

На правах рукописи

Тимербаев Вадим Рафаилович

**СОЗДАНИЕ БЕЗМАРКЕРНЫХ РАСТЕНИЙ ТОМАТА
И ЯБЛОНИ С ГЕНОМ СУПЕРСЛАДКОГО БЕЛКА**

Специальность 03.01.03 Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Долгов Сергей Владимирович, д.б.н., заведующий лабораторией экспрессионных систем и модификации генома растений ФИБХ РАН

Официальные оппоненты:

Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, д.б.н., руководитель группы функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Камионская Анастасия Михайловна, к.б.н., руководитель группы биоинженерии растений Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук

Защита состоится 10 июня 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте ИБХ РАН по адресу: <http://www.ibch.ru>

Автореферат разослан « » апреля 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного
совета, д.ф.-м.н.



Олейников
Владимир
Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на отсутствие доказательств опасности генетически модифицированных организмов, присутствие генов устойчивости к антибиотикам и других маркерных генов в трансгенных растениях вызывает обеспокоенность в обществе из-за связанных с ними потенциальных рисков для окружающей среды и здоровья человека. Присутствие в генетически модифицированных растениях последовательностей вирусного и бактериального происхождения также принимаются потребителями с большой опаской. Помимо этого, наиболее часто используемые в генной инженерии растений, конститутивные промоторы имеют ряд недостатков при выращивании растений в промышленных масштабах. Создание трансгенных растений, которые не содержат чужеродного генетического материала, особенно бактериального и вирусного происхождения, в значительной степени снижает напряженность и делает такие растения более привлекательными для потребителей. Для получения новых сортов трансгенных растений с хозяйственно ценными признаками зачастую необходимо обеспечить высокий уровень экспрессии целевого гена, за что, в первую очередь, отвечает такой регуляторный элемент гена как промотор. Поэтому важной частью современной биотехнологии растений стали работы, направленные на поиск и исследование новых тканеспецифичных промоторов, под контролем которых экспрессия генов осуществляется непосредственно в конкретных тканях или на определенных стадиях развития растения.

Сладость плодов является одним из основных факторов потребительских предпочтений, поэтому улучшение вкусовых качеств овощей и фруктов, а также повышение их сладости является важной темой в программах по селекции и выращиванию плодовых культур. В условиях климата России это актуально, как для яблони, так и для томата.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на увеличение количества генно-инженерных форм растений и их очевидную экономическую целесообразность, такие культуры довольно настороженно принимаются обществом, в первую очередь благодаря наличию чужеродного генетического материала от эволюционно отдаленных организмов (бактерий, вирусов и т.д.). В этих условиях особое значение придается методам, с помощью которых можно создавать новые высокопродуктивные формы сельскохозяйственных культур без чужеродного генетического материала, в основном вирусного и бактериального происхождения, и без генов устойчивости к антибиотикам.

Один из таких способов – позитивная селекция, при которой трансформированные клетки получают преимущество, например

маркерный ген кодирует фермент, который превращает селективный агент в метаболически доступную форму, или использование альтернативных источников питательных веществ. Стратегии удаления маркерных генов из ядерного генома представляют собой принципиально иной подход. Они включают в себя совместную трансформацию трансгенов (котрансформация) с последующей сегрегацией (Daley et al., 1998), удаление маркерных генов с помощью транспозонов (Goldsbrough et al., 1993) и стратегии, основанные на сайт-специфической рекомбинации, которые позволяют вырезать нежелательную ДНК после соответствующей активации (Gleave et al., 1999). В большинстве случаев используются следующие системы: Cre/lox фага P1, система рекомбиназы FLP/FRT из *Saccharomyces cerevisiae* и система рекомбиназы R/RS из *Zygosaccharomyces rouxii*. Несмотря на широкое использование этих векторов для получения трансгенных растений разных культур, не так много работ было посвящено получению растений без маркеров с полезными свойствами, например, для томата есть сообщения об успешном использовании Cre/loxP-системы удаления ДНК (Zhang et al., 2006, 2009; Ma et al., 2008) и R/RS рекомбинации на основе векторной системы мультиавтотрансформации (MAT, Khan et al., 2011).

В последнее время все больший интерес к плодоспецифичным промоторам связан как с улучшением качества плодов, так и с получением съедобных вакцин. Томат является удобной растительной системой для производства в плодах рекомбинантных субстанций для медицины и ветеринарии. Среди наиболее охарактеризованных и часто используемых плодоспецифичных плодов томата можно выделить промоторы следующих генов: полигалактуроназы (*PG*), *E4* и *E8*, *2A11*, липоксигеназы, аминокциклопропанкарбоксилат синтазы 4, аминокциклопропанкарбоксилат оксидазы 1 (*LeACO1*), а также экспанзина. В большинстве работ, связанных с плодоспецифичной экспрессией в растениях томата, довольно успешно использовали промоторы *E8* и *2A11* (Pandey et al., 2014; Huang et al., 2015; Sagor et al., 2015), которые, тем не менее, имеют ряд недостатков. Например, *2A11* строго зависит от концентрации этилена, а *E8* не обладает полной плодовой специфичностью (Тимербаев et al., 2019). Недостатком промотора гена *LeACO1* является минорная активность в стареющих листьях, цветках и в местах поранений (Blume and Grierson, 1997). Промотор гена *PG* длиной около 1400 п.н. специфично направляет экспрессию контролируемого гена в ткани созревающего плода (Bird et al., 1988), однако сила промотора недостаточна для обеспечения высокого уровня экспрессии в плодах томата (Тимербаев и Долгов, 2011). Несмотря на активный поиск сильных тканеспецифичных промоторов и интенсивное изучение регуляторных элементов растений, выбор таких промоторов остается невелик, особенно учитывая недостатки каждого из них по отдельности.

Усилить (улучшить) вкус плодов томата и яблони (за счет придания им пикантного сладкого вкуса) и тем самым повысить их потребительскую привлекательность возможно за счет экспрессии в растениях гена такого суперсладкого белка как тауматин. К настоящему времени с геном белка тауматина создано достаточно большое количество видов растений, часть из них являются сельскохозяйственными культурами (см. обзор Firsov et al., 2018). Однако во всех этих работах исследователи использовали вирусный конститутивный промотор.

Цели и задачи

Целью данного исследования было получение безмаркерных растений томата и яблони, экспрессирующих ген суперсладкого белка тауматина II, под контролем плодоспецифичных промоторов, при этом не содержащих нерастительных функциональных последовательностей ДНК. Для решения цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) клонировать регуляторные элементы томата (сильный плодоспецифичный промотор, терминатор);
- 2) создать серию делеционных вариантов промотора и сконструировать бинарные векторы с репортерным геном β -глюкуронидазы (*gusA*);
- 3) получить трансгенные растения томата с геном *gusA*;
- 4) провести функциональный анализ, а также охарактеризовать новый промотор томата;
- 5) создать бинарные векторы с геном суперсладкого белка тауматина II;
- 6) подобрать условия для индукции рекомбиназы и проведения негативной селекции;
- 7) провести агробактериальную трансформацию томата и яблони;
- 8) получить безмаркерные растения томата с применением двух схем селекции, а также безмаркерные растения яблони;
- 9) подтвердить элиминацию селективных генов и присутствие целевых генов;
- 10) показать экспрессию целевого гена.

Научная новизна

Впервые клонирован и охарактеризован промотор гена раннего светоиндуцибельного белка (ELIP) томата. В его последовательности выявлены цис-регуляторные элементы. Функциональный анализ промотора *ELIP* выявил, что «полная» (условно названная так в настоящем исследовании) версия промотора способна обеспечивать высокий уровень экспрессии репортерного гена в спелых плодах томата. Впервые промотор *ELIP* использован для целевой наработки белка в плодах томата. Впервые показано, что классический промотор томата *E8* не обладает строгой плодовой специфичностью. Впервые получены безмаркерные растения томата и яблони, экспрессирующие ген суперсладкого белка тауматина

под контролем преимущественно плодоспецифичных промоторов. Растения при этом не содержат генетических элементов нерастительного происхождения.

Теоретическая и практическая значимость работы

Описанный промотор *ELIP* может быть использован для обеспечения высокого уровня экспрессии целевых генов в плодах томата и других видов плодовых культур, а также для производства различных белков и пищевых вакцин в растениях. Также возможно, что обнаруженные участки ДНК, общие для промотора *ELIP* и некоторых других плодоспецифичных промоторов, являются потенциальными цис-регуляторными элементами. Выявленные последовательности, возможно, позволят в дальнейших исследованиях идентифицировать новые регуляторные мотивы. Представленные результаты исследования открывают новые знания о взаимосвязи между структурой и функцией промоторных регионов генов растений.

В настоящем исследовании разработаны протоколы, которые позволяют получить безмаркерные растения томата и яблони, с использованием системы *rMF1*. Полученные при разработке протоколов данные позволили выявить недостатки, а также тонкие методологические особенности системы отбора безмаркерных растений, что позволит в будущем планировать и проводить эксперименты с большей эффективностью.

При благоприятных изменениях законодательства РФ, регулирующего ГМО, созданные растения возможно будет использовать как исходный материал для коммерциализации новых сортов и выпуска их в открытые системы.

Методы исследования

Диссертационная работа выполнена с использованием широкого спектра как классических, так и современных методов культуры клеток и тканей растений, методов генетической инженерии, биотехнологии и молекулярной биологии, среди которых клонирование ДНК, *in silico* анализ последовательности ДНК с применением баз данных и программ, доступных в сети интернет, агробактериальная трансформация растений, гистохимическое окрашивание тканей, флюориметрия, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР, сопряженная с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), количественная ПЦР в реальном времени, Саузерн-блоттинг, вестерн-блоттинг и иммуноферментный анализ.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) новый промотор гена *ELIP* обеспечивает высокий уровень экспрессии репортерного гена в созревающих плодах томата;
- 2) система *rMF1* применима для создания безмаркерных растений томата и яблони, однако имеется ряд объективных ограничений, снижающих эффективность системы;

3) в плодах безмаркерных растений томата происходит стабильная экспрессия гена тауматина, они приобретают характерный сладкий вкус;

4) накопление целевого белка составляет до 3,7% от общего растворимого белка при использовании полной версии промотора *ELIP*;

5) в листьях безмаркерных линий яблони наблюдается экспрессия гена тауматина, что позволяет предполагать высокий уровень белка в плодах.

Личный вклад автора

При участии научного руководителя автор спланировал все представленные эксперименты и провел основную часть работы (кроме получения первичных трансгенных растений яблони, Саузерн- и вестерн-блоттингов и иммуноферментного анализа). Автор также провел обработку полученных данных и обобщение результатов. Автор подготовил публикации к печати, проанализировал литературу и написал настоящую диссертацию.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: XV Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2015; работа завоевала 1 место), 3 Международная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» (Новосибирск, 2015), VII и VIII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты)» (Ялта, 2016, 2018), I Международный яблочный симпозиум (I International Apple Symposium, Янли, Китай, 2016), 3 Глобальный саммит науки о растениях (3rd Global Summit on Plant Science, Рим, Италия, 2017), I Международная конференция и X Национальный конгресс по садоводству в Иране (I International Conference & X National Horticultural Science Congress of Iran, Тегеран, Иран, 2017), XXX Международный садоводческий конгресс (XXX International Horticultural Congress, Стамбул, Турция, 2018), Конгресс международной ассоциации биотехнологии растений (International Association for Plant Biotechnology Congress, Мельбурн, Австралия, 2014; Дублин, Ирландия, 2018).

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 22 рисунка и 12 таблиц; список литературы состоит из 197 источников, из них 195 на английском языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

Обзор литературы представлен в первой главе диссертации и состоит из трех подразделов: промоторы генов растений, способы получения безмаркерных трансгенных растений, суперсладкий белок тауматин и его использование в биоинженерии растений. В обзоре литературы дается анализ современной научной литературы по заявленным тематикам.

2. Материалы и методы

Во второй главе диссертации подробно представлены материалы и методы, использованные в научной работе. В качестве объекта исследований выступили растения томата (*Solanum lycopersicum*) гибридной линии Ялф, предоставленные Г.Ф. Монахосом (Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва), а также растения гибрида яблони (*Malus domestica*), полученные в результате свободного опыления сорта Мельба из Центральной генетической лаборатории (Мичуринск).

Клонирование нового промотора *ELIP* томата осуществляли с применением стандартных методов клонирования ДНК, анализ его последовательности проводили с помощью баз данных, доступных в сети интернет. Далее описано как были созданы семь делеционных вариантов промотора, а также бинарные векторы с репортерным геном *gusA*. Трансформацию томата осуществляли с помощью агробактерий и проводили функциональный анализ промотора *ELIP* с помощью методов гистохимического окрашивания тканей и количественной флюориметрии.

Описано создание бинарных векторов с геном суперсладкого белка тауматина II под контролем преимущественно плодоспецифичных промоторов томата *E8* и нового *ELIP*. Векторы pMF-E8 и pMF-ELI были созданы на основе вектора pMF1 (WPR, Вагенинген, Нидерланды), который содержит рекомбиназу R из дрожжей *Zygosaccharomyces rouxii*, слитую с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора и бифункциональный селективный ген *CodA-nptII*, позволяющий осуществлять отбор растений путем отрицательной селекции на 5-фторцитозина (5-ФЦ) после удаления нежелательного участка ДНК из генома. Затем приведены методики трансформации томата и яблони. Первичный молекулярно-биологический анализ трансгенных растений осуществляли с помощью методов ПЦР и Саузерн-блоттинга. Далее описаны методы отбора безмаркерных линий томата и яблони, включающие подбор концентраций селективного агента 5-фторцитозина, активацию рекомбиназы дексаметазоном и саму селекцию регенерантов. После первичного молекулярно-биологического анализа проведена оценка экспрессии перенесенных генов. Для томата она была осуществлена с

помощью полимеразной цепной реакции, сопряженная с обратной транскрипцией, вестерн блоттинга и иммуноферментного анализа. Для яблони использовали также метод полуколичественной ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени.

3. Результаты и обсуждение

Третья глава диссертации посвящена результатам исследований, а четвертая их обсуждению. Здесь краткое изложение обеих глав представлено в одном разделе.

3.1. Клонирование и анализ промотора *ELIP* томата

Светоиндуцибельный белок ELIP был впервые идентифицирован в горохе как белок, который накапливается после освещения этиолированного растения (Meyer and Kloppstech, 1984). Белки ELIP присутствуют в тилакоидной мембране фракции хлоропластов (Grimm et al., 1987; Cronshagen and Herzfeld, 1990). Их кодирующие гены в настоящее время идентифицированы в геномах многих видов растений и детально изучены. Экспрессия этих генов активируется как одним светом, так и в сочетании с другими стрессами (Adamska and Kloppstech, 1991; Zeng et al., 2002), гормонами (Wiestra and Kloppstech, 2000), а также при развитии и старении растений (Binyamin et al., 2001; Noren et al., 2003). Считается, что белки обладают фотозащитной функцией, а также участвуют в восстановлении фотосинтетического аппарата (Berti and Pinto, 2012). Также обнаружено, что белки ELIP играют роль в транзициях хлоропласта в хромопласт в созревающих плодах томата. Известно, что количество мРНК гена *ELIP* резко возрастает к бланжевой стадии развития плода (Bruno and Wetzell, 2004), это побудило нас исследовать промотор гена *ELIP* и провести его функциональную характеристику как потенциально сильного, специфичного для созревания промотора.

С геномной ДНК *S. lycopersicum* амплифицировали фрагмент 5'-области гена *ELIP* томата размером 2165 п.н., клонировали и секвенировали; затем нуклеотидную последовательность промотора депонировали в NCBI (GenBank № MK867692).

Анализ последовательности с использованием баз данных PLACE и PLANTCARE показал, что промоторная область длиной 2165 п.н. содержит, по меньшей мере, 34 типа цис-регуляторных мотивов, ранее также идентифицированных в других промоторах растений. Обнаруженный коровый элемент TATA-box (TATAAAT) в положении –140 п.н. указывает на наличие 5'-нетранслируемой области; было предсказано расположение сайта инициации транскрипции в положении –110 п.н.

Для функционального анализа промотора гена *ELIP* было сконструировано семь делеционных вариантов в соответствии с расположением и плотностью цис-элементов в последовательности ДНК

(Рисунок 1). Они были слиты с репортерным геном *gusA* и интродуцированы в томат. Вектор pBI121 с геном *gusA* под контролем CaMV35S использовали в качестве положительного контроля. Для определения гистохимической локализации продукта репортерного гена были проанализированы следующие органы: лист, стебель, цветок, а также фрагменты корня. CaMV35S обеспечивал интенсивное окрашивание во всех тестируемых тканях трансгенных растений.

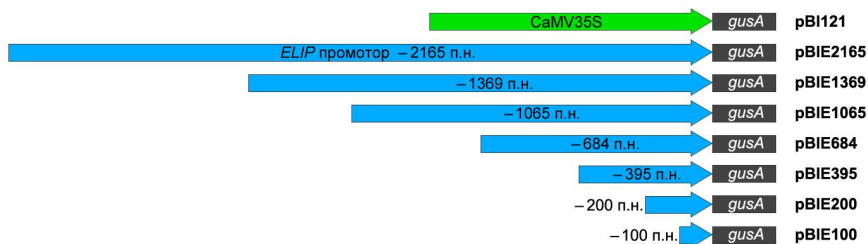


Рисунок 1 – Схематическое изображение делеционных вариантов промотора *ELIP* слитых с репортерным геном *gusA*. Вектор pBI121 содержит промотор CaMV35S. Цифры слева указывают на положение 5'-укорочений. Справа приведены названия соответствующих векторов.

Растения, трансформированные pBIE200, проявляли заметную активность GUS в цветах; при этом окрашивание было очень слабым в других тканях. Значительное увеличение активности GUS наблюдалось в линии, экспрессирующей pBIE395; окрашивание было слабым в листьях и стеблях, но достаточно интенсивным в цветах. С увеличением длины промотора до 680 п.н. активность репортерного гена в листьях снижалась до почти неопределяемого уровня. Максимальное окрашивание в листьях (в серии *ELIP::gusA*) наблюдалась в растениях с pBIE1369, однако интенсивность была заметно слабее, чем в растениях с 35S промотором. Три протяженные формы *ELIP* демонстрировали сходное (интенсивное) окрашивание стеблей и цветов, при этом оно отсутствовало в корнях.

Далее мы провели гистохимическое окрашивание плодов томата на разных стадиях созревания (Рисунок 2). Окрашивания не наблюдалось в плодах растений с самым коротким фрагментом промотора *ELIP*. Более длинная версия промотора (–200 п.н.) обеспечивала очень слабую экспрессию репортерного гена в плодах на всех стадиях созревания. В незрелых зеленых плодах активность GUS была почти недетектируемой. Удлинение промотора до –395 п.н. заметно повышало уровень экспрессии *gusA*. В плодах растений с промоторным вариантом –684 п.н. активность GUS резко снижалась, оставаясь в эпидермисе и экзокарпе плодов томата.

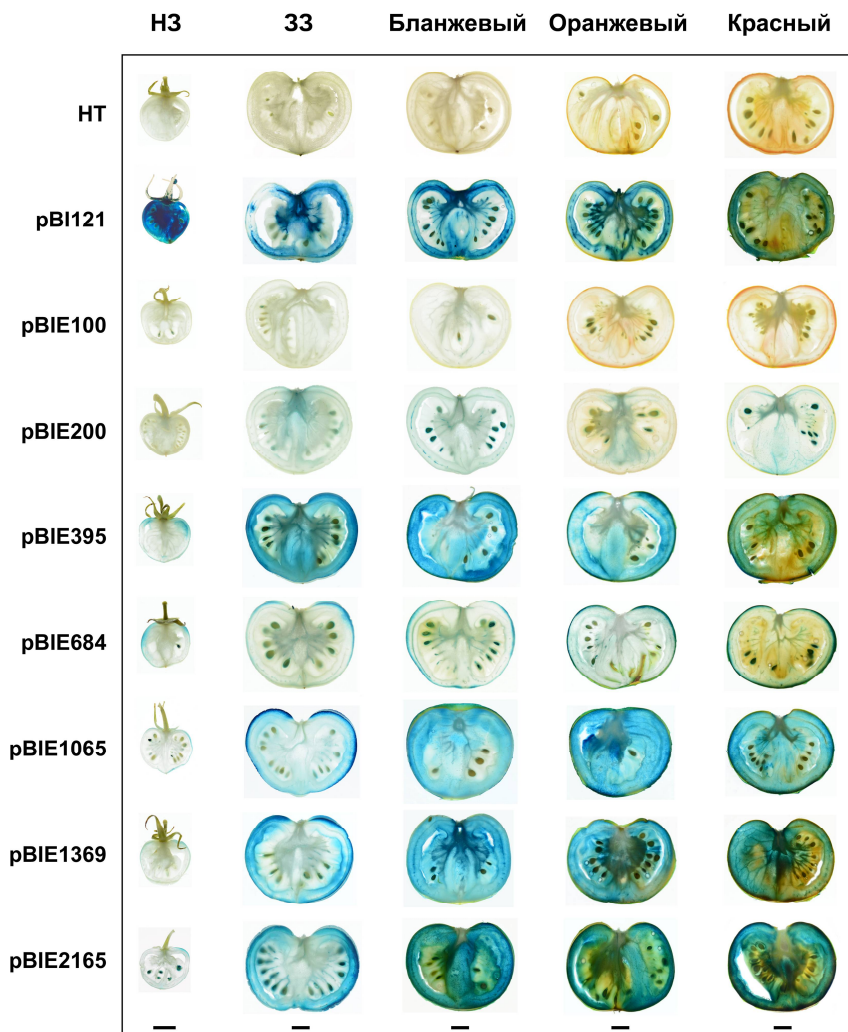


Рисунок 2 – Гистохимический анализ активности GUS в плодах томата. Анализировали плоды на следующих стадиях созревания: зеленая незрелая (НЗ), зеленая зрелая (ЗЗ), бланжевая, оранжевая и красная стадии созревания. pBI121 – плоды трансгенных растений с геном *gusA*, под контролем CaMV35S промотора; НТ – плоды нетрансформированных растений томата. Остальные названия – плоды растений с соответствующими делеционными вариантами промотора *ELIP*. Представлены изображения репрезентативных трансгенных линий. Масштабные линейки – 1 см.

Преобладающая экспрессия в коже плодов растений, несущих рВIE684, свидетельствует о том, что в области между -395 и -684 п.н. присутствуют негативные регуляторные мотивы. В этой версии промотора встречается несколько цис-элементов, ответственных за регуляцию светом, например, GATABOX, IBOXCORE, INRNTPSADB и -10PEHVPSBD. В то же время небольшое количество мотивов СААТ-бокса (9 из 28 в полноразмерном промоторе), известных как энхансерные области, и отсутствие этиленчувствительного элемента (ERE) не позволяют экспрессии быть направленной во все плодовые ткани при созревании (см. обзор Dutt et al., 2014). Промоторы генов *LeACO1* и *E4* содержат, по меньшей мере, одну копию ERE (Itzhaki et al., 1994; Montgomery et al., 1993). Автокаталитическая активация этиленом многих генов, связанных с созреванием, приводит к многократному увеличению их экспрессии во время созревания плодов (Abeles et al., 1992). Следовательно, элемент ERE можно отнести к сильным энхансерам в промоторах генов климактерических растений, и его присутствие позволяет предсказать преимущественно плодоспецифический паттерн экспрессии генов.

Остальные формы промотора *ELIP* (-1065 п.н. и -1369 п.н.) и полноразмерная (-2165 п.н.) версия демонстрировали сходные паттерны экспрессии. Линии растений, несущие конструкции с полноразмерным промотором, показали более высокую экспрессию *gusA*, начиная с бланжевой стадии и позже, чем с другими вариантами промотора *ELIP*.

Количественный анализ активности GUS выявил, что экспрессия репортерного гена под контролем 35S промотора была высокой и относительно неизменной независимо от стадии созревания плодов (Рисунок 3). Самая слабая активность GUS на одинаковом уровне была обнаружена в незрелых зеленых плодах. Начиная со стадии зеленой зрелости, в растениях, трансформированных рВIE200, не было отмечено увеличения активности репортерного гена при созревании. Активность GUS снижалась примерно в 1,5 раза при увеличении длины промотора с -395 до -684 п.н. Последующее удлинение промотора уже значительно увеличивало активность репортерного гена в трансгенных растениях. При созревании плодов, начиная со зрелой зеленой стадии, экспрессия гена *gusA* увеличивалась, достигая максимума на красной стадии. Наибольшая активность GUS среди растений, несущих различные варианты промотора *ELIP*, наблюдалась в плодах красной спелости в растениях с рВIE2165. Уровень экспрессии *gusA* в них при этом был незначительно (недостоверно) ниже, чем для 35S промотора.

Экспрессия гена *gusA* в тканях зеленых растений может быть объяснена наличием большого количества элементов АСТФТРРСА1. АСТФТРРСА1 является ключевым компонентом модуля 1 экспрессии мезофилла (Mem1). Известно, что он определяет специфическую для мезофилла экспрессию фосфоенолпируваткарбоксилазы в двудольном С4-

растении *Flaveria trinervia* (Gowik et al., 2004). Этот тип элемента был также идентифицирован в некоторых других промоторах растений (Hatorangan et al., 2009; Li et al., 2014; Sharma et al., 2011). CACTFTPPCA1 является наиболее распространенным цис-элементом в промоторе гена *ELIP*, что не является неожиданным, поскольку *ELIP* является хлоропластным белком.

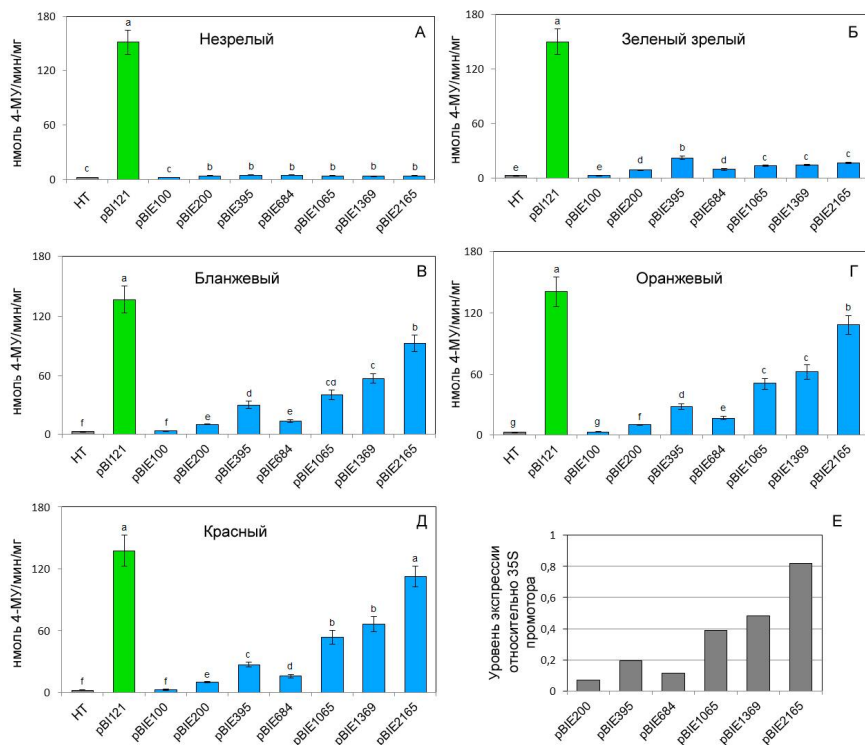


Рисунок 3 – Количественный флюориметрический анализ экспрессии *gusA* в плодах томата. НТ – нетрансформированные растения; pBI121 – растения с конститутивным 35S промотором; серии pBIE – растения с различными вариантами промотора *ELIP*. А–Д – разные стадии спелости плодов; Е – сила различных вариантов промотора *ELIP* относительно 35S в плодах на стадии красной спелости. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение от пяти независимых трансгенных линий на конструкцию. Различные буквы над столбцами обозначают значимые различия при $p < 0,05$.

Результаты, представленные в этом исследовании, собранные данные и более точное картирование функциональных элементов промотора *ELIP* расширяют знания о регуляции сильных индуцибельных промоторов.

3.2. Создание безмаркерных растений томата

Несмотря на более чем 20-летнюю историю разработки и применения сайт-специфических рекомбиназ для получения безмаркерных растений, на томате было проведено не так много исследований. Среди имеющихся есть сообщения об успешном использовании Cre/loxP-системы удаления ДНК (Zhang et al., 2006, 2009; Ma et al., 2008) и R/RS-системы рекомбинации на основе векторной системы MAT (Khan et al., 2011).

Для получения безмаркерных трансгенных растений томата мы использовали вектор рMF1, содержащий (помимо селективных) ген белка тауматина II из тропического растения *T. daniellii* под контролем промоторов *ELIP* и *E8* томата и терминатора гена *rbcS* томата (Рисунок 4).

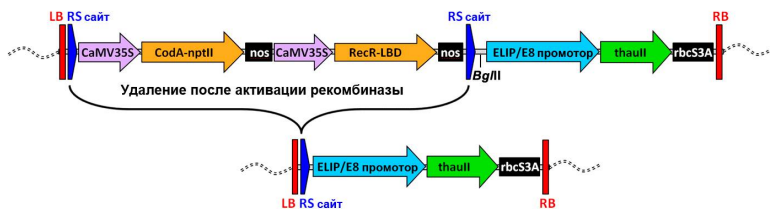


Рисунок 4 – Схематическое изображение области Т-ДНК векторов рMF-E8 и рMF-ELI до и после удаления последовательности ДНК, фланкированной сайтами рекомбинации. *BglII* – положение сайта рестрикции, по которому была расщеплена ДНК для анализа методом Саузерн-блоттинга.

Мы применили две стратегии отбора безмаркерных трансгенных растений томата. При ранней селекции с использованием векторов рMF-ELI и рMF-E8, в общей сложности 65 и 90 зеленых и плотных устойчивых к канамицину каллусов было получено, соответственно. В каллусах дексаметазоном проводили индукцию рекомбиназной активности и переносили на среду для регенерации с 250 мг/л 5-ФЦ. Из 155 каллусов только 40 дали побеги, которые преодолели селективный отбор. Всего мы получили 116 линий и проанализировали их с помощью ПЦР на предмет удаления нежелательной ДНК и наличия целевых последовательностей генов. Из 65 сублиний, полученных с использованием вектора рMF-ELI, 40 оказались нетрансгенными эскейпами, 24 были трансгенными, в которых присутствует ген *nptII*, и только 1 растение оказалось потенциально безмаркерным. Из 51 сублинии, полученной с использованием вектора рMF-E8, 43 растения были нетрансгенными, 8 – трансгенными, и не было получено растений без маркеров. Таким образом, используя стратегию раннего отбора, из 155 независимых устойчивых к канамицину каллусов была получена только одна предположительно не содержащая маркеров сублиния с корректно вырезанной ДНК, названная el-XI-14. Низкая эффективность быстрой селекции без получения стабильных трансгенных

растений, обусловлена, прежде всего, неоднородностью каллусов, использованных в экспериментах. Несмотря на тщательный отбор и визуальный контроль, не удалось получить каллусы, которые не содержали нетрансгенных клеток. Это привело к тому, что 72% растений в результате оказались нетрансформированными эскейпами. Двадцать семь процентов оставшихся побегов, преодолевших селекцию, содержали гены из нежелательной области Т-ДНК, что указывает на слабое селективное давление выбранной концентрации 5-ФП; несмотря на то, что в предварительных экспериментах при 250 мг/л регенерация была полностью подавлена, для стратегии раннего отбора эта концентрация оказалась недостаточной.

Другая использованная в работе стратегия с отсроченной селекцией растений без маркеров предполагает получение стабильных трансформантов и последующие манипуляции с ними. Для этого было получено всего 114 трансгенных линий томата после двух трансформаций (Рисунок 5, А-В). Чуть менее половины из общего числа, 55 линий, содержали неполную область Т-ДНК. В этих растениях отсутствовала последовательность сайта рекомбинации при левом бордере (LB).

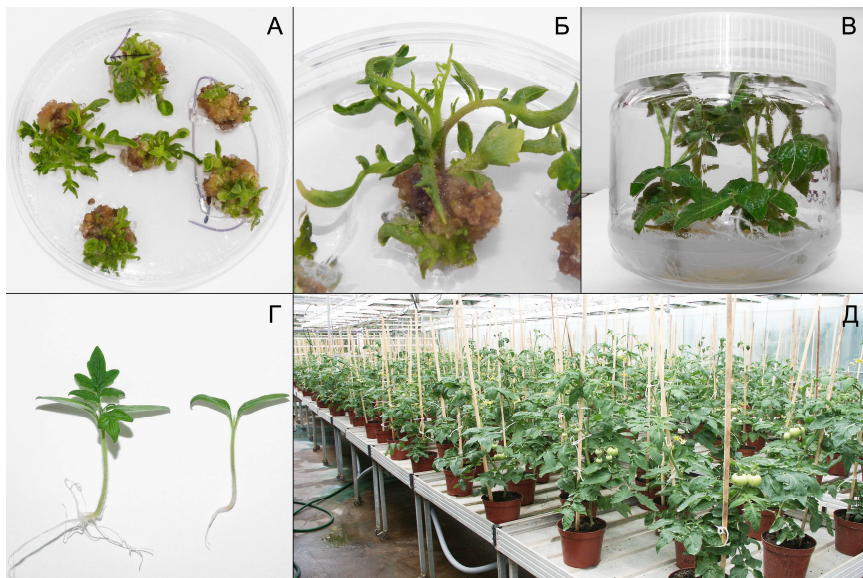


Рисунок 5 – Получение безмаркерных растений томата. А – регенерация растений на селективной среде, Б – 5-фторцитозин-устойчивый побег, В – укоренение растений томата, Г – сегрегация растений томата в поколении T₁, устойчивое к канамицину растение (слева) и чувствительное к канамицину растение (справа), Д – исходные трансгенные линии и безмаркерные растения томата в теплице.

Этот результат соотносится с данными о том, что для интеграции Т-ДНК в геном томата необходима гомология между последовательностями левого бордера и геномной ДНК (Thomas and Jones, 2007). Образующиеся при этом структуры ДНК были также обнаружены в *Nicotiana tabacum*, что предполагает общий механизм для видов пасленовых. Пятьдесят четыре линии (47,4%) содержали полную вставку Т-ДНК. Пять растений содержали только фрагмент гена устойчивости к канамицину (*nptII*). Мы отобрали 24 линии без морфологических отклонений и довели их до плодоношения. Семена проращивали на среде с канамицином (Рисунок 5, Г), а экспланты устойчивых побегов использовали для активации в них рекомбиназы. Одиннадцать линий из 24 не продуцировали регенерантов на среде содержащей 5-ФЦ. Три линии с промотором гена *ELIP* произвели 11 сублиний, а из 10 линий с геном *E8* удалось получить 91 сублинию. Несмотря на то, что 77 из 102 полученных сублиний утратили способность расти на канамицине, ПЦР-анализ выявил присутствие последовательности гена *nptII* в 100 из них (но не *recR*). Мы полагаем, что в этих случаях могут происходить хромосомные перестройки вследствие присутствия множественных и aberrантных или частичных вставок Т-ДНК. Таким образом, было получено две потенциально безмаркерные линии томата – eI-VIII-2-1 и e8-VI-22-6.

Для подтверждения удаления ДНК, фланкированной сайтами RS, провели Саузерн-блот-анализ (Рисунок 6). Три копии Т-ДНК были обнаружены в геноме линии e8-VI-22. После элиминации нежелательной ДНК в геноме линии e8-VI-22-6 сохранился только целевой ген тауматина II. К сожалению, последовательность гена *nptII* была обнаружена во второй отобранной линии eI-VIII-2-1. В то же время зонд на ген *recR* дал отрицательный результат. Только одна линия eI-XI-14, полученная с помощью быстрой селекции, была подтверждена как не содержащая маркеров. В ней было обнаружено две копии целевого гена тауматина II.

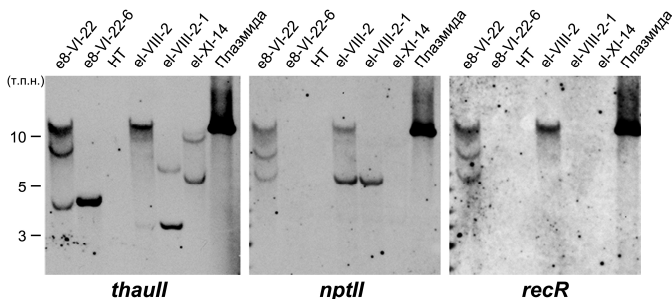


Рисунок 6 – Саузерн-блот-анализ растений томата до активации рекомбиназы (eI-VIII-2, e8-VI-22) и после (eI-VIII-2-1, e8-VI-22-6), а также линии, полученной способом ранней селекции (eI-XI-14). HT – нетрансгенное растение (отрицательный контроль); Плазмиды – pMF-ELI.

Для подтверждения экспрессии гена тауматина II на уровне РНК была проведена ПЦР, сопряженная с обратной транскрипцией (Рисунок 7). В двух сублиниях после удаления ДНК была обнаружена только мРНК гена тауматина II. В сублинии eI-VIII-2-1 мРНК гена *nptII* отсутствовала. Этот результат, вместе с тем фактом, что растения потеряли способность расти на канамицине, показал, что в геноме сублинии eI-VIII-2-1 имеется нефункциональная, возможно неполная, копия гена *nptII*.

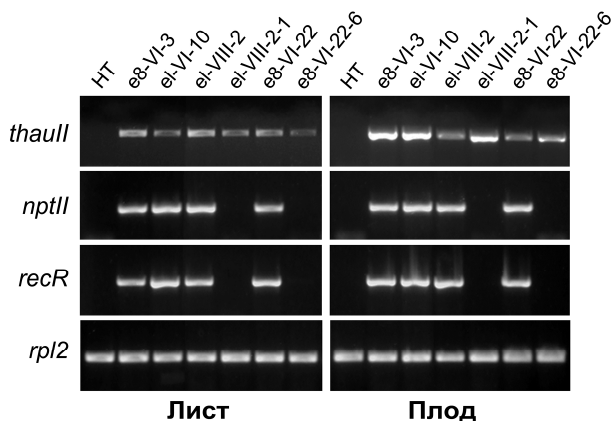


Рисунок 7 – ОТ-ПЦР-анализ четырех генов в листьях и плодах растений томата. HT – нетрансгенное растение томата; eI-VIII-2-1 и e8-VI-22-6 – сублинии, полученные после активации рекомбиназы; другие числа, первичные трансгенные линии томата.

Нами впервые заявлено об отсутствии строгой плодовой специфичности одного из хорошо охарактеризованных плодоспецифичных промоторов *E8* томата. Хотя экспрессия гена *E8* контролируется как этилен-зависимым, так и этилен-независимым путями (Lincoln et al., 1987; Lincoln and Fischer, 1988; Dellapenna et al., 1989; Theologis et al., 1993), мы не нашли сообщений относительно экспрессии гена *E8* в вегетативных тканях растений. Ранее было показано, что активность *E8* не наблюдается даже в незрелых плодах (Deikman et al., 1992; Good et al., 1994). Более того, ни один из делеционных вариантов промотора даже не содержащий этилен-чувствительного элемента, расположенного между –2108 и –1088 п.н., не обеспечивал накопление генного продукта E8-Tag в незрелых плодах (Deikman et al., 1992). В другой работе *E8* промотор, размером 1,1 тыс. п.н., обеспечивал экспрессию S-аденозилметионин гидролазы в плодах трех стадий созревания (бланжевая, оранжевая и стадия красной спелости), тогда как в незрелых плодах, так же, как и в листьях, цветах и стеблях не обнаруживалась мРНК этого гена (Good et al., 1994). В наших руках под контролем промотора *E8* размером 1193 п.н. наблюдалась

экспрессия генов в вегетативных тканях трансгенных растений томата. Существует предположение, что определенные терминаторы могут не только усиливать транскрипцию и трансляцию интересующего гена, но также изменять тканевую специфичность промотора. Например, использование комбинации промотора *E8* и терминатора белка теплового шока (HSP) не только увеличивало уровень экспрессии миракулина (гликопротеиновый подсластитель) до значений выше, чем для промотора 35S, но также приводило к появлению экспрессии в зрелых зеленых плодах (Kurokawa et al., 2013). Был сделан вывод, что HSP может нарушать тканевую специфичность промотора *E8*. В нашем случае также возможно, что комбинация промотора *E8* и терминатора гена малой субъединицы Рубиско (*rbcS3A*) обеспечивает аналогичный эффект. Есть также сообщения об успешном использовании терминатора Рубиско в сочетании с его промотором. Например, промотор и терминатор гена *rbcS1* хризантемы обеспечивали экспрессию в восемь раз более высокую, чем конститутивный CaMV35S промотор (Outchkourov et al., 2003). Подобная комбинация в яблоне приводила к тому же уровню экспрессии, который был обеспечен 35S промотором (Schaart et al., 2011).

Методом вестерн-блоттинга мы также показали накопление целевого белка в некоторых исходных трансгенных и безмаркерных растениях томата (Рисунок 8). Были обнаружены полосы, размером около 22 кДа, соответствующих зрелому белку тауматину. Экспрессию гена тауматина II наблюдали как в плодах, так и в листьях анализируемых линий под контролем обоих промоторов *ELIP* и *E8*.

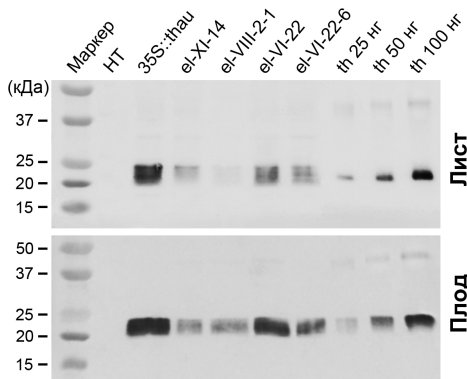
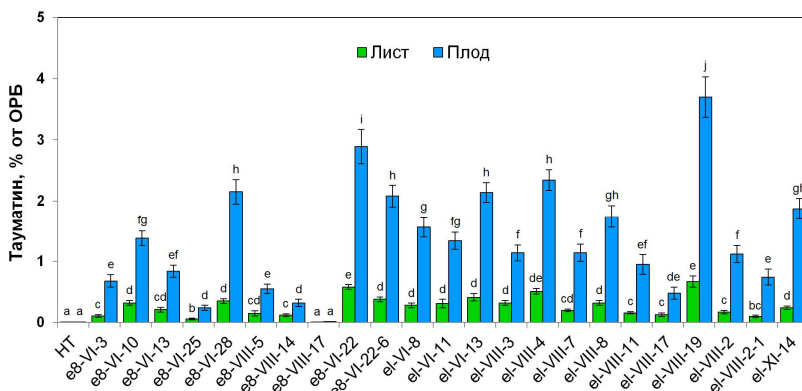


Рисунок 8 – Вестерн-блот-анализ растений томата. Маркер – маркер молекулярного веса; НТ – нетрансгенное растение томата; 35S::thau – линия томата с геном тауматина II, под контролем 35S промотора; e8-VI-22-6 и el-XI-14 – безмаркерные линии; e8-VI-22 – исходная трансгенная линия; el-VIII-2-1 – линия после активации рекомбиназы; th 25 нг, 50 нг и 100 нг – коммерческий тауматин II в соответствующих концентрациях.

Количественная оценка содержания тауматина II в листьях и зрелых плодах растений томата была выполнена методом ИФА (Рисунок 9). Содержание белка в зрелых плодах было в четыре–шесть раз выше, чем в листьях для обоих промоторов. Максимальный уровень накопления тауматина 3,7% и 2,9% от общего растворимого белка (ОРБ), наблюдали в линиях e1-VIII-19 и e8-VI-22, соответственно. Наиболее широко экспрессируемый ген *rbcS* составляет 5–6% от общего растворимого белка в растительной клетке (Outchkourov et al., 2003). Достигнутые нами значения накопления белка указывают на то, что созданная экспрессионная кассета обладает почти максимальной эффективностью.



Трансгенные растения томата и НТ контроль

Рисунок 9 – Иммуноферментный анализ тауматина II в растениях томата. НТ – нетрансгенное растение томата; e1-XI-14 – линия, полученная способом быстрой селекции; e1-VIII-2-1 и e8-VI-22-6 – сублинии, полученные способом отсроченной селекции; другие номера – первичные трансгенные линии томата. Значения представляют собой среднее \pm стандартное отклонение от трех повторностей на линию. Различные буквы над столбцами указывают на значимые различия при $p < 0,05$.

В растениях со стабильной ядерной трансформацией, накопление гетерологичного белка обычно не превышает 1–2% от ОРБ (Floss et al., 2007). Ранее в нашей лаборатории были получены трансгенные растения томата с геном тауматина под контролем вирусного 35S промотора (Firsov et al., 2012). Количество белка в спелых плодах варьировало от 1,8% до 4,6% от ОРБ. Высокие концентрации тауматина под контролем промотора *ELIP*, подтверждают данные, полученные ранее, что полная версия промотора *ELIP* сопоставима по силе с CaMV35 промотором. В тканях линий томата с промотором *ELIP* концентрация тауматина была в среднем в 1,5 раза выше, чем в линиях с промотором *E8*. Плоды большинства трансгенных растений томата, продемонстрировали четко выраженный сладкий вкус с лакричным послевкусием, типичным для тауматина II.

3.3. Создание безмаркерных растений яблони

Для получения безмаркерных трансгенных растений яблони мы использовали один из созданных на базе рМF векторов, содержащий ген белка тауматина II под контролем плодоспецифичного промотора *E8* и терминатора гена *rbcsS* томата.

В результате агробактериальной трансформации яблони было получено три линии устойчивых к канамицину. Вставка целевого гена тауматина, а также других генов перенесенной области была обнаружена во всех трех линиях, тогда как присутствие сайта рекомбинации, который расположен у левой границы Т-ДНК, имело место только в линии 6. Мы произвольно выбрали одну из оставшихся линий (линия 1) для первого эксперимента в качестве отрицательного контроля.

После активации рекомбиназы в 1800 листовых эксплантах яблони 45 побегов было отобрано и размножено на селективной среде с 250 мг/л 5-ФЦ. Эффективность отбора безмаркерных растений составила 5,6%–8%. В результате экспериментов было получено пять регенерантов из эксплантов линии 1 и 40 из эксплантов линии 6. Спонтанная рекомбинация и элиминация ДНК без обработки дексаметазоном происходила в 14% случаев (от общего количества безмаркерных растений) – 4 сублинии были получены из эксплантов линии 6. Наблюдение, что рекомбинация имеет место без активации дексаметазоном, свидетельствует, о том, что присутствует неиндуцированная экспрессия гена. Подобный эффект наблюдали ранее в экспериментах с растениями земляники (Schaart et al., 2004). Еще более высокий уровень спонтанной рекомбинации был продемонстрирован в растениях яблони и груши – в 19–34% трансгенных линий обнаруживалась частичная рекомбинация в отсутствие индукции дексаметазоном (Righetti et al., 2014). В клетке рекомбиназа R обладает постоянной минорной ферментативной активностью, даже пребывая в неоптимальном конформационном состоянии в составе белкового комплекса с лиганд-связывающим доменом (LBD). Это приводит к снижению эффективности достаточно продуманной системы (рМF1) – часть трансформантов избавляется от вставки еще в процессе селекции, тем самым не позволяя их отобрать.

ПЦР-анализ выявил, что все пять сублиний, полученных из эксплантов линии 1, являются эскейпами, то есть по генотипу близки к материнской линии, поскольку в дополнение к гену *thaulI* они содержат последовательности генов *nptII*, *codA* и *recR*, фланкированных сайтами RS. Архитектура Т-ДНК вставки, а именно отсутствие одного из RS-сайтов в геноме линии 1, предотвращает сайт-специфическую рекомбинацию и не позволяет элиминировать нежелательную ДНК. После культивирования эксплантов из линии 1 (которая не содержала один из RS-сайтов) на 5-ФЦ, было отобрано пять сублиний, что указывает на недостаточность селективного давления. В большинстве предыдущих работ с растениями

исследователи использовали концентрации от 150 до 300 мг/л (Schaart et al., 2004; Vanblaere et al., 2011; Righetti et al., 2014). В наших экспериментах концентрация 5-фторцитозина составляла 250 мг/л. В это же время отсутствие эскейпов для линии 6 приводит к выводу, что использованная концентрация 5-ФЦ вполне достаточна для рутинного отбора безмаркерных растений яблони. Интересно, что в своей ранней работе один и тот же коллектив авторов для получения безмаркерных растений яблони использовал концентрацию 150 мг/л (Vanblaere et al., 2011), а в более поздней работе увеличил ее до 500 мг/л (Krens et al., 2015).

ПЦР-анализом выявлено отсутствие селективных генов и наличие целевых последовательностей во всех сублиниях, полученных из линии 6. Это указывает на более или менее правильное удаление обоих трансляционно-слитых селективных генов.

Методом Саузерн-блоттинга было обнаружено, что геномы линий 1, 2 и 6 содержат 5, 2 и 3 копии целевого гена, соответственно, и по одной копии каждого из селективных генов (Рисунок 10).

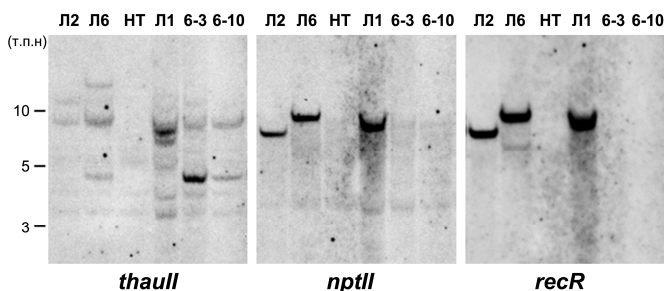


Рисунок 10 – Саузерн-блоттинг родительских (Л1, Л2, Л6) и безмаркерных (6-3, 6-10) растений яблони. НТ – нетрансгенное растение.

По-видимому, во всех случаях произошла частичная интеграция области Т-ДНК только с целевым геном. В двух проанализированных сублиниях зонды на гены *recR* и *nptII* не гибридизуются, но присутствует по две полосы для гена тауматина. На основании этих результатов, можно предположить, что в геноме исходной трансгенной линии 6 есть одна полная копия Т-ДНК и две дополнительные вставки только с кассетой экспрессии целевого гена, которые сохраняются в геноме после элиминации ДНК. Возможно, тандемная вставка двух копий целевых генов в один локус и третьей копии в другой участок генома привела к удалению одной из кассет после рекомбинации. Ранее был проведен полный молекулярный анализ цисгенных растений яблони, несущих ген устойчивости к парше *Rvi6*. Авторы показали различные комбинации множественных вставок Т-ДНК, и появление возможных генотипов из одной трансгенной линии (Vanblaere et al., 2013). В идеале при работе с

векторными системами на основе сайт-специфических рекомбиназ, следует стремиться к получению трансгенных растений с одной полной копией Т-ДНК путем оптимизации трансформационных стратегий. В противном случае, помимо известных недостатков множественных вставок во время рекомбинации, появляется вероятность нежелательных хромосомных перестроек или делает элиминацию ДНК невозможной (см. обзор Wang et al., 2011). Есть мнение, что возможные перестройки хромосом или делеции являются одним из основных недостатков при использовании сайт-специфических рекомбиназ (Yau and Stewart, 2013).

Частота регенерации контрольных растений дикого типа на среде, не содержащей двух агентов 5-ФЦ и дексаметазона, была 75% в первом эксперименте и 45% во втором эксперименте. Показано, что диапазон эффективных концентраций 5-ФЦ при негативной селекции растительных тканей составляет от 50 до 500 мг/л (Schlaman and Hooykaas, 1997), без отрицательных эффектов (снижения частоты регенерации) вплоть до 1000 мг/л (Dai et al., 2001). Righetti с соавторами сообщили, что токсичность 5-ФЦ при регенерации адвентивных побегов яблони не была обнаружена ниже концентрации 750 мг/л (Righetti et al., 2014). В нашем исследовании присутствие 5-ФЦ и дексаметазона в среде отрицательно влияет на регенерацию, снижая частоту регенерации примерно в 1,5 раза (с 75 до 55%, с 45 до 27% в первом и втором экспериментах, соответственно).

Для оценки уровня транскрипции целевого гена в безмаркерных растениях яблони мы использовали полуколичественную ПЦР, сопряженную с обратной транскрипцией (Рисунок 11).

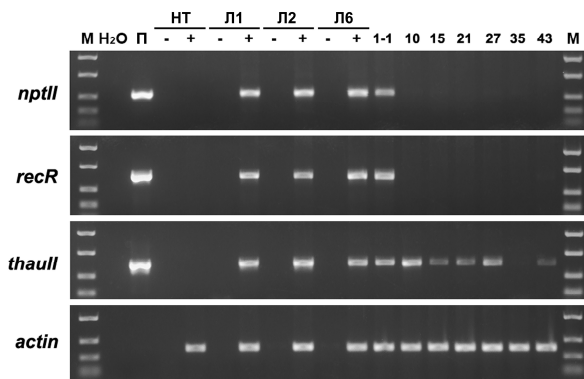


Рисунок 11 – Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ растений яблони. М – маркер молекулярного веса; H₂O – вода; П – плаزمида рМF-E8; HT – нетрансгенное растение; L1, L2 и L6 – родительские трансгенные линии; другие цифры – некоторые из сублиний; - отрицательный контроль – реакция без добавления обратной транскриптазы; + - реакция в присутствии обратной транскриптазы.

Экспрессия всех генов из региона Т-ДНК была обнаружена в трех родительских линиях. Однако в сублиниях, полученных из линии 6, после удаления нежелательной ДНК детектируется только мРНК гена тауматина II. В сублинии 1-1, полученной из линии 1, также была обнаружена мРНК селективных генов.

Ранее количественный анализ методом ИФА выявил, что уровень белка тауматина в несколько раз выше в плодах томата, чем в листьях. В связи с этим, стало возможным оценить уровень транскрипции целевого гена в листьях безмаркерных растений яблони с использованием ПЦР в реальном времени (Рисунок 12). Уровень экспрессии гена тауматина в родительской линии 6 был принят за единицу. Экспрессия гена тауматина II была обнаружена во всех безмаркерных сублиниях, кроме сублинии 35. Самое высокое содержание мРНК тауматина в трансгенной сублинии 10 было в три раза выше, чем в родительской линии. В восьми сублиниях яблони уровень экспрессии был статистически выше, чем в линии 6, а в двух из них он был в два раза выше. В девяти линиях экспрессия целевого гена была примерно одинаковой. В остальных 11 сублиниях экспрессия тауматина была ниже, чем в исходной линии 6. Мы ожидаем увидеть значительно более высокие значения экспрессии гена *thauII* в плодах яблони, чем в листьях.

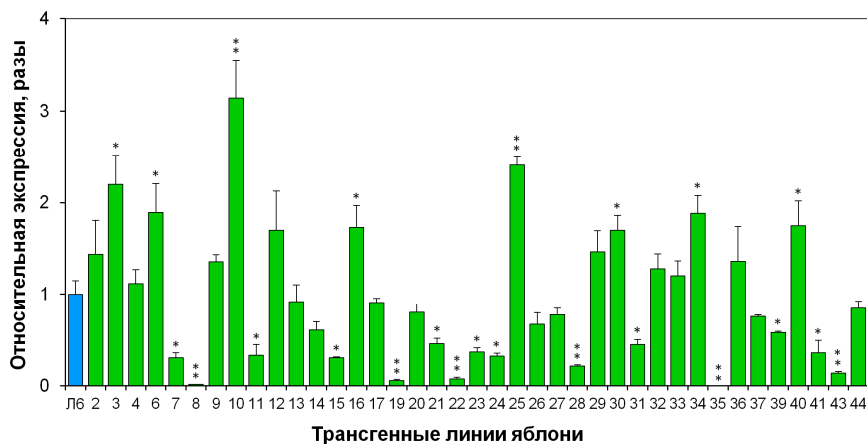


Рисунок 12 – Анализ уровня экспрессии гена тауматина II методом ПЦР в реальном времени в безмаркерных сублиниях яблони. Данные были нормализованы по комбинации всех трех референсных генов. За единицу принято значение родительской трансгенной линии 6 (Л6). Представлены средние значения от трех повторностей, планки погрешностей представлены стандартными отклонениями. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – достоверные различия в соответствии с *t*-критерием Стьюдента.

Восемь высокоэкспрессирующих сублиний, в которых уровень мРНК гена тауматина II превышал значение родительской линии 6 в 1,5–3 раза, были размножены и привиты на карликовые подвои для ускоренного плодоношения. В будущем мы планируем количественно измерить накопление белка в плодах и оценить улучшение и модификацию вкуса.

Наши исследования демонстрируют, как с помощью безмаркерных технологий расширяются возможности для улучшения традиционных сортов яблони. Разнообразие сортов яблони может быть расширено с помощью генетической инженерией без использования нерастительных генов и регуляторных элементов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе мы клонировали и охарактеризовали промотор гена раннего светоиндуцибельного белка (ELIP, early-light inducible protein) томата (*Solanum lycopersicum*). Белки этого семейства продуцируются в присутствии света и предположительно принимают участие в конверсии хлоропласта в хромопласт, играя фотовосстановительную (фоторепарирующую) роль в фотосинтетической системе. Анализ последовательности промотора выявил множественные цис-регуляторные элементы, связанные с чувствительностью к свету, и другие мотивы, вовлеченные в реакции на различные фитогормоны растений и циркадианный контроль. Для определения функциональности промотора семь 5'-делеционных вариантов были слиты с репортерным геном β -глюкуронидазы (*gusA*) и интродуцированы в томат. Гистохимический анализ трансгенных растений томата выявил различные уровни активности GUS в большинстве анализируемых тканей в зависимости от используемого фрагмента промотора. Интенсивность окрашивания была значительно выше в спелых плодах, чем в незрелых плодах, цветах и вегетативных тканях. Количественный анализ показал, что уровень активности GUS с самой длинной версией промотора *ELIP* в спелых плодах был сопоставим с таковым для растений, конститутивным CaMV35S промотором. Кроме того, было выявлено расположение как негативных, так и позитивных регуляторных мотивов в последовательности промотора. По нашему мнению, описанный промотор *ELIP* является интересным потенциальным инструментом для применения в биотехнологии растений.

Для получения безмаркерных растений томата мы использовали векторную систему рMF1. Система включает в себя индуцибельную сайт-специфическую рекомбиназу и бифункциональный селективный ген. В качестве смыслового выступил ген суперсладкого белка тауматина II из тропического растения *Thaumatococcus daniellii* под контролем

преимущественно плодоспецифичных промоторов генов *ELIP* или *E8* томата, и терминатора гена малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы томата. Ранее использование этого гена в нашей лаборатории позволило повысить сладость, а также улучшить вкусовые характеристики плодов таких культур как яблоня, клубника, морковь, томат и груша. С применением различных стратегии быстрой и отсроченной селекции, мы разработали протокол для получения полностью безмаркерных растений томата. Статус растений был подтвержден с помощью полимеразной цепной реакции и Саузерн-блоттинга. Экспрессия гена тауматина II была детектирована с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией и Вестерн-блоттинга. Плоды трансгенных и безмаркерных линий томата продемонстрировали сладкий вкус. Количественная сравнительная оценка уровня экспрессии белка тауматина под контролем двух промоторов была проведена с использованием иммуноферментного анализа.

Для получения безмаркерных трансгенных растений яблони мы также использовали вектор *pMF1*, с геном тауматина II под контролем преимущественно плодоспецифичного промотора *E8* томата и терминатора *rbsS3A* томата. Мы получили три независимых линии трансгенных яблони и проанализировали с помощью ПЦР и Саузерн-блоттинга на присутствие всех генов из области Т-ДНК. Две из них содержали неполную последовательность Т-ДНК. Третью линию, содержащую полную вставку, мы использовали для получения безмаркерных растений яблони, применив отсроченную стратегию. После индукции рекомбиназной активности в эксплантах листьев было получено более 40 сублиний, растущих на селективной среде с 5-ФЦ. В этих растениях яблони на уровне РНК показана экспрессия гена сверхсладкого белка в широком диапазоне. Сублинии с высоким уровнем экспрессии целевого гена были размножены и привиты на карликовый подвой для ускоренного плодоношения. В ближайшем будущем это позволит оценить уровень белка в плодах яблони и провести органолептический анализ. Таким образом, мы разработали протокол, который позволил получить безмаркерные растения яблони, экспрессирующие сверхсладкий белок.

Созданные в рамках диссертационной работы растения томата и яблони с геном суперсладкого белка тауматина не содержат в своем геноме селективных генов, использовавшихся при отборе растений. Важно отметить, что экспрессионная кассета целевого гена состоит только из растительных элементов. В настоящее время не существует термина, определяющего такие «улучшенные» трансгенные растения. Было бы правильно выделять статус таких генноинженерных форм, которые не содержат в своем геноме вирусных и бактериальных генов. Пока же можно сказать, что они максимально приближены к интрагенным растениям.

ВЫВОДЫ

1. 5'-область гена *ELIP* томата содержит мотивы, отвечающие за регуляцию светом, реакции на фитогормоны (включая этилен), стрессовые реакции, циркадианный контроль, а также содержит энхансеры. Это указывает на то, что промотор тонко регулируется сигналами, связанными с развитием растения и его активность значительно повышается при созревании плодов.

2. Промотор гена *ELIP* томата преимущественно работает в созревающих плодах. Учитывая его высокую активность, промотор может быть использован для молекулярной селекции растений в будущем.

3. Концентрация 5-ФЦ, полностью подавляющая регенерацию (подбирается заранее индивидуально для каждого вида), в основных работах по получению безмаркерных растений может не обеспечивать достаточное селективное давление – около 70% отобранных сублиний, полученных при быстрой селекции томата оказались эскейпами.

4. Способ ускоренной селекции безмаркерных растений томата, без доведения до стабильных трансгенных линий, имеет существенный недостаток – трансгенный каллус чаще всего содержит нетрансгенные клетки дикого типа, которые, учитывая предыдущий вывод, регенерируют в побеги-эскейпы.

5. При отсроченной селекции примерно у половины трансгенных растений томата, полученных с помощью вектора рMF1, наблюдается неполная интеграция области Т-ДНК. Это делает невозможным элиминацию селективных генов из геномов таких линий. Вероятно, хромосомные перестройки вследствие присутствия множественных и аберрантных или неполных вставок Т-ДНК частое явление для трансгенных растений томата при высокой эффективности трансформации.

6. Протокол, разработанный на основе использования системы рMF1, применим для создания безмаркерных растений томата, однако особенности интеграции Т-ДНК в геномы пасленовых, не позволяя отбирать растения с высокой эффективностью даже при использовании различных стратегий селекции (ускоренной и замедленной). Вероятно, оптимизация условий, при которых удастся создавать растения с одной полной копией Т-ДНК, позволит повысить эффективность получения безмаркерных растений томата.

7. При использовании сайт-специфической рекомбиназы и двух методологических подходов, получены безмаркерные трансгенные линии томата и яблоки. Растения не содержат генетических регуляторных элементов, не растительного происхождения. Линии томата накапливают тауматин вплоть до 3,7% от общего растворимого белка в плодах благодаря силе нового промотора *ELIP*. Созданные растения томата потенциально могут служить продуцентами суперсладкого белка тауматина II.

8. Присутствие дексаметазона и 5-ФЦ в среде отрицательно влияет на регенерацию нетрансгенных тканей яблоки – частота регенерации снижается примерно в 1,5 раза.

9. Рекомбиназа R, трансляционно слитая с LBD, обладает постоянной минорной активностью даже без активации дексаметазоном. В экспериментах с тканями яблоки спонтанное вырезание ДНК селективных генов происходит в 14% случаев. Это снижает выход безмаркерных линий (и общую эффективность системы). Возможно, в этом направлении стоит осуществлять совершенствование системы.

10. Несмотря на выявленные недостатки системы рMF1, она, тем не менее, демонстрирует свою высокую эффективность – безмаркерные растения удалось получить только из одной родительской трансгенной линии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Timerbaev V.R., Mitiouchkina T.Y., Dolgov S.V. Production of marker-free cisgenic apple plants using inducible site-specific recombinase and a bifunctional selectable gene // *Acta Hortic.* – 2019. – Vol. 1261. – P. 149–156.

Timerbaev V., Dolgov S. Functional characterization of a strong promoter of the early light-inducible protein gene from tomato // *Planta.* – 2019. – Vol. 250. – P. 1307–1323.

Timerbaev V., Mitiouchkina T., Pushin A., Dolgov S. Production of marker-free apple plants expressing the supersweet protein gene driven by plant promoter // *Front Plant Sci.* – 2019. – 10:388. doi:10.3389/fpls.2019.00388.

Timerbaev V., Pushin A., Dolgov S. Production of marker-free tomato plants expressing the supersweet protein thaumatin II gene under the control of predominantly fruit-specific promoters. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2019. – Vol. 139. – P. 621–634.