and general method for transferring genes into plants / R. B. Horsh, J. E. Fry, N. L. Hoffmann [et al.] // *Science.* – 1985. – V. 227, № 4691. – P. 1229–1231.
242. McCormick S. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) usng *Agrobacterium tumefaciens* / S. McCormick, J. Niedermeyer, J. Fry [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1986. – V. 5, № 2. – P. 81–84.
243. Белокурова В. Б. Регенерация *in vitro* растений *Nicotiana africana* из эксплантов разного типа и мезофильных протопластов / В. Б. Белокурова, И. С. Головач, Н. Л. Щербак, Н. В. Кучук // *Цитология и генетика.* – 2004. – Т. 38, № 3. – С. 9–16.
244. Hauptman R. M. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformation in the Gramineae / R. M. Hauptman, V. Vasil, P. Ozias-Akins [et al.] // *Plant Physiol.* – 1988. – V. 86, № 2. – P. 602–606.
245. Colby S. M. Kanamycin sensivity of cultured tissues of *Vitis* / S. M. Colby, C. P. Meredith // *Plant Cell Rep.* – 1990. – V. 9, № 5. – P. 237–240.

246. Charest P. J. Agrobacterium-mediated transformation of thin layer explants from *Brassica napus* L. / P. J. Charest, L. A. Molbrook, J. Gabard [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1988. – V. 75, № 3. – P. 438–445.
247. Schmit F. Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants / F. Schmit, E. J. Oakeley, J. P. Jost // J. Biol. Chem. – 1997. – V. 272, № 3. – P. 1534–1540.
248. Ryu C. H. Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database / C. H. Ryu, J. H. You, H. G. Kang [et al.] // Plant Mol. Biol. – 2004. – V. 54, № 4. – P. 489–502.
249. Alvarado M. C. Gene trapping with firefly luciferase in Arabidopsis. Tagging of stress-responsive genes / M. C. Alvarado, L. M. Zsigmond, I. Kovacs [et al.] // Plant Physiol.- 2004. – V. 134, № 1. - P. 18–27.
250. De Block M. D. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme / M. D. Block, J. Botterman , M. Vandewiele [et al.] // EMBO J. – 1987. – V. 6, № 9. - P. 2513-2518.
251. Hoerlein G. Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties / G. Hoerlein // Rev. Environ. Contam. Toxicol. – 1994. – V. 138. – P. 73-145.
252. Сахно Л. А. Стабильная экспрессия беспромоторного гена *bar* в трансформированных растениях рапса / Л. А. Сахно, Е. А. Гочева, И. К. Комарницкий, Н. В. Кучук // Цитология и генетика. – 2008. – Т. 42, № 1. – С. 21–28.
253. Omirulleh S. Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize / S. Omirulleh, M. Abraham, M. Golovkin [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1993. – V. 21, № 3. – P. 415–428.
254. Guivarc'h A. *In situ* detection of expression of the *gus* reporter gene in transgenic plants: ten years of blue gene / A. Guivarc'h, J. C. Caissard, A. Azmi [et al.] // Transgenic Research. – 1996. – V. 5, № 5. – P. 281–288.

255. Abumhadi N. Development of the particle inflow gun and optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation in mature embryos of cereals / N. Abumhadi, A. Trifonova, S. Takumi [et al.] // *Biotech. Equip.* – 2001. – V. 15, № 2. – P. 87–96.
256. Vasil I. K. Transformation of wheat via particle bombardment / I. K. Vasil, V. Vasil // *Methods Mol. Biol.* – 2006. – V. 318. – P. 273–283.
257. Register J. C. Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment / J. C. Register, D. J. Peterson, P. J. Bell [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1994. – V. 25, № 6. – P. 951–961.
258. Shou H. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation / H. Shou, B. R. Frame, S. A. Whitham [et al.] // *Molecular Breeding.* – 2004. – V. 13, № 2. – P. 201–208.
259. Pawlowski W. P. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment / W. P. Pawlowski, D. A. Somers // *Mol. Biotechnol.* – 1996. – V. 6, № 1. – P. 17–30.
260. Prasher D. C. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein / D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward [et al.] // *Gene.* – 1992. – V. 111, № 2. – P. 229–233.
261. Leffell S. M. Applications of green fluorescent protein in plants / S. M. Leffell, S. A. Mabon, C. N. Stewart Jr. // *Biotechniques.* – 1997. – V. 23, № 5. – P. 912–918.
262. Stewart C. N. Jr. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants / C. N. Jr. Stewart // *Plant Cell Rep.* – 2001. – V. 20, № 5. – P. 376–382.
263. Матвеева Н. А. Агробактериальная трансформация салата (*Lactuca sativa* L.) конструкциями, несущими гены бактериальных антигенов из *Mycobacterium tuberculosis* / Н. А. Матвеева, М.Ю. Василенко, А. М. Шаховский, Н. В. Кучук // *Цитология и генетика.* — 2009. — Т. 43, № 2. — С. 27-32.

264. Fukushima A. Further studies on the adsorption of plant phenols by synthetic polymers / A. Fukushima, H. Hase, K. Saite // *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. – 1989. - V. 58, № 4. - P. 583–592.
265. Vaario L. M. Plantlet regeneration from root tissue and establishment of root culture of Japanese white birch / L. Vaario, T. Otomo, R. Soda [et al.] // *Plant Tissue Culture Letters*. - 1995. – V. 12, № 3. – P. 251–258.
266. Deepika R. Optimization of a plant regeneration and genetic transformation protocol for *Eucalyptus* clonal genotypes / R. Deepika, A. Veale, C. Ma [et al.] // *BMC Proceedings*. – 2011. - V. 5, № 47, P. 1-3.
267. Tucker M. R. Sexual and asexual (apomictic) seed development in flowering plants: molecular, morphological and evolutionary relationships [Электронный ресурс] / M. R. Tucker, A. M. G. Koltunow // *Functional Plant Biology*. – 2009. – V. 36. – P. 490–504. – Режим доступа: http://www.botany.wisc.edu/courses/botany_940/15Stebbins/Apomixis/Tucker%202009%20Functional%20Plant%20Biol.pdf