

УДК 577.218:581.817:602.2

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ В МЕРИСТЕМАХ РАСТЕНИЙ

¹Ю.В. Сидорчук, кандидат биологических наук
²И.М. Герасименко, кандидат биологических наук
²Ю.В. Шелудько, кандидат биологических наук
¹Е.В. Дейнеко, доктор биологических наук

¹Институт цитологии и генетики СО РАН,
Новосибирск, Россия

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН, Киев, Украина

E-Mail: sidorch@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: трансгенез, промотор, генетическая конструкция, тканеспецифическая экспрессия, репортерный ген

Реферат. Применение промоторов, обеспечивающих тканеспецифическую экспрессию трансгенов, позволяет накапливать чужеродные белки преимущественно в тканях-мишенях, что снижает риск неблагоприятного воздействия этих белков на растение, человека и окружающую среду. Однако высокоспецифичные промоторы довольно часто теряют или изменяют свою специфичность при переносе в новое генетическое окружение, что требует предварительной проверки их экспрессионной активности в трансгенных растениях с помощью репортерных генов. Цель данной работы заключалась в том, чтобы оценить характер и эффективность экспрессии репортерного гена *uidA* под управлением промоторов двух генов *Arabidopsis thaliana* – *apetala3* и *rpt2a* при переносе в геном *Nicotiana tabacum*. Ген *apetala3* экспрессируется в цветочных меристемах и кодирует фактор транскрипции группы В, регулирующий развитие цветка. Ген *rpt2a* кодирует 19S регуляторную субъединицу 26S протеасомы и экспрессируется преимущественно в апикальных меристемах корня и стебля. Показано, что промоторы данных генов, включённые в состав генетических конструкций, позволяют обеспечить тканеспецифическую экспрессию репортерного гена *uidA* в условиях чужеродного генома. В зависимости от типа используемого промотора может наблюдаться проявление эктопической экспрессии трансгена, которая, тем не менее, ограничивается зонами меристем в органах трансгенных растений. Сравнение результатов теста на канамицин-устойчивость и гистохимического анализа показало, что интенсивность GUS-окрашивания была выше у потомков исходных трансформантов табака, несущих в геноме две и больше инсерций трансгена. Это указывает на возможный аддитивный эффект числа инсерций трансгена, что ведет к усилению экспрессии и накоплению продукта репортерного гена в тканях трансгенных растений табака.

REGULATORY ELEMENTS FOR TRANSAGENTS EXPRESSION IN PLANTS MERISTEMS

¹Sidorchuk Iu.V., Candidate of Biology

²Gerasimenko I.M., Candidate of Biology

²Sheludko Iu.V., Candidate of Biology

¹Deineko E.V., Dr. of Biological Sc.

¹Institute of Cytology and Genetics SD RAS, Novosibirsk, Russia

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, Kyiv, Ukraine

Key words: transgenesis, promoter site, genetic construct, tissue-specific expression, reporter gene.

Abstract. Application of promoter sites that provide tissue-specific expression of transgenes, allows accumulating foreign proteins in target tissues. This reduces the risk of bad influence on plants, human and environment. Otherwise, high-specific promoter sites often loose or change their specificity when being transferred to new genetic environment that requires beforehand checking of their expressive effect in transgenic plants by means of reporter genes. The paper aims at evaluating the nature and efficiency of reporter gene *uidA* expression when being managed by promoter sites of *Arabidopsis thaliana*, *apetala3* and *rpt2a* genes and transfer-

ring to genome *Nicotiana tabacum*. Gene *apetala3* is expressed in flower meristems and codes transcription factor of B group, which regulates flower development. Gene *rpt2a* codes 19S regulatory subunit 26S of proteasome and it is expressed in apical meristems of root and stalk mainly. The article shows that promoter sites of the genes provide tissue-specific expression of reporter gene *uidA* in conditions of allogeneic genome. The authors observed ectopical expression of transgene in relation to the type of promoter site used. This expression is restricted by meristem areas in the organs of transgenic plants. Comparative analysis of testing results on kanamycin resistance and histochemical analysis has shown that GUS-coloring intensity was higher in derivatives of tobacco transformants, which carry two and more insertions of transgene in the genome. This speaks about possible additive effect of transgene insertions number that enhances expression and accumulation of reporter gene product in the tissues of transgene tobacco plants.

Методы генетической инженерии и экспериментального трансгенеза позволяют значительно ускорить процесс создания растений с новыми полезными признаками, например, более устойчивых к неблагоприятным факторам окружающей среды, что особенно актуально в условиях быстрых климатических изменений. Использование для экспрессии чужеродных генов конститутивных промоторов не всегда отвечает задачам эксперимента, особенно когда продукт имеет физиологическую активность. Применение промоторов, обеспечивающих тканеспецифическую экспрессию трансгенов, позволяет накапливать чужеродные белки преимущественно в целевых тканях, что снижает риск неблагоприятного воздействия этих белков на растение, человека и окружающую среду [1]. Однако высокоспецифичные промоторы довольно часто теряют или изменяют свою специфичность при переносе в новое генетическое окружение, что требует предварительной проверки их экспрессионной активности в трансгенных растениях с помощью репортерных генов [2].

Поскольку развивающиеся цветки и другие меристематические зоны растений часто являются тканями-мишенями при действии стрессовых факторов, в частности, низких температур, экспрессия в этих тканях трансгенов, повышающих устойчивость к неблагоприятному воздействию, представляется весьма целесообразной. Для изучения возможности тканеспецифичной экспрессии трансгенов в цветочных и вегетативных меристемах растений были созданы генетические конструкции, в которых кодирующая последовательность репортерного гена *uidA* была поставлена под контроль промоторов двух генов арабидопсиса – *apetala3* и *rpt2a*. Ген *apetala3* (*ap3*) экспрессируется в цветочных меристемах и кодирует фактор транскрипции группы В, регулирующий развитие цветка [3, 4]. Ген *rpt2a* кодирует 19S регуляторную субъединицу 26S протеасомы и экспрессируется преимущественно в апикальных меристемах корня и стебля [5, 6].

Цель данной работы – оценить характер и эффективность экспрессии трансгенов под управлением тканеспецифичных промоторов в новом генетическом окружении.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Растительный материал. Для проведения генетической трансформации использовали растения табака (*Nicotiana tabacum* L., сорт Petit Havana, линия SR1) и арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana* L., экотип Col-0). Трансгенные растения табака выращивали в условиях гидропонной теплицы с фотопериодом 16/8 ч при температуре 22/18°C (день/ночь). Растения арабидопсиса выращивали с использованием гидропонной технологии в вегетационных сосудах в комнате с постоянной температурой 24°C и фотопериодом 16/8 ч (день/ночь).

Генетические конструкции. Промотор гена *ap3* (длиной 635 п.н. от точки старта транскрипции) и промотор гена *rpt2a* (длиной 1667 п.н. от стартового кодона) были амплифицированы из геномной ДНК арабидопсиса и включены в векторные конструкции на основе вектора pBIN19 для контроля экспрессии гена β-глюкуронидазы (*uidA*). Схемы генетических конструкций приведены на рис. 1.

Генетическая трансформация. С помощью полученных генетических конструкций, введенных в штамм *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, согласно общепринятому протоколу были проведены трансформация листовых эксплантов табака, регенерация и отбор первичных (T₀) трансформантов [7]. Трансформацию растений арабидопсиса проводили с использованием технологии floral dip [8].

Тест на устойчивость к канамицину. Определение числа инсерций Т-ДНК в геноме трансгенных растений табака проводилось посредством тестирования семян, полученных от са-

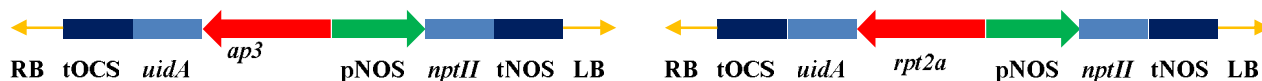


Рис. 1. Схемы Т-ДНК генетических конструкций для тканеспецифической экспрессии трансгенов в растениях:

а – ген *uidA* под управлением тканеспецифического промотора *ap3*; б – ген *uidA* под управлением тканеспецифического промотора *rpt2a*; RB – правая граница Т-ДНК; LB – левая граница Т-ДНК; *uidA* – репортерный ген β-глюкуронидазы *E. coli*; *nptII* – доминантный селективный маркер, ген неомycinфосфотрансферазы *E. coli*; pNOS – промотор гена нопаинсинтазы арабидопсиса; tNOS – терминатор гена нопаинсинтазы арабидопсиса; tOCS – терминатор гена октопинсинтазы арабидопсиса; *ap3* – промотор гена флорального морфогенеза *apetala3*; *rpt2a* – промотор гена 19S субъединицы протеасомы

Schemes of T-DNA genetic constructs for tissue-specific expression of transgenes in the plants:

а – gene *uidA* controlled by tissue-specific promoter site *ap3*; б – gene *uidA* controlled by tissue-specific promoter site *rpt2a*; RB – right border of T-DNA; LB – left border of T-DNA; *uidA* – reporter gene β-glucuronidase *E. coli*; *nptII* – dominant selective marker, the gene of neomycinphosphotransferase *E. coli*; pNOS – promoter site of the gene of arabidopsis thaliana nopaline synthase; tNOS – terminator of the gene of arabidopsis thaliana nopaline synthase; tOCS – terminator of the gene of arabidopsis thaliana octopine synthase; *ap3* – promoter site of the gene of floral morphogenesis *apetala3*; *rpt2a* – promoter site of the gene 19S of proteasome subunit

моопыления, на стандартной среде MS с добавлением 200 мг/л антибиотика канамицина в качестве селективного агента. Подсчет соотношения числа устойчивых (зеленых) и неустойчивых (белых) к канамицину проростков (150–200 шт.) проводили через 4 недели после всходов. Соответствие полученного расщепления менделевскому подтверждали с использованием критерия согласия Пирсона (хи-квадрат).

Гистохимическое определение активности β-глюкуронидазы. Экспрессия репортерного гена *uidA* в тканях первичных трансформантов и потомков от самоопыления подтверждалась с помощью гистохимического определения активности β-глюкуронидазы (GUS-окрашивание). Окрашивание проводили в реакционной смеси следующего состава: 100 мМ фосфатный буфер (pH=7,0), 10 мМ EDTA, 0,1% Triton X100 и 1 мМ X-Gluc (Fermentas, #R0852). Для улучшения качества окрашивания свежий растительный материал в реакционной смеси помещали в камеру генной пушки (PSD-1000/He, Biorad) и удаляли воздух с помощью вакуумирования. Обработанный таким образом материал оставляли на ночь в термостате при температуре 37°C. После окрашивания материал отмывали от хлорофилла 70%-м спиртом.

ПЦР-анализ. Подтверждение наличия промоторов *ap3* и *rpt2a* арабидопсиса в геноме трансгенных растений проводили методом ПЦР. Поскольку обе генетические конструкции содержали один и тот же репортерный ген, праймеры были подобраны следующим образом: общий праймер, комплементарный участку последовательности гена *uidA* и индивидуальные праймеры, комплементарные участкам последовательностей промоторов *ap3* и *rpt2a*.

Структура праймеров, а также размер соответствующих им продуктов амплификации приведены в табл. 1.

Таблица 1

Структура праймеров The structure of primers

Праймер	Последовательность	Продукт амплификации, п.о.
	<i>ape1f</i> 5'gccgtaagttgtcaccg 3'»	554
<i>rpt2f</i>	5'agaaggagtctatgtccgc 3'»	459
<i>gus2r</i>	5'agactgaatgccacaggc 3'»	

Режим амплификации: 5 мин 94°C – 30 × (30 с 94°C – 30 с 60°C – 30 с 72°C) – 5 мин 72°C. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1,5%-м агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Агробактериальная трансформация является эффективным методом векторного переноса чужеродного генетического материала в геном растений. Как видно из представленных в табл. 2 данных, наличие активности репортерного гена *uidA* обнаруживалось с большей частотой (95,1 %) у устойчивых к канамицину первичных трансформантов (T_0), в геноме которых ген *uidA* находился под управлением промотора *rpt2a*. При использовании в генетической конструкции промотора *ap3* активность репортерного гена обнаруживалась только у 78,1% первичных трансформантов.

Гистохимическое окрашивание органо-генных каллусов, а также органов и тканей первичных трансформантов выявило вариабельность в тканеспецифичности экспрессии репортерного

Таблица 2
Распределение растений T_0 по частоте проявления активности репортерного белка
Distribution of T_0 plants of the frequency of reporter protein activity

Трансгенные растения	Промотор	
	<i>ap3</i>	<i>rpt2a</i>
Всего, шт.	32	41
Наличие GUS-окрашивания, шт.	25	39
Отсутствие GUS-окрашивания, шт.	7	2
Доля растений с фенотипическим проявлением репортерного гена <i>uidA</i> (GUS-окрашивание), %	78,1	95,1

гена *uidA* в зависимости от использованного промотора. Например, очевидные различия в интенсивности GUS-окрашивания выявлялись уже на этапе индукции органогенных каллусов. При использовании генетической конструкции с промотором *rpt2a* для трансформации табака активность гена *uidA* в пролиферирующих клетках была заметно выше, чем при использовании конструкции с промотором *ap3* (рис. 2 а, в). Однако и в том и в другом случае на каллусах формировались устойчивые к канамицину проростки с экспрессией репортерного гена в апикальной меристеме (см. рис. 2 б, г).

В зрелых трансгенных растениях T_0 экспрессия репортерного гена под управлением промотора гена *rpt2a* обнаруживалась в меристемах вегетативных (пазушные почки) и генеративных побегов, а также в меристематических зонах бутонов и корней. В вегетативных побегах, развивающихся из пазушных почек, GUS-окрашивание наблюдалось только в зоне меристемы, развивающиеся молодые листья не имели окрашивания (см. рис. 2 д), либо имели слабое сегментное (точечное) окрашивание в непосредственной близости от меристемы. В молодых корешках (длиной 1–2 см) наблюдалось окрашивание меристемы кончика корня (см. рис. 2 к) и, вероятно, вторичных меристем в зоне ветвления (см. рис. 2 л). В бутонах наиболее интенсивно окрашивались цветоножка и чашелистики (см. рис. 2 ж). Окрашивания других элементов прицветника и цветка не наблюдалось, за исключением рыльца пестика. Однако активность гена *uidA* в этом элементе цветка проявлялась на низком уровне (слабое GUS-окрашивание) и только у некоторых трансформантов. Интересно отметить, что у части первичных трансформантов в генеративных побегах при закладке цветков GUS-окрашивание было четко ограничено только цветоножками и не детектировалось в каких-либо других элементах цветка.

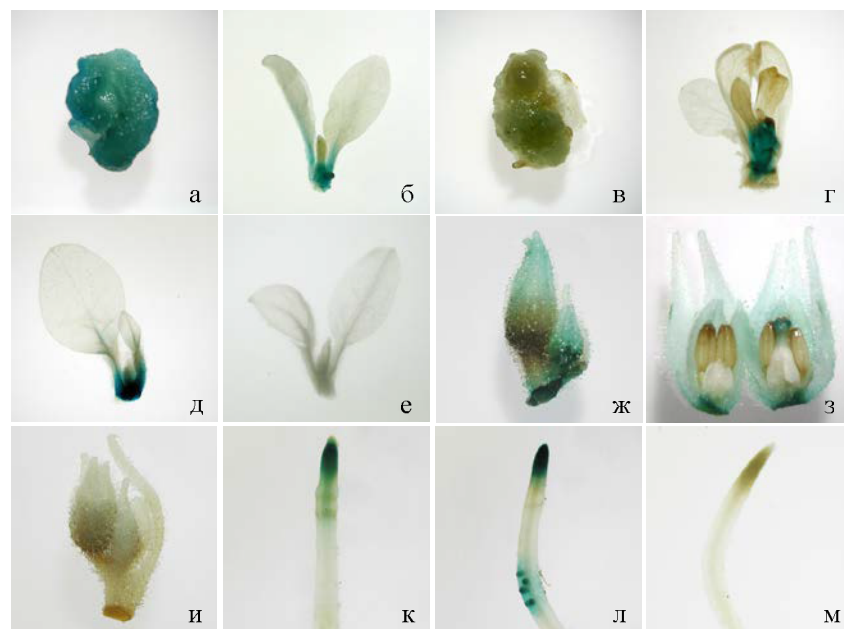


Рис. 2. Вариабельность экспрессии репортерного гена *uidA* в зависимости от промотора в тканях и органах T_0 трансформантов табака (а, б, д, ж, к, л – промотор *rpt2a*; в, г, е, з, и, м – промотор *ap3*): а–г – органогенные каллусы и трансгенные проростки, полученные при трансформации листовых дисков табака; д–ж – бутоны; з, и – побеги, развивающиеся из пазушных почек; к–м – молодые корешки

Variability of reporter gene *uidA* expression in relation to promoter site in tissues and organs T_0 of tobacco transformants (a, b, e, g, j, k – promoter site *rpt2a*; c, d, f, h, i, l – promoter site *ap3*):

a–d – organogenic callus and transgenic sprouts, received at transformation of tobacco leaf disks; e–g – flower buds; h, i – shoots from lateral buds; j–l – roots

У первичных трансформантов T_0 с промотором *ap3* в составе инсерции активности репортерного гена *uidA* в пазушных или корневых меристемах не наблюдалось (см. рис. 2 *е, м*). Его экспрессия обнаруживалась только при формировании цветочных побегов и бутонов, причем распределение GUS-окрашивания по элементам околоцветника и цветка полностью совпадало с тем, что наблюдалось у трансформантов с промотором *rpt2a*. Только у нескольких из полученных трансформантов в единичных цветках активность репортерного гена была обнаружена в лепестках (см. рис. 2 *з*). В целом активность гена *uidA* под управлением промотора *ap3* в тканях трансгенных растений табака была заметно ниже, чем под управлением промотора *rpt2a*, о чем свидетельствовало наличие значительной доли растений с отсутствием GUS-окрашивания даже в цветках (см. рис. 2 *и*).

В табл. 3 приведены суммарные данные по особенностям экспрессии гена *uidA* в тканях и органах трансформантов табака в зависимости от использованного промотора.

Таблица 3

Специфичность экспрессии гена *uidA* в тканях и органах первичных трансформантов табака T_0
Specificity of *uidA* gene expression in the tissues and organs of initial tobacco transformants T_0

Меристемы, элементы цветка и околоцветника	Промотор	
	<i>rpt2a</i>	<i>ap3</i>
Меристема вегетативных побегов	+	-
Флоральная меристема	+	+
Корневая меристема	+	-
Цветоножка	+	+
Чашелистики	+	+
Лепестки	-	+
Тычинки	-	-
Пестик	+	+
Завязь	-	-

Для того чтобы подтвердить, что полученные нами трансгенные растения содержат в своем геноме инсерции с соответствующими промоторными районами, был проведен анализ потомков T_1 , полученных от самоопыления исходных трансгенных растений, методом ПЦР (рис. 3).

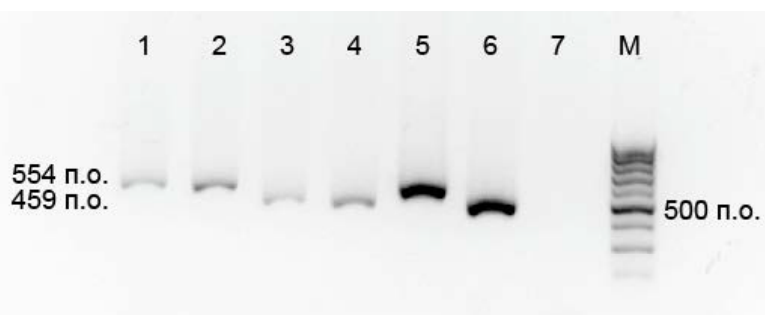


Рис. 3. ПЦР-анализ трансформантов T_1 на присутствие промоторных районов:
 1, 2 – гена *ap3*; 3, 4 – гена *rpt2a*; 5 – плазмидная ДНК с промотором гена *ap3*; 6 – плазмидная ДНК с промотором гена *rpt2a*; 7 – отрицательный контроль (отсутствует матрица); М – ДНК-маркёр, 100 п.о.

PCR-analysis of T_1 transformants on promoter areas:

1, 2 – *ap3* gene; 3, 4 – *rpt2a* gene; 5 – plasmid DNA with promoter site of *ap3* gene;
 6 – plasmid DNA with promoter site of *rpt2a* gene; 7 – negative control (no matrix); M – DNA-marker, 100.

Проанализированы были четыре случайных линии, которые в тесте на устойчивость к канамицину показали расщепление, соответствующее одной инсерции трансгена на геном. Наличие на дорожках 1–4 по одной полосе нужного размера свидетельствует о присутствии в геноме трансгенных растений последовательностей соответствующих промоторных районов.

Поскольку исследуемые нами промоторы должны были обеспечивать экспрессию репортерного гена в меристемах трансгенных растений,

было проведено гистохимическое определение активности β -глюкуронидазы в тканях проростков T_1 , полученных от самоопыления первичных трансформантов T_0 табака. Сравнение результатов теста на канамицин-устойчивость и гистохимического анализа показало, что интенсивность GUS-окрашивания была выше у потомков растений, несущих в геноме две инсерции трансгена и более.

В случае присутствия в геноме первичных трансформантов двух или нескольких инсерций

Т-ДНК интенсивное окрашивание у проростков T_1 наблюдалось не только в зоне апикальной меристемы стебля и меристемах кончиков корней, но также в котиленолах, первых настоящих листьях, гипокотильях, в тканях корня и корневых волосках (рис. 4 а, б, е, ж). У потомков моноинсерционных растений табака GUS-окрашивание локализовалось главным

образом в апикальной меристеме стебля, меристемах кончиков корней и вторичных меристемах зоны ветвления корней (см. рис. 4 з, и), хотя в некоторых случаях распространялось вдоль листовых жилок и в тканях корня (см. рис. 4 в, з). Проростки, выращенные из семян нетрансгенных растений линии SR1, были неокрашены (см. рис. 4 д, к).

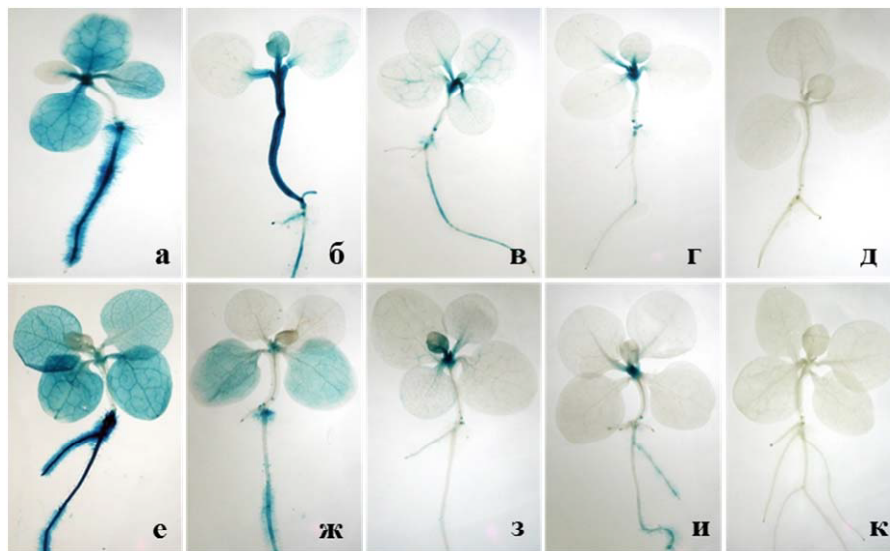


Рис. 4. Варианты *uidA*-экспрессии в проростках трансгенных растений табака T_1 , полученных от самоопыления:

а – г – *uidA*-ген под управлением промотора гена *rpt2a*; е – и – *uidA*-ген под управлением промотора гена *ap3*; а, е – растения с несколькими встройками Т-ДНК в геноме; б, ж – с двумя встройками; в, г, з, и – моноинсерционные растения; д, к – нетрансгенный контроль, сорт Petit Havana, линия SR1

Variants of *uidA* gene expression in the sprouts of transgenic tobacco plants T_1 , received by means of self-pollination:

а – д – *uidA* gene controlled by promoter site of the gene *rpt2a*; е – и – *uidA* gene controlled by promoter site of the gene *ap3*; а, е – plants with several integrations of T-DNA in the genome; б, ж – with 2 integrations; в, г, з, и – monoinsertive plants; д, к – non-transgenic control, variety Petit Havana, line SR1

Весьма интересен тот факт, что в T_1 поколении трансформантов, в геноме которых ген *uidA* находился под управлением промотора гена *ap3*, характер экспрессии репортерного гена оказался полностью идентичен тому, который наблюдался у T_1 потомков трансформантов с промотором гена *rpt2a* (см. рис. 4). Для промотора гена *ap3*, кодирующего фактор транскрипции флорального морфогенеза арабидопсиса, экспрессия в меристемах и тканях вегетативных органов является эктопической. В связи с этим для проведения сравнительного анализа экспрессии нами были получены трансгенные растения арабидопсиса с генетической конструкцией, в которой ген *uidA* находился под управлением промотора гена *ap3*.

Анализ показал, что у трети первичных (T_1) трансформантов арабидопсиса GUS-окрашивание на стадии проростков, свидетельствующее об экс-

прессии гена *uidA*, наблюдалось в котиленолах, первых настоящих листьях, а также гипокотильях и корнях (рис. 5 а, б). Интересно отметить, что иногда были окрашены только кончики настоящих листьев, а не листовая пластинка целиком.

В корневой системе трансгенных проростков арабидопсиса окрашивание проявлялось неравномерно. Часть корней была окрашена, а часть нет, причем даже в пределах одного корешка присутствовала мозаичность окрашивания в виде чередования окрашенных и неокрашенных сегментов (см. рис. 5 б, в). В большей части первичных трансформантов активности гена *uidA* на стадии проростков зафиксировано не было (см. рис. 5 з). Однако при переходе к цветению у всех без исключения трансгенных растений арабидопсиса ген *uidA* экспрессировался в цветочных бутонах (см. рис. 5 д, е), что является нормой.

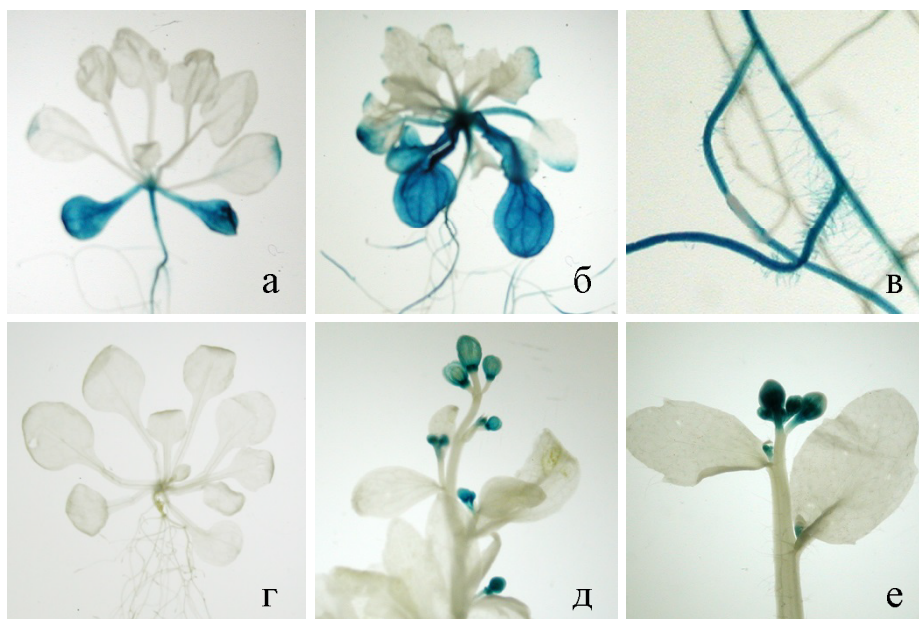


Рис. 5. Варианты экспрессии гена *uidA* под управлением промотора *ap3* в проростках T₁ трансформантов арабидопсиса:

а, б – экспрессия в котилендах, первых настоящих листьях, гипокотильях и корнях; в – отсутствие экспрессии в проростках трансгенных растений; г, д – экспрессия в бутонах; е – экспрессия в корнях

Variants of *uidA* gene expression under control of *ap3* promoter site in the sprouts T₁ of *arabidopsis thaliana* transformants:

a, b – expression in the seed leaves, the first leaves, hypocotyls and roots; c – lack of expression in the sprouts of transgenic plants; d, e – expression in flower buds; f – expression in the roots

Отсутствие экспрессии трансгенов может быть вызвано как нарушениями в области Т-ДНК, возникающими в процессе агробактериального переноса, так и замолканием генов, входящих в состав Т-ДНК [9–11]. Таким образом, отличия в частоте фенотипического проявления репортерного гена могут свидетельствовать как о различной активности используемых промоторов в новом генетическом окружении, так и об особенностях встраивания трансгенов в геном [12].

Ранее было установлено, что промотор гена *rpt2a* обеспечивает накопление мРНК во всех меристемах растений арабидопсиса, в том числе и флоральной [5, 6]. Аналогичная ситуация обнаруживалась и в онтогенезе трансгенных растений табака. При переключении апикальной меристемы побега с вегетативной активности на генеративную промотор *rpt2a* обеспечивал экспрессию репортерного гена в закладывающейся флоральной меристеме.

В растениях арабидопсиса в отличие от гена *rpt2a*, активность которого ограничивается преимущественно апикальными меристемами корня и стебля, ген *ap3* активен в цветочных меристемах и кодирует фактор транскрипции группы В,

обеспечивающий развитие лепестков и тычинок в цветках арабидопсиса [3, 4]. В зрелых трансгенных растениях табака Т₀ промотор гена *ap3* также обеспечивал экспрессию репортерного гена только в клетках флоральной меристемы и развивающихся цветках, однако ее локализация по сравнению с цветками арабидопсиса большей частью была эктопической (см. табл. 3). Так, в развивающихся бутонах табака GUS-окрашивание обнаруживалось в цветоножках, чашелистиках и рыльце пестика, несмотря на то, что в развитии этих элементов цветка участвуют другие гены флорального морфогенеза [13]. Более того, промотор гена *ap3* оказался неактивен в тычинках, а в лепестках его активность обнаруживалась на очень низком уровне и только у нескольких из полученных трансформантов.

Используемые промоторы обеспечивали экспрессию репортерного гена в вегетативных тканях проростков трансгенных растений Т₁, полученных от самоопыления первичных трансформантов, включая котиленоны, первые настоящие листья, гипокотиль и корни. Однако если для промотора гена *rpt2a* такой тип экспрессии является нормой, то для промотора гена *ap3*, кодирующего

фактор транскрипции флорального морфогенеза арабидопсиса, экспрессия в меристемах и тканях вегетативных органов является эктопической и не описана в научной литературе.

Известно, что количество инсерций Т-ДНК может оказывать значительное влияние на экспрессию трансгена и соответственно на его фенотипическое проявление, крайними вариантами которого могут быть как замолкание, так и сверхэкспрессия [10, 11]. Согласно полученным результатам, присутствие в геноме нескольких копий трансгена под управлением промоторов, специфических для меристем, возможно, обладает аддитивным эффектом, что ведет к усилению экспрессии и накоплению продукта репортерного гена в тканях трансгенных растений табака.

Функциональность промотора и специфичность действия обуславливаются наличием в его структуре цис-регуляторных элементов – коротких нуклеотидных последовательностей, обеспечивающих взаимодействие с различными транскрипционными факторами [3, 14, 15]. Таких последовательностей в области промотора может быть несколько [14, 15]. При переносе промотора в геном другого вида взаимодействие регулятор-

ных элементов и транскрипционных факторов изменяется, что может являться причиной эктопической экспрессии трансгенов.

ВЫВОДЫ

1. Использование промоторов генов *apetala3* и *rpt2a* арабидопсиса в составе генетических конструкций позволяет обеспечить тканеспецифическую экспрессию трансгенов в условиях чужеродного генома.

2. В зависимости от типа используемого промотора может наблюдаться проявление эктопической экспрессии трансгена, которая, тем не менее, ограничивается зонами меристем в органах трансгенного растения.

3. Увеличение числа инсерций трансгена может повышать уровень экспрессии целевого гена под управлением меристематических промоторов. Однако это утверждение требует дальнейших исследований.

Работа поддержана программой СО РАН «Генетические основы биотехнологий и биоинформатика» (№ 0324–2016–0008).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Potenza C., Aleman L., Sengupta-Gopalan Ch. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2004. – Vol. 40. – P. 1–22.
2. Two tobacco *AP1*-like gene promoters drive highly specific, tightly regulated and unique expression patterns during floral transition, initiation and development / J. Zhang, G. Yan, Z. Wen [et al.] // Planta. – 2014. – Vol. 239. – P. 469–478.
3. Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3* / Th.A. Hill, Ch.D. Day, S.C. Zondlo [et al.] // Development. – 1998. – Vol. 125. – P. 1711–1721.
4. Krizek B.A., Meyerowitz E.M. The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function // Development. – 1996. – Vol. 122. – P. 11–22.
5. Regulation of leaf organ size by the *Arabidopsis* RPT2a 19S proteasome subunit / Y. Sonoda, K. Sako, Y. Maki [et al.] // The Plant Journal. – 2009. – Vol. 60. – P. 68–78.
6. The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems / M. Ueda, K. Matsui, S. Ishiguro [et al.] // Development. – 2004. – Vol. 131. – P. 2101–2111.
7. A simple and general method for transferring genes into plants / R. B. Horsch, J. E. Fry, N. I. Hoffmann [et al.] // Science. – 1985. – Vol. 227. – P. 1229–1231.
8. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method / X. Zhang, R. Henriques, S. Lin [et al.] // Nature Protocols. – 2006. – Vol. 1. – P. 641–646.
9. Дейнеко Е.В., Загорская А.А., Шумный В.К. Т-ДНК-индуцированные мутации у трансгенных растений // Генетика. – 2007. – Т. 43, № 1. – С. 5–17.
10. Дорохов Ю.Л. Умолкание генов у растений // Молекулярная биология. – 2007. – Т. 41, № 4. – С. 579–592.

11. Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В. Инактивирование генов у растений на уровне транскрипции // Генетика. – 2010. – Т. 46, № 5. – С. 581–592.
12. Филипенко Е.А., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Особенности районов встраивания Т-ДНК у трансгенных растений // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 11. – С. 1461–1475.
13. Causiera B., Schwarz-Sommer Z., Davies B. Floral organ identity: 20 years of ABCs // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2010. – Vol. 21. – P. 73–79.
14. An intergenic region shared by *At4g35985* and *At4g35987* in *Arabidopsis thaliana* is a tissue specific and stress inducible bidirectional promoter analyzed in transgenic arabidopsis and tobacco plant / J. Banerjee, D.K. Sahoo, N. Dey [et al.] [Electronic resource] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, No 11. – e79622. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834115>.
15. Novel green tissue-specific synthetic promoters and *cis*-regulatory elements in rice / R. Wang, M. Zhu, R. Ye [et al.] [Electronic resource] // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5:18256. – DOI: 10.1038/srep18256. – URL: <https://www.nature.com/articles/srep18256.pdf>.

REFERENCES

1. Potenza C., Aleman L., Sengupta-Gopalan Ch., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 2004, No. 1 (40), pp. 1–22.
2. Zhang J., Yan G., Wen Z., An Y. – Q., Singer S.D., Liu Z., *Planta*, 2014, No. 2 (239), pp. 469–478.
3. Hill Th.A., Day Ch.D., Zondlo S.C., Thackeray A.G., Irish V.F., *Development*, 1998, No. 9 (125), pp. 1711–1721.
4. Krizek B.A., Meyerowitz E.M., *Development*, 1996, No. 1 (122), pp. 11–22.
5. Sonoda Y., Sako K., Maki Y. Yamazaki N., Yamamoto H., Ikeda A., Yamaguchi J., *The Plant Journal*, 2009, No. 1 (60), pp. 68–78.
6. Ueda M., Matsui K., Ishiguro S., Sano R., Wada T., Paponov I., Palme K., Okad K., *Development*, 2004, No. 9 (131), pp. 2101–2111.
7. Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.I., Eichholtz D., Rogers S.G., Fraley R.T., *Science*, 1985, No. 4691 (227), pp. 1229–1231.
8. Zhang X., Henriques R., Lin S., Niu Q. – W., Chua N. – H., *Nature Protocols*, 2006, No. 2 (1), pp. 641–646.
9. Deineko E.V., Zagorskaya A.A., Shumnyi V.K., *Genetika*, 2007, No. 1 (43), pp. 5–17. (In Russ.)
10. Dorokhov Yu.L., *Molekulyarnaya biologiya*, 2007, No. 4 (41), pp. 579–592. (In Russ.)
11. Marenkova T.V., Deineko E.V., *Genetika*, 2010, No. 5 (46), pp. 581–592. (In Russ.)
12. Filipenko E.A., Deineko E.V., Shumnyi V.K., *Genetika*, 2009, No. 11 (45), pp. 1461–1475. (In Russ.)
13. Causiera B., Schwarz-Sommer Z., Davies B. Floral organ identity: 20 years of ABCs, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, No. 1 (21), pp. 73–79. (In Russ.)
14. Banerjee J., Sahoo D.K., Dey N., Houtz R.L., Maiti I.B. An intergenic region shared by *At4g35985* and *At4g35987* in *Arabidopsis thaliana* is a tissue specific and stress inducible bidirectional promoter analyzed in transgenic arabidopsis and tobacco plant, *PloS One*, 2013, No. 11 (8), e79622, available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834115>.
15. Wang R., Zhu M., Ye R., Liu Z., Zhou F., Chen H., Lin Y. Novel green tissue-specific synthetic promoters and *cis*-regulatory elements in rice, *Scientific Reports*, 2015, Issue 5, 18256 p., available at: <http://www.nature.com/articles/srep18256.pdf>.