

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ**

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

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі генетичної інженерії Інституту клітинної біології та генетичної інженерії Національної Академії Наук України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Кучук Микола Вікторович,
Інститут клітинної біології та
генетичної інженерії НАН України,
директор

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Дробик Надія Михайлівна,
Тернопільський національний педагогічний
університет імені Володимира Гнатюка,
декан хіміко-біологічного факультету,
професор кафедри загальної біології та методики
навчання природничих дисциплін

кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник
Ісаєнков Станіслав Валентинович,
Інститут харчової біотехнології та геноміки
НАН України, завідувач відділу рослинних харчових
продуктів та біофортificaції

Захист відбудеться «22» жовтня 2015 р. о 13-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К.26.202.01 при Інституті клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 148

Автореферат розісланий « » вересня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



К. В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Для прикладної генетичної інженерії основним завданням залишається вдосконалення властивостей культурних рослин відповідно до викликів сучасного світу: врожайність, поживні та харчові якості, стійкість до гербіцидів, біотичних та абіотичних стресів (Кучук, 1997, Блум та ін., 2006; Zhu et al., 2007; Hefferon, 2015). 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 різноманітні регуляторні послідовності.

Ключова роль в регуляції експресії перенесених генів та рівні 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* (Herrera-Estella et al., 1983), іде постійний пошук регуляторних послідовностей, які могли б забезпечити необхідний рівень контрольованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. В багатьох випадках бажана ознака трансгенної рослини є результатом взаємодії декількох білків, експресія яких забезпечується перенесеними генами. Крім того, технології створення трансгенних рослин передбачають використання у векторі для генетичної трансформації селективних та репортерних генів (Anami et al., 2013). Тому виникає потреба використання мультигенних конструкцій, що, відповідно, збільшує кількість регуляторних елементів, необхідних для функціонування таких векторів (Lessard et al., 2002; Naqvi et al., 2010; Peremarti et al., 2010). При створенні мультигенних конструкцій дублювання промоторів є вкрай небажаним, оскільки повтори послідовностей ДНК у геномі трансгенної рослини призводять до «замовчування генів» (Selker, 1999; Muskens et al., 2000; Matzke et al., 2002).

Механізм залежного від гомології «замовчування генів» також лежить в основі захисту рослин від вірусної інфекції (Ratcliff et al., 1997, 1999; Matzke et al., 2000; Baulcombe, 2004) тому проблема «замовчування генів» залишається актуальною і для конститутивних промоторів, які походять від рослинних патогенів. Ефективність конститутивних промоторів для експресії селективних та репортерних генів підтверджена багатьма експериментами, але, при вирощуванні трансгенних рослин у відкритому ґрунті та їх контакті з природними патогенами, проблема «замовчування генів» для цих промоторів набуває особливої актуальності. Так, в роботі Al-Kaff et al. (2000) повідомлялось, що «замовчування»

bar гену під контролем 35S промотору вірусу мозаїки цвітної капусти в трансгенних рослинах ріпаку відбувалось при інфікуванні рослин цим вірусом.

Ще одна проблема, яка виникає при використанні конститутивних промоторів, зокрема 35S промотору – це сильний ехансер, який, згідно опублікованим даним, впливає на експресію генів, що розміщені поряд у векторі, в результаті чого втрачається локалізація та специфіка експресії відповідних тканинспецифічних та індукцибельних промоторів (Yoo et al., 2005; Zheng et al., 2007; Bhullar et al., 2009).

Одним із підходів для вирішення цих проблем може бути використання у векторах для генетичної трансформації регуляторних послідовностей, що мають незначну ступінь гомології з промоторами, які найчастіше використовуються при створенні конструкцій. За останні роки багато наукових робіт було присвячено пошуку та дослідженню послідовностей, які б задовольняли цим вимогам та забезпечували необхідний рівень експресії перенесених генів (Foster et al., 1999; Bhullar et al., 2003; Cazzonelli et al., 2008; Mehrotra et al., 2011).

Перелічені факти зумовлюють незгасаючий інтерес дослідників до нових регуляторних послідовностей, що можуть забезпечити експресію перенесених генів. Проведені дослідження *lox*-опосередкованої експресії перенесених генів є актуальними як з точки зору практичного застосування, так і для вивчення особливостей експресії перенесених генів в трансгенних рослинах в контексті фундаментальних питань 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:

- 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;

- 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;
- дослідити *lox*-опосередковану експресію репортерного *gus* гену в стабільно трансформованих рослинах *Nicotiana tabacum* та транз'єнтну *lox*-опосередковану експресію при агроінфільтрації рослин *Nicotiana benthamiana*;
- 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 включали методи культивування *in vitro*, генетичну трансформацію рослин опосередковану *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 одержаних результатів.

- 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*.
- 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*.

- Вперше отримано трансгенні рослини *N. tabacum*, в яких проходить *lox*-опосередкована експресія гену *gus*, проаналізовано особливості експресії даного гену та визначено вплив енхансера 35S промотора вірусу мозаїки цвітної капусти на *lox*-опосередковану експресію в трансгенних рослинах тютюну. Також показано можливість транзійтної *lox*-опосередкованої експресії *gus* гену.
- 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 фосфінотрицину, що було доведено на прикладі отриманих трансгенних рослин *L. 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 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 симпозиумі “Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources” (26–31 травня 2002 р., м. Ялта, Україна), 6-ому Міжнародному симпозиумі в серії «Recent Advances in Plant Biotechnology 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.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі списку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів досліджень та їх обговорення, узагальнення, висновків та списку використаних джерел, що містить 267 посилань. Дисертація викладена на 148 сторінках комп’ютерного друку і містить 8 таблиць та 36 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто питання регуляції експресії перенесених генів в генетично модифікованих рослинах, промотори, які використовуються у векторах для генетичної трансформації, а також висвітлено проблему «замовчування генів», що виникає при використанні традиційних промоторів. Крім того, в огляді наведені опубліковані дані по іншим регуляторним послідовностям, що використовуються для забезпечення стабільного рівня експресії перенесених генів. Друга частина огляду присвячена детальній характеристиці *Cre/lox* системи рекомбінації бактеріофагу P1 та дослідженням, в яких вивчалось її функціонування в рослинному геномі, а також можливість практичного використання *Cre/lox* системи рекомбінації для отримання безмаркерних трансгенних рослин.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

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 перенесеного *bar* гену. Отримані вектори були використані як для *Agrobacterium*-опосередкованої, так і для прямої трансформації рослин методом бомбардування частинками вольфраму. Крім того, одним з завдань було перевірити можливість використання таких векторів для експресії інших генів, для чого були створені вектори з репортерним геном *gus*, що містив *lox* сайт замість промотору.

Векторні конструкції та бактеріальні штами. В роботі використовували нопаліновий штам *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. Для генетичної трансформації використовували бінарні вектори: pICH3737, pICH3744, pICH9414, pICH9393, pICH9702, pICH1754, pICH3831, pICBV19, pICBV16, pICH1567, pCB164, pCB148, pCB108, pCB100, pCB221 (Рис. 1). Генетичні конструкції pICH3737, pICH3744, pICH9414, pICH9393, pICH9702, pICH1754, pICH3831, pICBV19, pICBV16, pICH1567 були люб'язно надані компанією Icon Genetics GmbH (м. Халле, ФРН).

Вектори pICH3737 та pICH3744 містять структурну послідовність *bar* гену без промотора, обмежену інвертованими *loxM* та *loxA* сайтами біля правого бордеру (RB) T-ДНК. Вектори pICH9393 та pICH9414 відрізняються від векторів pICH3737 та pICH3744 тим, що містять *nos* термінатор між послідовністю правого бордеру та *lox* сайту. Вектори pICH9702 та pICH1567 також містять структурну послідовність *bar* гену без промотору, обмежену інвертованими *lox* сайтами в середині вектору. Вектор pICH3831 містить послідовність *bar* гену без промотору біля правого бордеру та не містить *lox* сайтів. Вектор pICH1754 містить послідовність гену рекомбінази *Cre* (*cre* ген) між двома *lox* сайтами дикого (*loxP*) та мутованого (*loxM*) типів. Вектор pCB164 є похідним вектора pICBV19, в якому

послідовність *bar* гену з *nos* промотором була замінена на послідовність *bar* гену з *loxA* сайтом замість промотору біля лівого бордєру (LB).

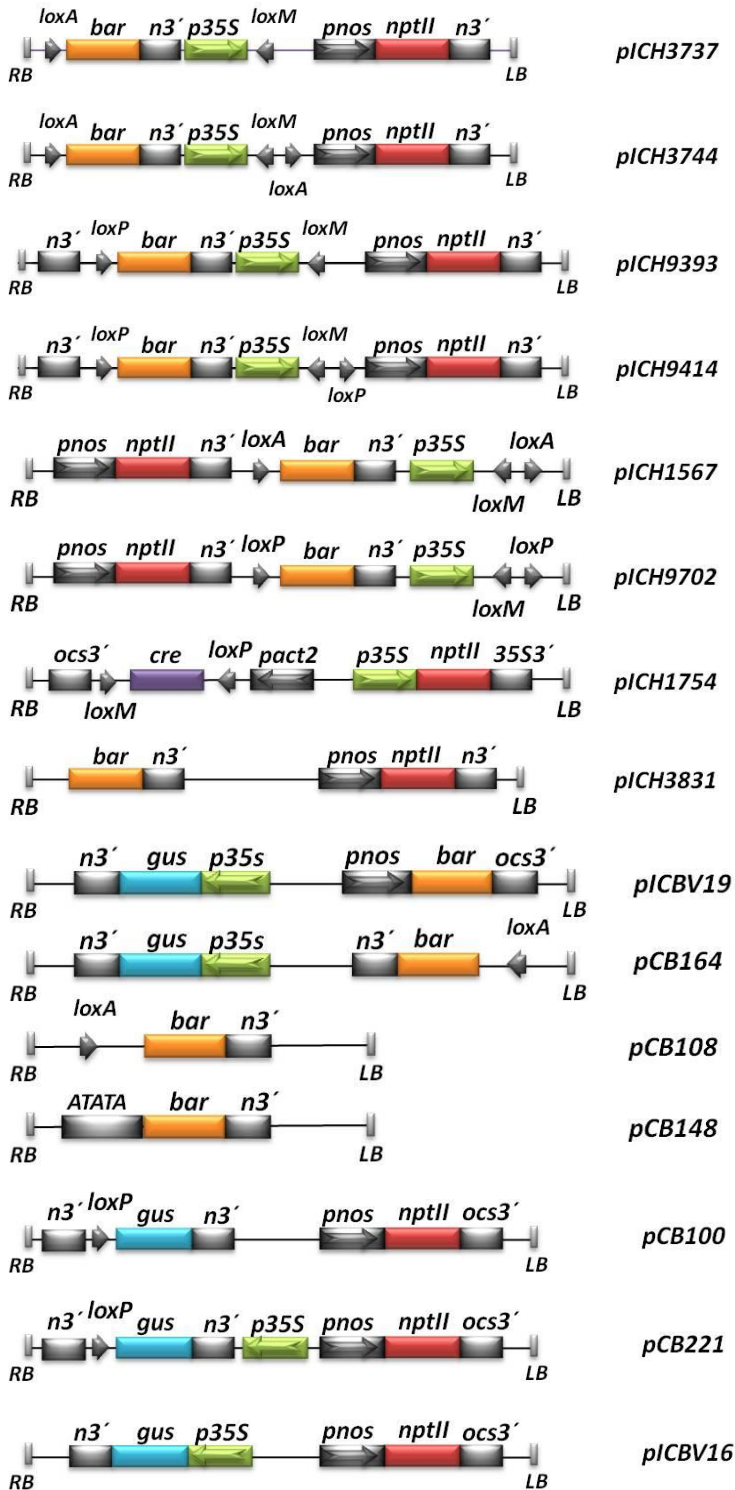


Рис.1. Схематичне зображення Т-ДНК бінарних векторів: RB, LB - правий та лівий бордєри Т-ДНК; *bar* — ген фосфінотрицинацетилтрансферази; *loxP*, *loxA*, *loxM* — послідовності сайту рекомбінації бактеріофагу P1; *nptII* — ген неоміцинфосфотрансферази II; *p35S* — промотор вірусу мозаїки цвітної капусти; *pnos* — промотор гену нопалінсинтази; *n3'* — термінатор гену нопалінсинтази; *ocs3'* — термінатор гену октопінсинтази; *pact2* — актиновий промотор *Arabidopsis thaliana*; *35S3'* — термінатор вірусу мозаїки цвітної капусти; *cre* - послідовність гену рекомбінази Cre; *ATATA* — AT-багата послідовність міжгенного спейсера хлоропластної ДНК тютюну; *gus* - ген β -глюкуронідази.

Вектор pCB100 був створений на основі вектора pICH9393, в якому послідовність *bar* гену без промотора було замінено на послідовність *gus* гену. На основі вектора pCB100 був створений вектор pCB221, в який було додано послідовність 35S промотору в середині вектора безвідносно до послідовності будь-якого з генів.

Коректно зібрані бінарні векторні конструкції переносили в *A. tumefaciens* штаму GV3101 методом електропорації з використанням MicroPulser Electroporator (BioRad, США) відповідно до рекомендацій, що запропоновані у супровідних документах до приладу. Виділення плазмідної ДНК проводили лужним методом (Sambrook et al., 1989) з деякими модифікаціями.

Рослинний матеріал. Для експериментів з генетичної трансформації використовували асептичні рослини тютюну (*Nicotiana tabacum*) сорту Wisconsin, *Nicotiana africana* 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.

Як базове живильне середовище для культивування рослин та експлантів *N. tabacum* та *N. africana* використовували середовище MS (Murashige et al., 1962), а для культивування салату - середовище B5 (Gamborg et al., 1968).

Генетична трансформація рослин опосередкована *Agrobacterium tumefaciens*. Генетичну трансформацію рослин проводили за допомогою *A. tumefaciens* штаму GV3101, яка була трансформована відповідним вектором. Спільне культивування сегментів асептичних рослин та суспензії *A. tumefaciens* здійснювали протягом 12-36 годин, використовуючи розведення нічної культури у 3-4 рази. До отриманої бактеріальної суспензії додавали ацетосирінгон до кінцевої концентрації 0,2 мМ.

Генетична трансформація *N. tabacum* за допомогою біолістичного методу була проведена згідно Christou (1995). Плазмідну ДНК виділяли з нічної культури *E. coli* XL-blue, використовуючи QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Promega, США) та наносили на мікрочастинках вольфраму (Tungsten M-17 Microcarriers, 1,1 мкм, BioRad, США).

Молекулярно-біологічний аналіз. Для доведення інтеграції трансгенів в геном рослин, отриманих в результаті експериментів з генетичної трансформації, проводили ПЛР-аналіз сумарної рослинної ДНК, яку виділяли за допомогою ЦТАБ методу згідно Армитидж и др. (1991) з деякими модифікаціями. 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 Logemann et al. (1987). Синтез першого ланцюгу кДНК проводили на матриці РНК, після попередньої обробки дезоксирибонуклеазою I. Далі проводили ПЛР-аналіз, використовуючи специфічні праймери до відповідних трансгенів.

Гістохімічний аналіз експресії гену β -глюкуронідази проводили згідно Jefferson et al. (1987) в 100 мМ фосфатному буфері рН 7,0, який містив 1 мМ X-Gluc. 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 (Jefferson et al., 1987). Вимірювання флуоресценції проводили в кюветах об'ємом 3 мл на

спектрофлуориметрі (PerkinElmer LS 55, США), використовуючи довжину хвилі збудження 365 нм, а емісії - 455 нм.

Методи статистичної обробки в роботі були використані для встановлення достовірності різниці між вибірковими середніми, а також при порівнянні вибірок, отриманих при трансформації рослин *N. africana* та *N. tabacum* згідно тесту Ст'юдента (Лакин, 1980). Риски на діаграмах відповідають довірчим інтервалам (рівень вірогідності 0,95).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Генетична трансформація рослин *N. africana*. В нашій роботі були підібрані умови генетичної трансформації та вперше отримані трансгенні рослини *N. africana*. Для трансформації рослин було використано декілька методик, кожна з яких дозволила отримати трансгенні рослини, але ефективність трансформації була різною. Так, метод «листяних дисків», який зазвичай успішно використовується для трансформації пасльонових, виявився неефективним для *N. africana*. Незважаючи на те, що були підібрані умови для регенерації рослин з листків та міжвузлів (Белокурова и др., 2004), їх використання в експериментах з агробактеріальної трансформації було малоефективним, на відміну від корневих експлантів. При інкубації коренів *N. africana* на середовищі MS4 відбувалось утворення калюсу в місцях ушкодження експлантів. Через 4-5 місяців після трансформації на регенераційному середовищі, що містило 50 мг/л канаміцину, на калюсі утворювались численні пагони (рис. 2), які надалі вкорінювались на безгормональному селективному середовищі.



Рис. 2. Утворення калюсу та регенерація рослин *N. africana* з корневих експлантів після *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації: *a* – 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.

Ми вважаємо, що цей метод є оптимальним для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин *N. africana*, так як висока регенераційна здатність експлантів поєднується з високою ефективністю трансформації.

В результаті проведених експериментів з генетичної трансформації рослин *N. africana* векторами pICH3737 та pICH3744 на селективному середовищі, яке містило 50 мг/л канаміцину, було відібрано декілька десятків рослин. Для доведення трансгенної природи отриманих стійких до канаміцину рослин *N. africana* проводили ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до

послідовностей генів *nptII* та *bar*. Надалі трансгенні рослини були протестовані на середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину. Виявилось, що більшість трансгенних рослин (приблизно 80%) демонструють ознаку стійкості до фосфінотрицину в умовах *in vitro* – вкорінюються на селективному середовищі (рис. 3-а). Трансгенні рослини, що адаптувалися до росту в ґрунті, також 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-б, в).



Рис. 3. Виявлення стійкості трансгенних рослин *N. africana* до фосфінотрицину:

а - вкорінення трансгенних рослин *N. africana*/pICH3737 на селективному середовищі, що містило 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.

Генетичні конструкції pICH3737 та pICH3744 містять безпромоторний *bar* ген (рис. 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 (промотор-виявляючі вектори), для яких експресія перенесеного гену відбувається внаслідок випадкового транскрипційного злиття з промотором в рослинному геномі. Порівнявши результати отримані в наших експериментах з даними, які були опубліковані в експериментах з промотор трепінгу слід зазначити, що частота транскрипційного злиття, що доповідається в роботах різних авторів, є суттєво меншою, і в тих випадках, коли фіксують лише стабільну конститутивну експресію, складала 0,1 – 4,8% (Foster et al., 1999, Ryu et al., 2004, Alvarado et al., 2004).

В наших експериментах більш ніж 80% трансгенних рослин виявились стійкими до фосфінотрицину. Активність фосфінотрицину базується на блокуванні фермента глютамінсинтетази, наслідком чого є численні порушення метаболізму рослини: пригнічення фотосинтезу та біосинтезу білків, накопичення аміаку (de Block et al., 1987; Hoerlein, 1994). 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 (T1) цих рослин, що, на наш погляд, також підтверджує стабільність та високий рівень експресії.

Отримавши цікавий практичний результат, ми проводили дослідження в декількох напрямках з метою з'ясувати умови, при яких відбувається *lox*-опосередкована експресія *bar* гену. 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. 1). Також всі ці вектори були використані в експериментах з генетичної трансформації тютюну.

Отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* з векторами, що містять послідовність *-lox-bar-*. Через 2 місяці після проведення спільного культивування експлантів *N. tabacum* з агробактеріальною суспензією на селективному середовищі відбувалась регенерація пагонів. Отримані рослини вкорінювали на безгормональному селективному середовищі, яке містило 100 мг/л канаміцину для селекції. Стійкі до канаміцину трансгенні рослини тютюну були перевірені на стійкість до фосфінотрицину в умовах *in vitro*. Для цього проводили вкорінення пагонів на безгормональному селективному середовищі, що містило 5 мг/л фосфінотрицину.

Проведені експерименти дозволили зробити два основні висновки. По-перше, 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*). По-друге, результати досліджень *lox*-опосередкованої експресії *bar* гену для видів *N. africana* та *N. tabacum* не мають статистично достовірних відмінностей. Приблизно 80% трансгенних рослин *N. tabacum*, що були отримані з векторами, які містять послідовність *-lox-bar* біля правого бордеру (*RB-lox-bar*) виявились стійкими до фосфінотрицину.

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 *RB-lox-bar*, представлені на рисунку 4.

За результатами цієї серії експериментів було підтверджено, що при трансформації рослин векторами, в яких *lox* сайт розміщений безпосередньо біля правого бордеру та перед структурною частиною *bar* гену (*RB-lox-bar*), відбувалась експресія *bar* гену, яка розпізнавалась завдяки виникненню у трансгенних рослин ознаки стійкості до фосфінотрицину. Частота виникнення стійких до фосфінотрицину рослин була високою, і в деяких експериментах сягала 85%.

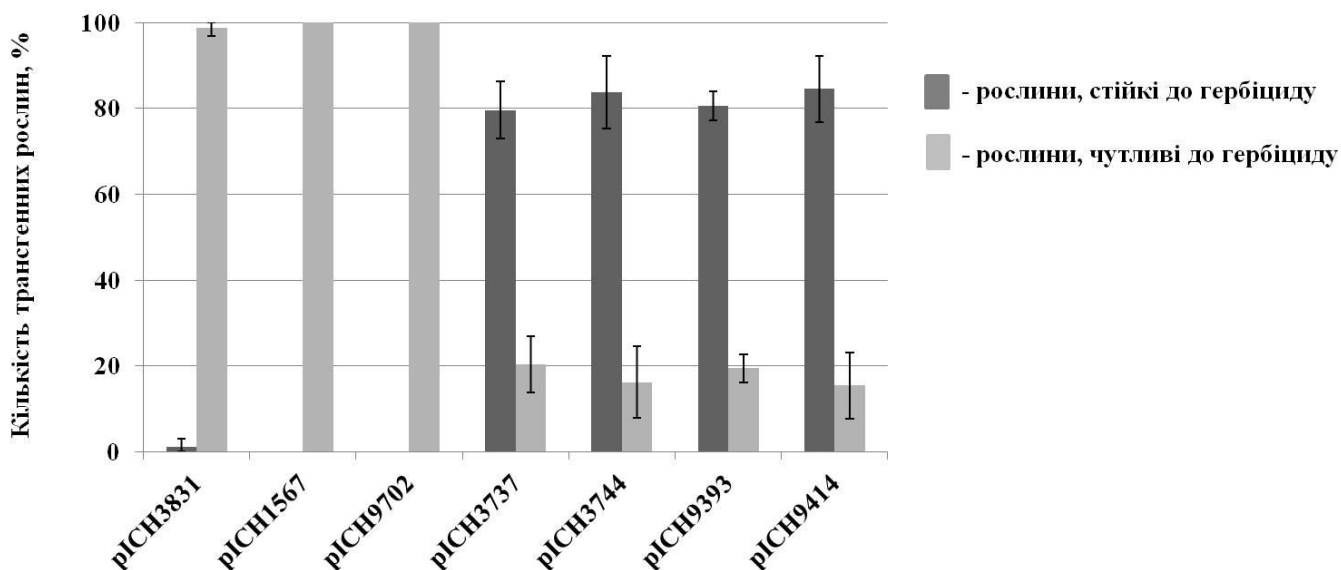


Рис. 4. Порівняння кількості стійких та чутливих до фосфінотрицину трансгенних рослин *N. tabacum* після трансформації векторами, що містять послідовність *-lox-bar-*. По осі X – вектори, що використовувались для трансформації, по осі Y – кількість трансгенних рослин *N. tabacum*. Представлені дані відображають середнє значення, згідно результатів трьох незалежних експериментів з генетичної трансформації. Риски на діаграмах відповідають довірчим інтервалам (рівень вірогідності 0,95)

Молекулярно-біологічний аналіз рослин, що регенерували на селективному середовищі. Для доведення трансгенної природи отриманих рослин, стійких до канаміцину, проводили ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до послідовностей генів *nptII* та *bar*. З рисунку 5 видно, що в результаті ампліфікації утворюються фрагменти ДНК очікуваного розміру: 622 п. н. для гену *nptII* та 463 п. н. для гену *bar*.

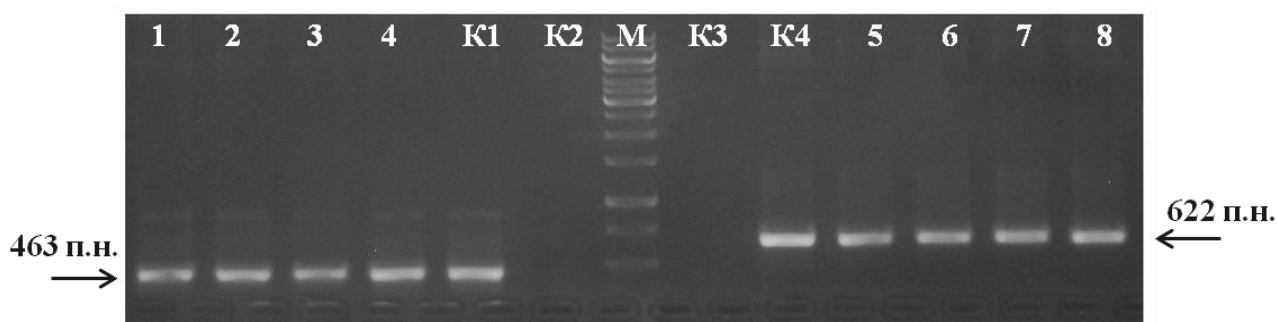


Рис. 5. Електрофореграма результатів ПЛР аналізу тотальної ДНК рослин *N. africana*, стійких до канаміцину, з використанням праймерів до *bar* та *nptII* генів: М - ДНК маркер, O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); K1 – позитивний контроль, вектор pICH3737 з праймерами до *bar* гену; K2 - 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.

У векторах рІСН9393 та рІСН9414, для запобігання проходження через *bar* ген РНК полімерази при випадковому транскрипційному злитті трансгена та промотора генома рослини, було додано *nos* термінатор між правим бордером та *lox* сайтом. Для того, щоб переконатись, що в геномі трансгенних рослин, стійких до фосфінотрицину, перед *bar* геном зберігається послідовність *nos* термінатора, проводили ПЛР аналіз з використанням форвардного праймеру до *nos* термінатора та реверсного праймеру до *bar* гену. 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. 6-а, доріжки 1-6) порівняно з його розміщенням у векторі рІСН9414 (рис. 6-б, доріжка К+). Отриманий результат додатково підтверджує, що *lox*-опосередкована експресія *bar* гену не може бути результатом випадкового транскрипційного злиття, оскільки РНК-полімераза, що була ініційована найближчим промотором, мала б від'єднатися, дійшовши до послідовності термінатора.

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 рІСВВ19, який містить ген *bar* під контролем *nos* промотору (рис. 1). Щоб переконатися у відсутності домішок ДНК в препаратах РНК, проводили ПЛР-аналіз з використанням відповідних праймерів, специфічних до гену *bar*. Відсутність сигналу на доріжках 3, 5 та 7 вказує на чистоту РНК-препаратів (рис. 6-б). Наявність сигналів на доріжках 2, 6 та 8 підтверджує наявність мРНК, що відповідає *bar* гену, у відповідних зразках.

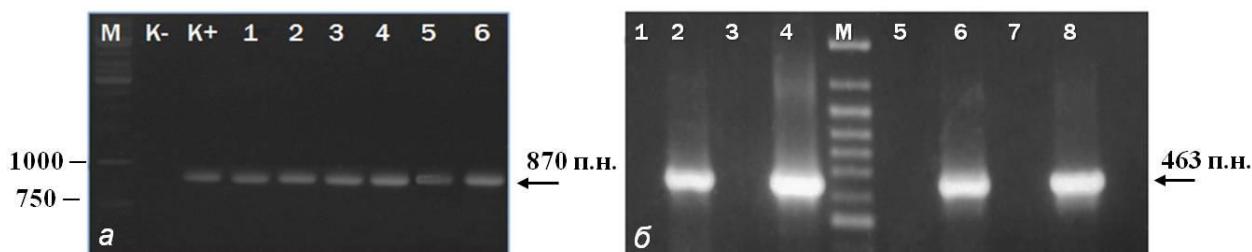


Рис. 6-а. Електрофореграма результатів ПЛР тотальної ДНК трансгенних рослин тютюну (вектори рІСН9393 та рІСН9414) з використанням праймерів до *nos* термінатору (форвардний) та *bar* гену (реверсний): М - ДНК маркер, O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); К- - негативний контроль, ДНК рослини дикого типу; К+ - позитивний контроль, плазмідна ДНК вектор рІСН9393; 1-6 – ДНК трансгенних рослин тютюну, трансформованих векторами рІСН9393 (1-3) та рІСН9414 (4-6).

Рис. 6-б. Електрофореграма результатів ПЛР кДНК, синтезованої за допомогою реверсивної транскриптази з РНК трансгенних рослин тютюну, з праймерами до *bar* гену: 1- негативний контроль з кДНК, синтезованої з РНК нетрансгенної рослини; 4 - позитивний контроль з кДНК, синтезованої з РНК рослини, трансформованої плазмідною рІСВВ19; 2, 6, 8 – кДНК, синтезована з РНК рослин, трансформованих плазмідною рІСН3737; 3, 5, 7 - контроль: ті самі проби, але без використання реверсивної транскриптази; М - ДНК маркер, 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL).

За допомогою молекулярно-біологічного аналізу було доведено наявність генів *nptII* та *bar* в геномі отриманих рослин та незмінність розміщення *nos*

термінатору по відношенню до *bar* гену, а також підтверджено, що в стійких до фосфінотрицину трансгенних рослинах, отриманих в результаті трансформації вектором, який містить *lox* сайт замість промотора гену *bar* біля правого бордеру, відбувається транскрипція *bar* гену.

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 *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації: регенерація та селекція рослин на селективному середовищі, яке містило канаміцин (100 мг/л), та подальше тестування отриманих рослин на стійкість до фосфінотрицину.

Дані, представлені в таблиці 1, свідчать, що на відміну від *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації абсолютна більшість трансгенних рослин, отриманих внаслідок бомбардування, не були стійкими до фосфінотрицину. Лише дві рослини – одна з вектором pICH3737, а інша з вектором pICH9393 – сформували корені та розвивались на середовищі, що містило 5 мг/л фосфінотрицину. Ще 10 рослин були виділені нами в категорію «відносно стійких». Результати, отримані в цьому експерименті, засвідчують, що *lox*-опосередкована експресія залежить від методу трансформації і відбувається в трансгенних рослинах, отриманих методом агробактеріальної трансформації.

Таблиця 1

Результати тестування на селективному середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину (PPT), трансгенних рослин, отриманих методом прямої трансформації плазмідною ДНК векторів, які містять послідовність - *lox*- *bar*-

Вектор	Кількість трансгенних рослин, отриманих в експериментах з прямої трансформації тютюну			
	загальна кількість	чутливі до PPT	стійкі до PPT	відносно стійкі
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

***Lox*-опосередкована експресія *bar* гену при розміщенні *lox* сайту біля лівого бордеру.** Для того щоб дослідити можливість *lox* опосередкованої експресії *bar* гену при розміщенні *lox* сайту біля лівого бордеру був створений вектор pCB164. Цей вектор не містив другого селективного гену, тому після

трансформації селекція трансгенних рослин йшла безпосередньо на середовищі, що містить 5 мг/л фосфінотрицину. Після трансформації вектором рСВ164 регенерація відбувалась приблизно на 30% експлантів, тоді як для вектору рІСН3737 ця цифра складала біля 80%.

За результатами проведених експериментів були отримані трансгенні рослини стійкі до гербіциду. Таким чином ми отримали підтвердження можливості використання безпромоторного *bar* гену та *lox* сайту біля лівого бордери як селективного гену у векторах для *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації рослин, а також для отримання трансгенних рослин, стійких до фосфінотрицину.

Транзйентна *lox*-опосередкована експресія гену *gus*. Для дослідження транзйентної експресії гену *gus* проводили інфільтрацію листків *N. benthamiana* агробактеріальною суспензією, до складу якої входила агробактерія з одним з трьох векторів, що містив *gus* ген (рСВ100, рІСВ16 та рСВ221). Детекцію експресії гену *gus* за допомогою гістохімічного аналізу проводили на четвертий день після інфільтрації. У порівнянні з контролем (вектор рІСВ16) транзйентна *lox*-опосередкована експресія гену *gus* при використанні вектора рСВ100 є досить слабкою. Але для вектора рСВ221, який по своїй будові має таку ж Т-ДНК, до якої було додано послідовність енхансеру 35S промотору, спостерігали значне збільшення активності β -глюкуронідази (продукту експресії гену *gus*).

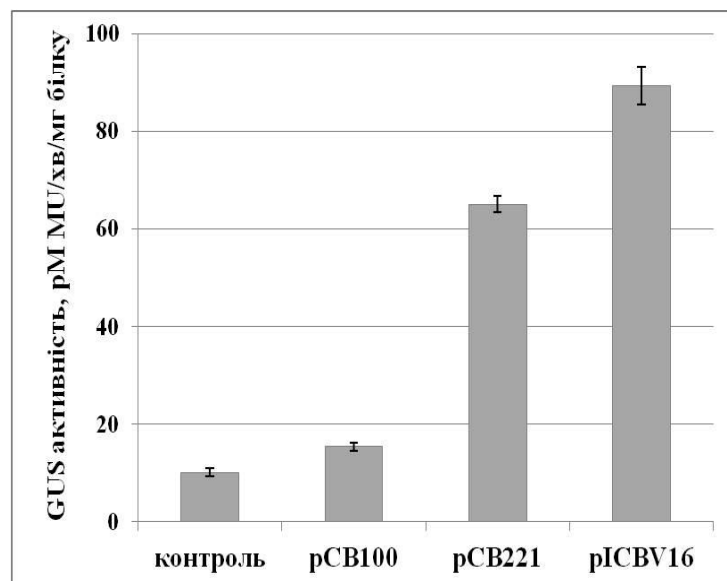


Рис. 7. Результати кількісної оцінки активності білку GUS методом флуориметричного аналізу в листках *N. benthamiana* після інфільтрації векторами, що містять *gus* ген: вектор рІСВ16 - *gus* ген під контролем 35S промотору, вектори рСВ100 та рСВ221 містять послідовність *RB-lox-gus*, контроль - вектор рІСН9393 - не містить гену *gus*.

Представлені дані відображають середнє значення, згідно результатів трьох незалежних вимірювань та середню квадратичну похибку середнього значення GUS активності.

Кількісну оцінку експресії *gus* гену проводили за допомогою флуориметричного методу. Отримані дані співпадають з результатами гістохімічного аналізу активності β -глюкуронідази для кожного з векторів. Згідно даним флуориметричного аналізу, активність білку GUS при інфільтрації листків вектором рСВ100 (під час транзйентної експресії) є більшою від значення негативного контролю (вектор рІСН9393) та відчутно (більш ніж у 3 рази) збільшується при використанні вектора рСВ221 (рис. 7).

Проведені дослідження підтверджують можливість транзйентної *lox*-опосередкованої експресії *gus* гену. Оскільки відмінність між векторами рСВ100

та рСВ221 полягає лише у наявності послідовності 35S промотора у Т-ДНК вектора рСВ221, то можна також зробити висновок про вплив енхансера 35S промотора на транз'єнтну *lox*-опосередковану експресію.

***Lox*-опосередкована експресія *gus* гену в стабільно трансформованих рослинах тютюну.** Після проведення спільного культивування експлантів рослин з агробактерією, яка містить вектори рСВ100, рСВ16 та рСВ221 регенерація рослин проводилась на селективному середовищі, що містить 100 мг/л канаміцину. Для доведення трансгенної природи отриманих рослин тютюну проводили ПЛР-аналіз з використанням специфічних праймерів до послідовностей генів *nptII* та *gus* (рис. 8). В результаті ампліфікації утворювались фрагменти ДНК очікуваного розміру: 622 п. н. для гену *nptII* та 432 п. н. для гену *gus*.

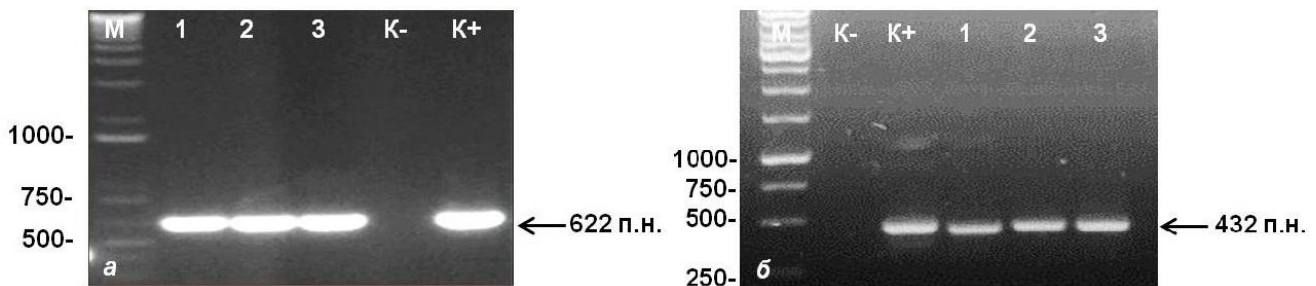


Рис. 8. Електрофореграма результатів аналізу за допомогою ПЛР тотальної ДНК рослин тютюну, отриманих після трансформації вектором рСВ221, з використанням праймерів до *nptII* (а) та *gus* (б) генів:

М – ДНК маркер, O`GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific); K+ – позитивний контроль ДНК плазмиди рСВ221; 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.

Більшість відібраних трансгенних рослин, трансформованих вектором рСВ100, згідно результатів гістохімічного аналізу, не мали β -глюкуронідазної активності. Приблизно 8% регенерантів мали блакитне забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу, на стадії формування проростків – до вкорінення рослин. Лише декілька трансгенних ліній зберегли GUS активність після укорінення та формування рослини в умовах *in vitro*. Було проаналізовано приблизно дві сотні регенерантів рСВ100, що вирости на селективному середовищі, серед яких лише 3 лінії зберегли невисокий рівень активності β -глюкуронідази (1,5% трансформантів).

Після трансформації рослин тютюну вектором рСВ221 частота виникнення рослин, які мали блакитне забарвлення при проведенні гістохімічного аналізу, була на порядок вищою, ніж для вектора рСВ100, і складала приблизно 10%. Інтенсивність блакитного забарвлення GUS-позитивних ліній рСВ221 також була більшою, ніж для GUS-позитивних ліній рСВ100, хоча і меншою, ніж для контрольного вектора рСВ16, що підтверджувалось і даними флуориметричного аналізу (рис. 9).

Відібрані трансгенні лінії тютюну, в яких проходила *lox*-опосередкована експресія *gus* гену, були висаджені в ґрунт в умовах теплиці. 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, яке було отримано в результаті самозапилення трансгенних ліній рСВ221/15 та рСВ221/12.

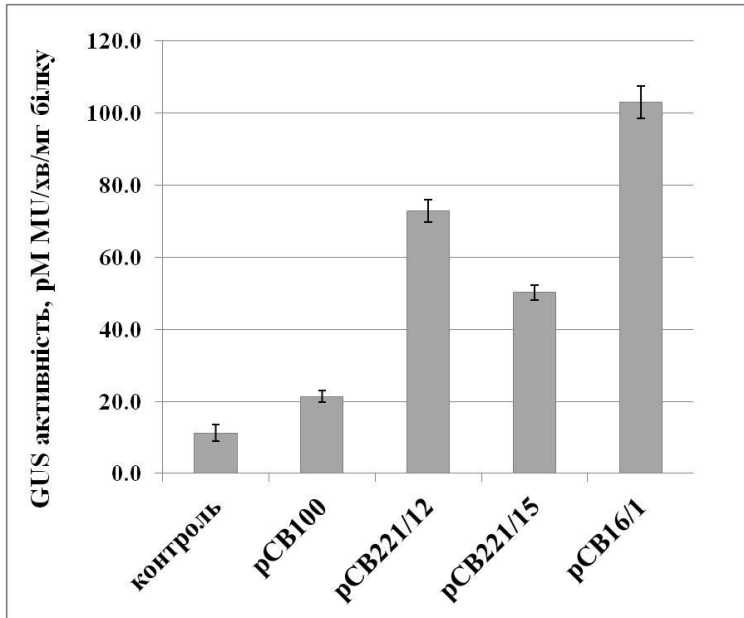


Рис. 9. Результати кількісної оцінки білку GUS методом флуориметричного аналізу в листках трансгенних рослин тютюну: по осі X - назви ліній трансгенних рослин, в яких активність *gus* гену була підтверджена методом гістохімічного аналізу. Представлені дані відображають середнє значення згідно результатів трьох незалежних вимірювань в листках однієї рослини (висадженої в ґрунт) та середню квадратичну похибку середнього значення GUS активності.

Отримані дані переконливо демонструють вплив енхансера 35S промотора 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 рівня експресії *gus* гену у GUS-позитивних трансгенних рослинах.

Аналіз послідовності RB-*lox* in silico. Комп'ютерний аналіз RB-*lox* послідовності за допомогою програми Plant CARE та бази даних PLACE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) виявив ТАТА мотиви в послідовності *loxA* сайту, що знаходяться на відстані 94 п. н., 82 п. н. та 72 п. н. відносно сайту ініціації транскрипції. Декілька послідовностей, що ототожнюють з регуляторними елементами, були виявлені в ділянці, що примикає до *lox* сайту та послідовності правого бордеру (вектор рICN3737): СААТ бокс, АТГСАААТ мотив, ТГА-елемент та АТСТ мотив, який частково перекривається з СААТ боксом (рис. 10-а). Згідно з загальноприйнятим визначенням ТАТА бокс – це послідовність, що зазвичай входить до складу *корового* (мінімального) еукаріотичного промотору. Після зв'язування одного з факторів транскрипції з ТАТА-боксом запускається каскад подій, результатом яких є формування преініціаторного комплексу та ініціація РНК полімерази II (Hahn et al., 1989, Horikoshi et al., 1989). 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* (Bucher et al., 1990, Nussinov et al., 1990, Maity et al., 1998, Mantovani et al., 1998). Транскрипційний фактор, що зв'язується з СААТ-боксом та активує транскрипцію РНК полімеразою II, відомий як NF-Y (Nuclear

Factor Y) (Sinha et al., 1995). Ми можемо зробити припущення, що комбінація цих послідовностей, при розміщенні *lox* сайту у векторі біля правого бордеру, створила можливість для експресії трансгену.

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.) (Dale and Ow, 1990). *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 ТАТА послідовності, притаманні *loxP* сайту, оскільки вони розміщені в області інвертованих повторів (рис. 10-б).

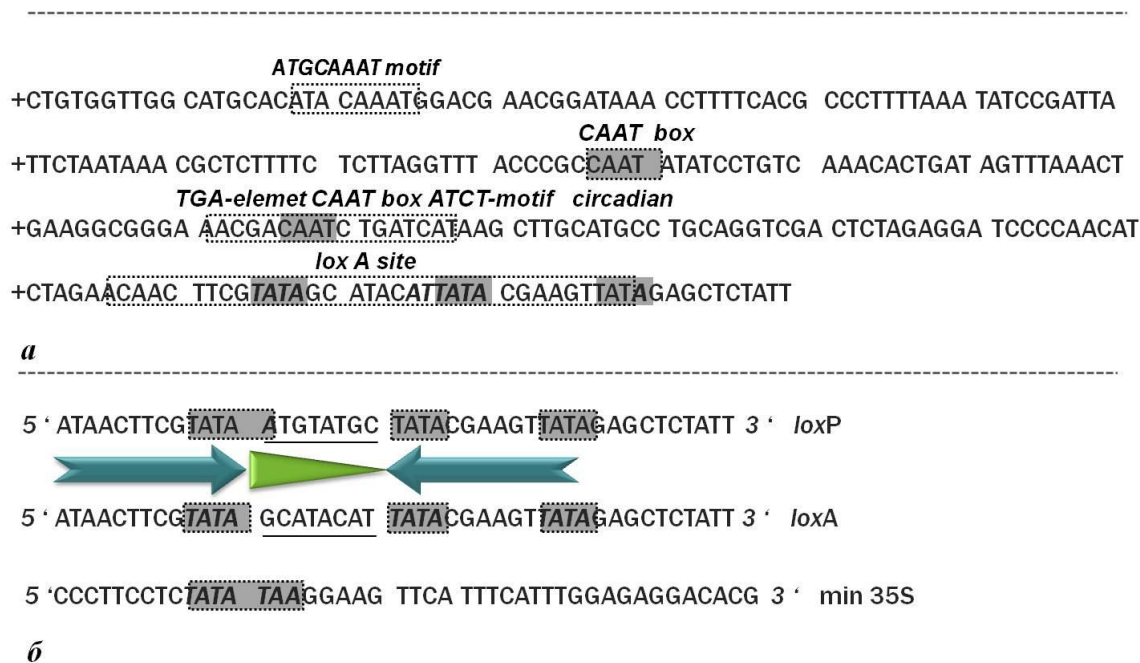


Рис. 10. Результати аналізу *in silico* послідовності *lox* сайту та прилеглих районів: *a* - послідовність *RB-lox* ділянки вектору pICH3737 (ймовірні регуляторні послідовності, визначені програмою Plat CARE, та послідовність *loxA* обведено пунктиром (ТАТА бокс та СААТ бокс додатково виділено кольором); *b* - порівняння послідовності *loxA*, *loxP* сайтів та мінімального 35S промотору: підкреслено послідовність спейсеру *lox* сайтів – області, яка була змінена при створенні мутантного (*loxA*) сайту, ТАТА бокс виділено кольором.

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. 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.

Отримання та дослідження трансгенних рослин салату (*Lactuca sativa*), в яких проходить *lox*-опосередкована експресія *bar* гену. В результаті експериментів з агробактеріальної трансформації *L. sativa* векторами pICH3737, pICH9393 були отримані рослини, які вкорінювались на середовищі, доповненому 5 мг/л фосфінотрицину (рис. 11-а). Аналіз за допомогою ПЛР підтвердив наявність *bar* та *nptII* генів в ДНК рослин, стійких до канаміцину та фосфінотрицину.

Трансгенні рослини *L. sativa*, які містять послідовності *bar* гену з *lox* сайтом замість промотору біля правого бордеру, були висаджені в ґрунт. Було показано, що ознака стійкості до фосфінотрицину підтверджується у цих рослин при обробці гербіцидом Basta в умовах теплиці (рис. 11-б, в). 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 містить 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 залишались зеленими та продовжували рости на селективному середовищі (рис. 11-г).

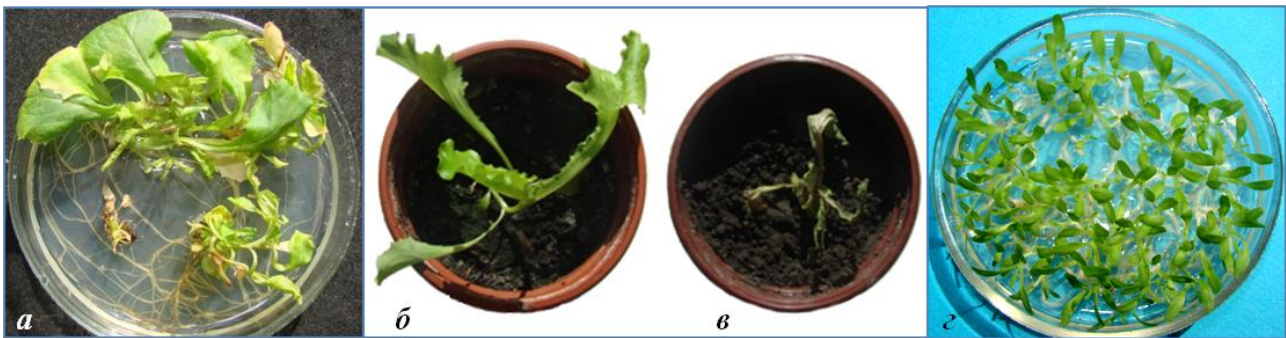


Рис. 11. Виявлення стійкості трансгенних рослин *L. sativa* до фосфінотрицину:

а - вкорінення трансгенних рослин *L. sativa* /pICH9393 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 *L. sativa*, трансформована *A. tumefaciens* (вектор pICH9393), **в** - контрольна рослина дикого типу; **г** - проростки трансгенної лінії *L. sativa* /pICH9393 стійкі до фосфінотрицину.

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 фосфінотрицину.

Таким чином, 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 промотора у складі перенесеного гену. Запропонована *lox*-опосередкована система експресії

була підтверджена на прикладі трансгенних рослин таких видів як *N. africana*, *N. tabacum* та *L. sativa*.

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 отриманні 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.
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 T-ДНК, були успішно використані для отримання трансгенних рослин *Lactuca sativa*, стійких до гербіциду фосфінотрицину.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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. *Особистий внесок здобувача: отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* та *Lactuca sativa* шляхом агробактеріальної трансформації та їх тестування на стійкість до фосфіотрицину, аналіз успадкування набутої ознаки у нащадків трансгенних рослин, проведення аналізу експресії *gus* гену в трансгенних рослинах *N. tabacum*.*
2. 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. *Особистий внесок здобувача: створення вектору *pCB100*, отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum*, проведення молекулярно-біологічного аналізу, а також гістохімічного та флуориметричного аналізу для визначення активності гену *gus* в трансгенних рослинах, написання тексту статті.*
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. *Особистий внесок здобувача: отримання трансгенних рослин *Nicotiana africana* та *Nicotiana tabacum* шляхом агробактеріальної та прямої трансформації, проведення тесту на стійкість до фосфіотрицину та молекулярно-біологічного аналізу отриманих трансгенних рослин, проведення статистичної обробки результатів, написання тексту статті.*
4. Щербак Н. Л. Генетическая трансформация растений *Nicotiana africana* Мерхм. плаزمидами, 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. *Особистий внесок здобувача: оптимізація та застосування оптимізованої методики для трансформації рослин *Nicotiana africana*, отримання трансгенних рослин *N. africana*, перенесення отриманих рослин *N. africana* в ґрунт в умовах теплиці, проведення тесту на стійкість до фосфіотрицину отриманих трансгенних рослин, написання тексту статті.*
5. 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. *Особистий внесок здобувача: введення в культуру *in vitro* рослин *N. africana*, розробка методики регенерації рослин *N. africana* з листків; проведення експериментів з виділення протопластів *N. africana* та регенерації рослин з культури протопластів.*
6. Щербак Н. Л. Изучение *lox*-опосредованной экспрессии в трансгенных растениях / Н. Л. Щербак, Л. А. Сахно, И. К. Комарицкий // *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. *Особистий внесок здобувача: отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* шляхом агробактеріальної трансформації, проведення тесту на стійкість до фосфіотрицину та молекулярно-біологічного аналізу отриманих трансгенних рослин, написання тексту статті.*
7. 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. *Особистий внесок здобувача: отримання трансгенних рослин *Nicotiana africana*, проведення тесту на стійкість до гербіциду фосфіотрицину отриманих трансгенних рослин, проведення молекулярно-біологічного аналізу, написання тексту тез.*
8. 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. *Особистий внесок здобувача: отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum* шляхом агробактеріальної та прямої трансформації, проведення тесту на стійкість до фосфіотрицину та молекулярно-біологічного аналізу отриманих трансгенних рослин, написання тексту тез.*
9. Щербак Н. Л. *Lox*-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. *Особистий внесок здобувача: створення вектору *pCB100*, отримання трансгенних рослин *Nicotiana tabacum*, проведення гістохімічного аналізу для виявлення експресії *gus* гену в трансгенних рослинах, написання тексту тез.*
10. 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 доступу: http://conference.icbge.org.ua/images/2011/Abstracts_ICBGE_2011.pdf *Особистий внесок здобувача: отримання трансгенних рослин *Lactuca sativa* шляхом агробактеріальної трансформації та тестування на стійкість отриманих рослин до фосфіотрицину, проведення молекулярно-біологічного аналізу, написання тексту тез.*
11. 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. *Особистий внесок здобувача: отримання трансгенних рослин *Nicotiana africana* та *Nicotiana tabacum* з векторами, що містять послідовності Cre-*lox* системи рекомбінації, проведення молекулярно-біологічного аналізу отриманих рослин, написання тексту тез.*
12. 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. - Одеса, 2003 – С. 36. *Особистий внесок здобувача: вдосконалення методики генетичної трансформації рослин *Nicotiana africana*, отримання трансгенних рослин та аналіз активності транспозонів в трансгенних рослинах *Nicotiana africana*, написання тексту тез.*

АНОТАЦІЯ

Щербак Н.Л. Вивчення *lox*-опосередкованої експресії перенесених генів в трансгенних рослинах. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2015.

В роботі була показана можливість *lox*-опосередкованої експресії *bar* гену в трансгенних рослинах, отриманих методом агробактеріальної трансформації, при використанні векторів, які містили послідовність *lox*-сайту замість промотору *bar* гену біля правого бордеру (RB-*lox-bar*). За допомогою ЗТ-ПЛР аналізу було підтверджено, що у стійких до гербіциду фосфінотрицину трансгенних рослинах *Nicotiana africana* та *N. tabacum* відбувається транскрипція гену *bar*.

Запропонована *lox*-опосередкована система експресії була досліджена при вивченні активності репортерного гену *gus* при транз'єнтній експресії та в трансгенних рослинах *N. tabacum*. Також було показано вплив енхансера 35S промотору на *lox*-опосередковану експресію гену *gus*. При наявності послідовності 35S промотору у тій самій Т-ДНК, частота отримання трансгенних рослин, які демонстрували GUS активність зростала, а її значення збільшувалось втричі.

На прикладі *Lactuca sativa* було показано, що вектори, які містять послідовність *lox* біля бордеру Т-ДНК замість промотору у складі перенесеного гену *bar*, можуть бути успішно використані для отримання трансгенних рослин, стійких до фосфінотрицину.

Ключові слова: експресія трансгенів, генетична трансформація, стійкість до гербіцидів, Cre/*lox* система рекомбінації бактеріофагу P1, *Lactuca sativa*, *Nicotiana africana*, 35S промотор.

АННОТАЦИЯ

Щербак Н.Л. Изучение *lox*-опосредованной экспрессии перенесенных генов в трансгенных растениях. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2015.

В работе была продемонстрирована возможность *lox*-опосредованной экспрессии *bar* гена в трансгенных растениях, полученных методом агробактериальной трансформации, которая происходила при использовании векторов, содержащих последовательность *lox*-сайта вместо промотора *bar* гена возле правого бордера (RB-*lox-bar*). С помощью ОТ-ПЦР анализа было подтверждено, что у трансгенных растений *Nicotiana africana* и *N. tabacum*, устойчивых к гербициду фосфинотрицину происходит транскрипция гена *bar*.

Предложенная *lox*-опосредованная система экспрессии также была изучена при изучении активности репортерного гена *gus* при транз'єнтной экспрессии и в стабильно трансформированных растениях *N. tabacum*. Было показано влияние енхансера 35S промотора на *lox*-опосредованную экспрессию гена *gus*. При наличии последовательности 35S промотора в той же Т-ДНК, частота

возникновения трансгенных растений, демонстрировавших GUS активность, выростала, а ее уровень увеличивался в три раза.

На примере *Lactuca sativa* было показано, что вектора, которые содержат последовательность *lox* сайта возле бордера T-ДНК вместо промотора в составе перенесенного гена *bar*, могут быть успешно использованы для получения трансгенных растений, устойчивых к фосфинотрицину.

Ключевые слова: экспрессия трансгенов, генетическая трансформация, устойчивость к гербицидам, Cre/*lox* система рекомбинации бактериофага P1, *Lactuca sativa*, *Nicotiana africana*, 35S промотор.

SUMMARY

Shcherbak N.L. Investigation of *lox*-dependent expression of transferred genes in transgenic plants. - Manuscript.

Thesis for the scientific degree of candidate of biological science (Ph. D.) on the specialty 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NASU, Kyiv, 2015.

The thesis is devoted to the investigation of *lox*-mediated expression in transgenic plants provided by the vectors containing sequence of *lox* site from the Cre/*lox* recombination system of bacteriophage P1 instead of genes promoter. Wild and mutated types of *lox* sites were tested for their effect upon *bar* and *gus* genes expression in transgenic plants of *Nicotiana africana*, *Nicotiana tabacum* and *Lactuca sativa*.

An effective and reproducible method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *N. africana* has been developed using roots of aseptic plants as explants. Transgenic *N. africana* plants transformed with vectors carrying *lox* site between the right border of T-DNA and the promoterless *bar* gene (RB-*lox*-*bar*) unexpectedly were found to be resistant to phosphinothricin (PPT). Such unpredictable result led us to carry out an investigation of *lox*-mediated expression by plant genetic transformation with the set of vectors based on *lox* site disposition adjacent to promoterless *bar* and *gus* gene sequences.

Most of plasmid vectors held *nptII* gene under control of *nos* promoter as well. In the experiments with the vectors containing *nptII* gene transgenic plants were selected according to their growth capacity on the medium with kanamycin and then were tested on the selective medium containing PPT. The presence of *bar* gene in selected tobacco plants was confirmed by PCR analysis. Herbicide resistance/sensitivity studies of transformants harboring RB-*lox*-*bar* sequence reproducibly resulted in approximately 80% of PPT-resistant transgenic plants.

Neither the localization of *nos* terminator between *lox* site and the RB nor the replacement of the mutated *loxA* site with a wild type *loxP* site had an effect on *bar* gene expression. The frequency of PPT-resistant transgenic plants of *Nicotiana africana* and *Nicotiana tabacum* obtained using vectors with general constitution RB-*lox*-*bar* did not differ from each other at >95% confides using Students T-test. RT-PCR analysis confirms that PPT-resistant phenotype of transgenic plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation was caused by activation of *bar* gene.

In contrast with previous data, disposition *-lox-bar-* internally in the T-DNA thoroughly changed the result of PPT tests. Transformation experiments with such vectors resulted without obtaining any PPT-resistant transgenic plants. Another strategy of experiments with direct selection on the regeneration medium with PPT immediately after co-cultivation also was used for these constructs. The invariable result was shown in the numerous transformation experiments: no PPT-resistant transgenic plants were obtained after co-cultivation with the *Agrobacterium* strain containing the appropriate vector. Experiments with vector containing one *lox* site placed near left border (LB) upstream of *bar* gene demonstrated possibilities of *lox*-dependent expression also. Based on these data we suggest that *lox*-mediated expression occurred only when *lox* site was associated with T-DNA borders.

According to the results of biolistic transformation experiments only 3% of obtained kanamycin resistant plants were tolerant to PPT. The result of direct transformation led us to conclude that *lox*-mediated expression of *bar* gene depended on the method of DNA delivery and occurred mainly in plants obtained via *Agrobacterium*-mediated transformation.

Expression of *bar* gene from the vectors containing *lox* site near RB allowed recovery of PPT-resistant transgenic plants of such important crop as *Lactuca sativa*. The results of herbicide Basta application to transgenic plants in greenhouse have entirely agreed with *in vitro* test results for all plant species mentioned in this report. Self-fertilization seeds (R1) from the primary transformants were harvested and germinated on the medium containing 5mg/l PPT. The inheritance of PPT-resistant phenotype for all transgenic lettuce seedlings and several transgenic tobacco lines as the 3:1 segregation of the selectable marker gene in progeny of tobacco transgenic plants was observed.

We have analyzed reporter *gus* gene *lox*-mediated expression from the vectors that were similarly designed: promoterless *gus* gene together with the *lox* site adjacent to the RB (RB-*lox-gus*). Constructed vectors were shown to provide β -glucuronidase activity in transient expression assays using an *Agrobacterium*-based leaf infiltration of *Nicotiana benthamiana*. Proposed *lox*-dependent expression system was also tested for *gus* gene activity in transgenic tobacco plants. These experiments in addition showed the effect of independent 35S promoter sequence on *lox*-mediated expression of *gus* gene. In the absence of 35S promoter sequence *gus* gene was active in 1.5% transgenic plants and its expression level was low. With 35S promoter sequence in the same T-DNA, the frequency of transgenic plants exhibiting β -glucuronidase activity has increased to 10% and this vector could drive three fold higher level of *gus* gene expression.

Key words: transgene expression, genetic transformation, herbicide resistance, bacteriophage P1 Cre/*lox* recombination system, *Lactuca sativa*, *Nicotiana africana*, 35S promoter.