

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

На правах рукописи

Тимербаев Вадим Рафаилович

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

Специальность 03.01.03 Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук  
Долгов Сергей Владимирович

Москва – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1.1. Промоторы генов растений.....	13
1.1.1. Типы промоторов .....	13
1.1.2. Охарактеризованные промоторы томата .....	20
1.2. Способы получения безмаркерных трансгенных растений .....	25
1.2.1. Позитивная селекция.....	27
1.2.2. Котрансформация .....	32
1.2.3. Удаление маркерных генов с помощью транспозонов .....	33
1.2.4. Удаление маркерных генов с помощью рекомбиназ.....	35
1.3. Суперсладкий белок тауматин и его использование в биоинженерии растений .....	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	40
2.1. Растительный материал .....	40
2.1.1. Томат .....	40
2.1.2. Яблоня.....	40
2.2. Создание бинарных векторов .....	41
2.2.1. Бинарные векторы с новым промотором гена <i>ELIP</i> томата.....	41
2.2.2. Бинарные векторы для создания безмаркерных растений .....	41
2.3. Агробактериальная трансформация растений .....	44
2.3.1. Трансформация томата.....	44
2.3.2. Трансформация яблони.....	45
2.4. Функциональный анализ промотора гена <i>ELIP</i> томата .....	45
2.4.1. Отбор трансгенных растений томата с геном <i>gusA</i> .....	45
2.4.2. Анализ последовательности промотора <i>ELIP</i> .....	46
2.4.3. Гистохимическое окрашивание GUS .....	46
2.4.4. Экстракция белка и флюориметрический анализ GUS .....	47

2.5. Создание безмаркерных растений томата.....	47
2.5.1. Подбор концентрации 5-фторцитозина для отрицательного отбора безмаркерных растений .....	47
2.5.2. Селекция безмаркерных растений томата.....	48
2.6. Создание безмаркерных растений яблони .....	49
2.7. Молекулярно-биологический анализ полученных растений.....	49
2.7.1. ПЦР-анализ растений томата.....	49
2.7.2. ПЦР-анализ растений яблони .....	50
2.7.3. Саузерн-блот анализ.....	51
2.8. Оценка экспрессии перенесенных генов.....	52
2.8.1. Качественная полимеразная цепная реакция томата, сопряженная с обратной транскрипцией .....	52
2.8.2. Полуколичественная ОТ-ПЦР яблони .....	52
2.8.3. Вестерн-блот анализ.....	53
2.8.4. Количественная оценка накопления тауматина в растениях томата.....	54
2.8.5. Анализ накопления тауматина в растениях яблони методом ПЦР в реальном времени.....	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	56
3.1. Клонирование и анализ промотора <i>ELIP</i> томата.....	56
3.1.1. Клонирование и анализ последовательности промотора <i>ELIP</i> .....	56
3.1.2. Гистохимический анализ активности GUS в различных органах томата.....	65
3.1.3. Гистохимический анализ активности GUS в плодах томата .....	68
3.1.4. Количественный анализ активности GUS в плодах томата .....	70
3.2. Создание безмаркерных растений томата.....	72
3.2.1. Конструирование бинарного вектора.....	72
3.2.2. Получение безмаркерных линий с применением стратегии быстрой селекции.....	73
3.2.3. Получение стабильных трансгенных растений томата и ПЦР-анализ.....	77
3.2.4. Активация рекомбиназы и получение безмаркерных растений .....	81

3.2.5. Молекулярно-биологический анализ трансгенных и безмаркерных линий томата .....	83
3.3. Создание безмаркерных растений яблони .....	88
3.3.1. Конструирование бинарного вектора .....	88
3.3.2. Трансформация яблони и анализ переноса генов .....	88
3.3.3. Селекция безмаркерных растений яблони .....	88
3.3.4. Молекулярно-биологический анализ безмаркерных растений яблони .....	91
3.3.5. Анализ экспрессии перенесенных генов методом ОТ-ПЦР .....	93
3.3.6. Анализ экспрессии целевого гена методом ПЦР в реальном времени .....	95
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ .....	99
4.1. Клонирование и анализ промотора <i>ELIP</i> томата .....	99
4.2. Получение безмаркерных растений томата .....	105
4.3. Получение безмаркерных растений яблони .....	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	116
ВЫВОДЫ .....	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	123

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **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 тканеспецифических промоторов, экспрессия генов которых осуществляется непосредственно в конкретных тканях или на определенных стадиях развития растения.

### **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.). Этот материал представляет собой селективные

маркерные гены устойчивости к антибиотикам, а также регуляторные элементы для экспрессии целевых генов. 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 системы удаления ДНК Cre/loxP (Zhang et al., 2006, 2009; Ma et al., 2008) и сайт-специфической рекомбинации R/RS 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 (*TomloxB*), аминокicloпропанкарбоксилат синтазы 4 (*LeACS4*), аминокicloпропанкарбоксилат оксидазы 1 (*LeACO1*), а также экспанзина (*LeExp1*). 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 строгой 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). Версия промотора *PG* длиной 4800 п.н. способна обеспечить требуемый исследователями (достаточный) уровень экспрессии, что было показано на примере репортерного гена (Nicholass et al., 1995), но использование таких громоздких элементов в генетических конструкциях само по себе несет объективные трудности. 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.

В диссертационной работе мы использовали охарактеризованный нами сильный промотор для направленной экспрессии гена тауматина II в плодах томата, а также известный ранее «классический» *E8* промотор для экспрессии в плодах яблони. При этом с помощью сайт-специфической рекомбиназы мы удалили нежелательную ДНК из геномов двух культур. Основным преимуществом выбранной системы *pMF1* является ее последовательная двойная селекция. Эта система ранее уже была успешно применена для таких культур, как клубника, яблоня и груша, однако уникальное сочетание преимущественно плодоспецифичных промоторов, гена суперсладкого белка и *pMF1* было осуществлено впервые.

### **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 растительных 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 *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 *ELIP* томата. В его последовательности выявлены цис-регуляторные элементы. Функциональный анализ промотора *ELIP* выявил, что «полная» (условно названная так в данном 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. Подробно методы исследований изложены в разделе «Материалы и методы».

### **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.

### **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).

### **Публикации**

По результатам исследований опубликовано 4 научные статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science:

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.

### **Личный вклад автора**

Работа является результатом оригинальных исследований. 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 ИФА). Автор лично сконструировал все бинарные векторы, использованные для трансформации растений, провел *in silico* анализ последовательности нового промотора с применением баз данных и программ, доступных в сети интернет, осуществил агробактериальную трансформацию томата, получил безмаркерные растения томата и яблони, провел анализ трансгенных и безмаркерных растений методами гистохимического окрашивания, флюориметрии, ПЦР, ОТ-ПЦР, количественной ПЦР в реальном времени. Автор также провел обработку полученных данных и обобщение результатов. Автор подготовил публикации к печати, проанализировал литературу и написал настоящую диссертацию.

### **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.

**Работа выполнена** в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) Филиала ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Пушино), а также в лаборатории генетической инженерии растений ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (Москва).

Автор выражает благодарность научному руководителю за содействие и поддержку на всех этапах проведения диссертационной работы. Я благодарен также всем соавторам по публикациям. Я признателен Константину Шестибратову (ФИБХ РАН), с которым начинал работать, некоторые его идеи реализованы в представленной диссертации.

Также я выражаю благодарность моей семье и в первую очередь маме за поддержку и веру в меня.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Промоторы генов растений

#### 1.1.1. Типы промоторов

Изменения в экспрессии генов критичны для регулирования роста, развития и старения растений. Эти изменения могут контролироваться уровнем транскрипции. В первую очередь за уровень транскрипции отвечает нетранскрибируемая 5'-регуляторная область гена, называемая промотором.

Промоторы являются важными генетическими элементами в молекулярной биологии растений и используются в генной инженерии для регуляции экспрессии генов. Эукариотические промоторы обычно состоят из 500–2000 п.н. и обеспечивают управляемую экспрессию выбранных генов.

Для всех промоторов характерны определенные участки последовательностей, которые определяют принадлежность последовательности к промоторной области, а также уровень экспрессии гена, находящегося под его контролем и тканевую или временную специфичность.

Эукариотические промоторы располагаются перед кодирующей частью гена и могут иметь регуляторные элементы, располагающиеся за несколько тысяч пар оснований от старта транскрипции. Сила и специфичность промотора определяется эффективностью отдельных цис-регуляторных элементов или мотивов в составе его последовательности, их количеством, а также взаимным расположением. Цис-регуляторные элементы, способны функционировать по-разному в зависимости от ближайшего нуклеотидного окружения. В промоторных районах некоторых генов были выявлены усиливающие транскрипцию последовательности, способные сохранять свою функцию на разных расстояниях от сайта инициации транскрипции, в том числе при удалении от него. Подобные регуляторные элементы, получившие название энхансеров, широко распространены в генах многоклеточных эукариот. Интересно, что их действие

сохраняется при помещении в 3'-нетранслируемый регион последовательности гена.

Промоторы классифицируются согласно степени контроля над экспрессией гена: контроль над экспрессией во всех тканях или контроль в зависимости от ткани и стадии развития растения. Дополнительно, промоторы могут функционировать в ответ на внешние и в некоторых случаях контролируемые стимулы. Таким образом, их можно разделить на категории:

– синтетические промоторы, создаваемые искусственно в генно-инженерных исследованиях из консенсусных последовательностей ДНК общих элементов, характерных для естественных промоторов;

– индуцибельные промоторы, которые экспрессируются в присутствии определенных факторов. Так как их экспрессия ограничена определенными тканями растения, их можно назвать тканеспецифичными. Основываясь на природе факторов, запускающих их экспрессию, они подразделяются на две группы: химически регулируемые и физически регулируемые, где факторами могут быть свет, тепло, механическое повреждение;

– конститутивные промоторы, которые вызывают экспрессию нижележащего кодируемого региона во всех тканях в независимости от стадии развития растения и факторов окружающей среды;

– тканеспецифичные промоторы, которые функционируют в определенных тканях или на определенных стадиях развития растения. Так как они могут быть индуцированы как внутренними, так и внешними факторами, их можно отнести к индуцибельным промоторам.

#### Синтетические промоторы

Набор минимальных элементов промотора, необходимых для активного эукариотического промотора содержит ТАТА бокс, сайт инициации транскрипции или кэпирования (САР сайт), а также ССААТ консенсусную последовательность. Их совокупность обеспечивает корректную транскрипцию. Анализируя последовательности этих элементов из разных организмов можно синтезировать консенсусную последовательность, которая будет работать в

различных организмах. Синтетические промоторы удобны для изучения тех или иных регуляторных мотивов, комбинируя которые можно получить промоторы с сопоставимым уровнем экспрессии по отношению к промотору дикого типа (Bhullar et al., 2003). В будущем использование синтетических промоторов позволит избежать такого нежелательного феномена, как основанного на гомологии замалчивания гена (homology-based gene silencing) (Meyer and Saedler, 1996). В настоящее время использование синтетических промоторов для получения трансгенных растений с улучшенными свойствами затруднительно, поскольку ограничено знаниями о регуляторных мотивах промоторов. Таким образом, синтетический промотор, обладающий тканевой специфичностью, который бы не уступал нативному и без нежелательных последствий создать в настоящее время достаточно трудно.

#### Индукцибельные промоторы

Данная группа промоторов может быть разделена на две подгруппы: химически регулируемые промоторы, транскрипционная активность которых регулируется присутствием или отсутствием химических соединений: спиртов, антибиотиков, стероидов, ионов металлов и других веществ; физически регулируемые – включает промоторы, которые транскрипционно активируются присутствием или отсутствием таких физических факторов как свет, низкие и высокие температуры.

Предпочтительно, чтобы химически регулируемые промоторы были клонированы из организмов, которые эволюционно отдалены от объекта исследований. Промоторы, используемые в растениях, чаще всего получены из таких организмов как кишечная палочка, дрожжи, дрозофила или из клеток млекопитающих. В настоящее время для растений разработано большое количество индуцибельных систем, активируемых нагреванием (Ainley and Key, 1990; Holtorf et al., 1995), патогенами (Williams et al., 1992), светом (Kuhlemeier et al., 1989), поранениями (Firek et al., 1993), этанолом (Salter et al., 1998), фитогормонами (Li et al., 1991), стероидами (Aoyama and Chua, 1997) и тетрациклином (Gatz et al., 1992; Sommer et al., 1998). В идеале индуцибельная

экспрессионная система должна обладать следующими желательными свойствами: низкий базальный уровень экспрессии, высокую индуцибельность, специфичность к индуктору, высокий динамический диапазон к концентрациям индуктора, быстрый ответ, прекращение экспрессии после удаления индуктора и низкой токсичностью (Zuo and Chua, 2000). Каждая химически-индуцируемая система, существующая на сегодняшний день, обладает лишь несколькими критериями идеальной системы. Некоторые системы имеют высокий базальный уровень экспрессии или не функционируют в определенных видах растений. Другие системы могут вызывать дефекты роста растений, и неудобны для использования в полевых условиях (Moore et al., 1998; Zuo and Chua, 2000).

### Конститутивные промоторы

Первыми конститутивными промоторами, использованными для экспрессии трансгенов, были промоторы, изолированные из растительных патогенов. В качестве примера таких уже идентифицированных вирусных генов можно привести те, которые обнаружены в вирусах семейства *Caulimovirus* (двухцепочечных ДНК-содержащих вирусов), среди них промотор 35S (коэффициент седиментации). РНК (Balazs et al., 1982; Guilley et al., 1982; Odell et al., 1985; Jefferson et al., 1987) и промотор 19S РНК (Lawton et al., 1987) вируса мозаики цветной капусты, а также промотор вируса мозаики норичника шишковатого (Sanger et al., 1995).

Исследование других конститутивных промоторов было продолжено в первую очередь для однодольных растений. Для некоторых однодольных, таких как злаковые было обнаружено, что интроны, расположенные на 5'-конце гена – транскрибируются, но не транслируются с образованием белка, и что их присутствие необходимо для эффективной экспрессии генов. Таким образом, безинтронные промоторы, которые хорошо работают в двудольных растениях, слабо работают в однодольных.

Для регуляции экспрессии генов в растениях также идентифицированы и выделены промоторы бактериального происхождения, в частности промоторы бактерий рода *Agrobacterium*. Среди них промоторы генов опиновых синтаз



агробактериальной T-ДНК, в частности промоторы нопалинсинтазы (An et al., 1990), октопинсинтазы (Leisner and Gelvin, 1988) и маннопинсинтазы. Опиновые промоторы в обычных условиях контролируют экспрессию опинов (маннопина, октопина, нопалина), гормоноподобных веществ, синтезирующихся с помощью растительной экспрессионной машины. Опины используются бактериями как источник углерода, азота и энергии. Промоторы нопалинсинтазы (*nos*), октопинсинтазы (*ocs*) и маннопинсинтазы (*mas*) были выделены и клонированы в векторах для трансформации перед чужеродными генами для контроля над их экспрессией.

Хотя данные промоторы рассматриваются как конститутивные, на уровень их экспрессии могут влиять гормоны и поранения. Тем не менее, они остаются востребованными, в первую очередь для трансформации двудольных растений. Некоторые функциональные элементы этих промоторов, в частности *pmas*, в зависимости от ориентации способны связываться с ядерными белковыми факторами из различных растений и могут быть использованы как энхансеры или сайленсеры.

Один из самых широко используемых в генетической инженерии растений конститутивных промоторов общего назначения это CaMV35S промотор. Он отвечает за транскрипцию целого генома вируса мозаики цветной капусты. Это очень сильный промотор, обеспечивающий высокий уровень экспрессии гена в тканях двудольных растений (Benfey et al., 1990). Однако, промотор менее эффективен в однодольных, благодаря различию в количестве и (или) качестве регуляторных факторов. Так, уже в 1986 году Werr и Lorz показали, что промотор гена *Shrunken* из кукурузы значительно усиливал транзientную экспрессию гена *nptII* в протопластах пшеницы в сравнении с 35S промотором (Werr and Lorz, 1986). Это стало одним из первых сообщений о преимуществе промоторов однодольных растений при трансформации злаковых культур. Кроме того, последовательность 35S промотора содержит «горячую точку» рекомбинации, вследствие чего многокопийные вставки генетических конструкций, несущих этот промотор, подвержены более частой фрагментации в растительном геноме (Kohli

et al., 1999). Вирус мозаики цветной капусты содержит двуцепочечную ДНК, инфицирует растения семейства крестоцветных. В инфицированных клетках растений, вирус образует два основных транскрипта – 19S и 35S (Guilley et al., 1982). Функционирование 35S промотора было показано в различных органах трансгенных растений (Odell et al., 1985; Fang et al., 1989), также как в протопластах однодольных и двудольных (Fromm et al., 1985; On-Lee et al., 1986; Odell et al., 1988). Последовательность промотора может быть разделена на два домена А и В, каждый из которых отвечает за различную клеточную специфичность (Benfey et al., 1989). Домен А преимущественно обеспечивает экспрессию в корнях, а домен В – в листьях (Lam et al., 1989). Часть домена А 35S промотора, которая содержит ТАТА бокс и располагается до позиции –90 п.н. по отношению к старту инициации транскрипции используется как минимальный 35S промотор. В стороне от ТАТА-элемента, который является сайтом связывания для РНК полимеразы II, регион содержит как минимум три СААТ-подобных мотива. Эти последовательности, будучи изолированными или находясь в составе гетерологичных регионов промоторов, обеспечивают экспрессию трансгенов. Минимальный 35S промотор, приблизительно от –60 до +1 п.н. сам по себе не вызывает экспрессию гена, необходимы дополнительные последовательности такие как энхансеры. Поэтому минимальный 35S промотор используется для выявления энхансерных регионов, а также определения активности гетерологичных промоторов.

Основные направления использования конститутивных промоторов в биотехнологии растений: экспрессия генов, используемых для селекции клеток и растений; экспрессии генов репортерных белков для легкой детекции и количественных измерений; экспрессия гетерологичных последовательностей ДНК, когда есть необходимость в присутствии продуктов во всем растении, а также в течение всех стадий развития растения.

Такие конститутивные промоторы как CaMV35S и нопалинсинтазный промотор активно и успешно используются в экспериментальных исследованиях для оценки экспрессии перенесенных генов в большом количестве видов растений

(Parkinson et al., 1995). Отсутствие временной и пространственной регуляции удобно для подтверждения общих концепций, принятых в частном эксперименте, но имеет ряд недостатков для использования генетически улучшенных сортов в будущем (Gittins et al., 2000). Например, полное замалчивание (ингибирование экспрессии) регуляторных генов во всем растении с использованием конститутивного промотора может отрицательно влиять на метаболизм растения, что проявляется в замедлении роста, кустистости и карликовости трансгенных линий (Davuluri et al., 2004). Для биотехнологических подходов полезно ограничить экспрессию трансгена в определенных тканях и на определенных стадиях роста растений. Для этой цели необходимы регуляторные последовательности, позволяющие инициировать транскрипцию в клетках соответствующего типа и/или на соответствующем этапе развития растения, не оказывая серьезных нежелательных эффектов на развитие и продуктивность. В настоящее время учеными активно ведутся поиски таких тканеспецифичных промоторов.

#### Тканеспецифичные промоторы

Практическое применение генной инженерии растений требует не только достижения эффективной и стабильной экспрессии гетерологичных генов, но и синтеза целевого белка в конкретных органах и тканях трансгенных растений. Важно минимизировать негативное влияние трансгена на само растение и на конечного потребителя растительного продукта. Отрицательный эффект экспрессии трансгена может быть сведен к минимуму за счет точного накопления белка-мишени в конкретном органе растения или клеточном компартменте. Это, в свою очередь, способно значительно увеличить выход продукта.

Для биотехнологических применений полезно ограничивать экспрессию трансгена в определенных тканях или на определенных стадиях развития растений, не оказывая при этом серьезного нежелательного воздействия на развитие и продуктивность растений. В настоящее время исследователи активно занимаются поиском таких тканеспецифичных промоторов. Тканеспецифичные промоторы контролируют экспрессию генов в зависимости от стадии развития

растения или в определенных органах и тканях. В отличие от конститутивных промоторов, тканеспецифическая экспрессия является результатом взаимодействия факторов на нескольких уровнях регуляции генов.

Тканеспецифичные промоторы контролируют экспрессию гена в зависимости от стадии развития растения или в определенных органах и тканях. Трансгены под контролем таких промоторов экспрессируются только в тканях, где продукт внедренного гена желателен. При этом остальные ткани не испытывают влияния перенесенных генов. Тканеспецифичные промоторы могут быть индуцированы как внешними, так и внутренними факторами. В отличие от конститутивных промоторов, тканеспецифичная экспрессия – это результат взаимодействия факторов на нескольких уровнях регуляции генов. Именно поэтому для эффективной и надежной экспрессии трансгена в определенной ткани необходимо, чтобы контроль над ним осуществлял гомологичный или близкий по гомологии промотор.

Исходя из экспрессии гена, которую контролирует тот или иной промотор, растительные тканеспецифичные промоторы можно разделить на промоторы, экспрессирующиеся в корнях, плодах (Santino et al., 1997), цветах и семенах. Для того, чтобы выбрать оптимальный плодоспецифичный промотор томата, который бы обеспечивал высокий уровень экспрессии интересующего гена и вместе с тем обладал строгой тканевой специфичностью необходимо четко представлять механизмы созревания плодов, в частности плодов томата.

### **1.1.2. Охарактеризованные промоторы томата**

Выбор промотора, с помощью которого будет контролироваться гетерологичный ген, является важным фактором, определяющим уровень и стабильность экспрессии гена в геноме реципиента. Свойства каждого промотора определяют уровень экспрессии генов на стадии развития растения, тканевую специфичность и зависимость от регуляции биотическими и абиотическими факторами. Поэтому, под желаемые критерии подбирается оптимальный промотор.

Томат (*Solanum lycopersicum*) является второй по важности овощной культурой в мире после картофеля (URL: <http://www.fao.org/faostat>). Кроме этого, томат является одной из основных модельных культур для молекулярно-биологических исследований в области генетической инженерии. Поэтому, большинство наиболее хорошо охарактеризованных тканеспецифичных и, в частности, плодоспецифичных промоторов, принадлежат этой овощной культуре. Однако, несмотря на активный поиск, на сегодняшний день обнаружено не так много таких промоторов. Плодоспецифичные промоторы томата включают промоторы следующих генов: полигалактуроназы (*PG*) (Bird et al., 1988), *E4* и *E8* (Cordes et al., 1989), *2A11* (Van Haaren and Houck, 1991), липоксигеназы (TomloxB) (Beaudoin and Rothstein, 1997), аминокicloпропанкарбоксилат синтазы 4 (*LeACS4*), аминокicloпропанкарбоксилат (АЦК) оксидазы 1 (*LeACO1*) (Blume and Grierson, 1997), а также экспанзина (*LeExp1*) (Bhat et al., 2010). Эти промоторы широко применяли для изучения роли этилена в процессе созревания плодов (Coupe and Deikman, 1997; Deikman et al., 1998). Анализ генов, вовлеченных в процесс созревания в мутантных или трансгенных растениях, выявил присутствие двух типов регуляции генов – этилензависимую и этиленнезависимую (DellaPenna et al., 1989; Oeller et al., 1991; Theologis et al., 1993; Picton et al., 1993). Было показано, что определенные гены более чувствительны к низким уровням этилена, чем другие (Sitrit and Bennett, 1998). Остаточные уровни этилена в трансгенных плодах с пониженным уровнем этого фитогормона могут вызывать экспрессию генов как при обычном созревании (Theologis et al., 1993; Klee, 1993; Picton et al., 1993; Sitrit and Bennett, 1998). Молекулярные исследования промоторных регионов генов, участвующих в созревании, выявили механизмы регуляции этих генов, а также роль этилена. Один из определенных элементов оказался этилензависимым – A(A/T)TTCAAA (Montgomery et al., 1993; Itzhaki et al., 1994). Транскрипция генов *E4* и *E8* стимулируется этиленом (Lincoln et al., 1987), однако экспрессия *E4* также индуцируется этим фитогормоном, тогда как экспрессия *E8* – нет. Анализ промотора гена *E8* выявил, что последовательности ДНК, требующиеся для этилензависимой транскрипции, тканевой специфичности

и этиленнезависимой транскрипции различаются (Deikman et al., 1992). Хотя функции E4 и E8 в процессе созревания неизвестны, вычисленные пептиды, кодируемые этими генами, показывают сходство с метионинсульфоксид редуктазой и диоксигеназой похожей на АЦК-оксидазу, соответственно (Montgomery et al., 1993). Анализ промотора E4 показал, что для этиленреактивности требуется минимум два работающих вместе цис-элемента (Xu et al., 1996). Анализ полигалактуроназного промотора также выявил этилениндуцибельные элементы сходные с таковыми в промоторах E4 и E8 (Nicholass et al., 1995). Было обнаружено, что регион промотора гена *LeACO1* между -1825 и -369 п.н. обеспечивает строгую и специфическую индукцию гена репортерного гена при повышении концентрации этилена (Blume and Grierson, 1997).

Анализ последовательности промотора гена *LeACO1* выявил несколько регионов в позициях от -1722 до -590 п.н., которые гомологичны ДНК в генах, вовлеченных в процесс созревания, таких как *2A11* и *E4* (Cordes et al., 1989). Также был обнаружен ТСА мотив, присутствующий в стресс- и патогениндуцибельных генах (Goldsbrough et al., 1993). Интересно, что *LeACO1* также регулируется этилен-независимыми факторами (Itzhaki et al., 1994; Blume and Grierson, 1997).

Для исследования промоторных областей генов в настоящее время широко применяется использование репортерных генов. После обнаружения предположительного промотора, фрагменты последовательности гена, точнее серия укороченных форм «сливается» с геном β-глюкуронидазы (*gusA*, ранее *uidA*) или геном зеленого флуоресцентного белка (GFP) (Jefferson et al., 1987; Haseloff et al., 1995). Далее конструкции с химерными генами интродуцируются в растение (чаще всего модельное), после чего с помощью гистохимического анализа или флуоресцентного метода оценивается активность промотора. Комбинация данного метода, анализ последовательности ДНК и экспрессии РНК позволяют получить детальную информацию относительно активности промотора, силы и тканевой специфичности.

В последнее время все больший интерес к плодоспецифичным промоторам связан с получением съедобных вакцин. Томат является удобной растительной системой для производства рекомбинантных антигенов, а доступность плодоспецифичных промоторов позволяет получать растения с высоким уровнем накопления гетерологичных белков в плодах (Jiang et al., 2006; Lou et al., 2007; Kim et al., 2012; Ramirez et al., 2007). В большинстве работ, связанных с плодоспецифичной экспрессией в растениях томата, успешно использовали промоторы *E8* и *2A11* (Pandey et al., 2014; Huang et al., 2015; Sagor et al., 2015). Однако, несмотря на это, и эти промоторы имеют ряд недостатков. Например, *2A11* напрямую и строго зависит от концентрации этилена. Недавно было показано, что промотор *E8* не обладает строгой плодовой специфичностью (Timerbaev et al., 2019), что идет в разрез с ранее опубликованными данными (Deikman et al., 1992; Krasnyanski et al., 2001; Ramirez et al., 2007). Недостатком промотора гена *LeACO1* является минорная активность в стареющих листьях, цветках и в местах поранений (Blume and Grierson, 1997).

Полигалактуроназа (PG) – основной фермент разрушения полиуронидов клеточной стенки. Он транскрипционно активируется при созревании плодов (DellaPenna et al., 1989; Montgomery et al., 1993), мРНК *PG* не детектируется в незрелых плодах томата, но ее уровень резко повышается при созревании и может составить более 1% от тотальной поли(А)+ РНК (Sheehy et al., 1987). Промотор гена *PG* длиной около 1400 п.н. способен специфично направлять экспрессию генов в ткани плодов томата (Bird et al., 1998).

Последовательность промотора *PG* была установлена в 1988 году, после чего началось его активное изучение (Bird et al., 1988). В этой последовательности были обнаружены этилензависимые мотивы (Nicholass et al., 1995). Анализ трансгенных растений с низким уровнем этилена показал, что для индукции и образования мРНК *PG* требуется очень незначительная концентрация этилена (Sitrit and Bennett, 1998). *PG* промотор был исследован как сравнительным анализом последовательности с имеющимися базами данных, так и с помощью серии конструкций, в которых укороченные формы промотора контролируют

экспрессию гена *gusA*. Эксперименты выявили, что фрагмент промотора размером 231 п.н. является минимальным промотором, активируемым при созревании. Последовательность ДНК между –231 и –134 п.н. необходима для транскрипции в созревающих плодах минимального промотора, таким образом, участок ДНК размером 104 п.н. содержит регион, активируемый при созревании. Сравнение этого участка с последовательностью промотора гена *E8* (Deikman et al., 1992), которая ответственна за экспрессию гена вне зависимости от концентрации этилена, не позволило выявить значительную гомологию. Также не было обнаружено гомологичных регионов по сравнению с другими промоторами генов, зависящих от концентрации этилена (Cordes et al., 1989; Rottman et al., 1991).

Экспрессия PG::*GUS* химерного гена с последовательностью *PG* размером 1411 п.н. в трансгенных томатах была схожей с экспрессией эндогенного полигалактуроназного гена. Локализации β-глюкуронидазы в этом случае обнаруживалась преимущественно во внешнем перикарпе. Укорочение промоторной области до 1150 п.н. вызывало появление *GUS* активности во внутреннем перикарпе, что свидетельствует о существовании негативного мотива регуляции между 1150 и 1411 п.н. Интересно, что и в этом случае не обнаруживалось активности β-глюкуронидазы в незрелых плодах, листьях и корнях. Позитивный регуляторный регион был обнаружен между –806 и –443 п.н. При делетировании этого региона снижалась активность *GUS* во внутреннем перикарпе. Еще один участок позитивной регуляции между –231 и –134 п.н. специфично активировал экспрессию во внешнем перикарпе плода. Эти данные свидетельствуют, что экспрессия *PG* в созревающих плодах это результат комплекса взаимодействий между позитивными и негативными регуляторными элементами промотора.

В более поздних исследованиях выяснилось, что сила этого промотора не обеспечивает высокого уровня экспрессии трансгена в плодах томата. При использовании *PG* промотора попытки запуска РНК-интерференционного механизма для супрессии гена *LeACO1* оказались безуспешными, в отличие от CaMV35S (Тимербаев и Долгов, 2011). Версия промотора *PG* длиной 4800 п.н.



обеспечивает значительно более высокий уровень экспрессии репортерного гена (Nicholass et al., 1995), но возникают очевидные трудности при использовании таких больших регуляторных элементов, особенно когда несколько генов вводятся в один вектор. В настоящее время в растения вводят гены, кодирующие целые каскады метаболических путей. Для этого необходим целый ряд различных промоторов, поскольку введение повторяющихся последовательностей может привести к нежелательному гомологически зависимому замалчиванию генов (Meyer and Saedler, 1996). Несмотря на интенсивное изучение регуляторных элементов растений, выбор сильных тканеспецифичных промоторов очень ограничен.

## **1.2. Способы получения безмаркерных трансгенных растений**

Одной из основных опасений общества, связанных с генетически модифицированными (ГМ) растениями, является использование генов устойчивости к антибиотикам в процессе генетической трансформации. Потребность в таких селективных генах далее теряется, но эти последовательности ДНК остаются навсегда в геноме трансгенного растения. Другой проблемой является применение чужеродных генетических элементов, особенно вирусных регуляторных последовательностей, для экспрессии генов-мишеней в трансгенных растениях. Следует отметить, что эти опасения в основном необоснованны и продвигаются по экономическим причинам или из-за недостаточной осведомленности общественности. Тем не менее, во-первых, мнение большинства потребителей нельзя игнорировать. Во-вторых, ограничения стимулируют расширение областей научных исследований и развитие новых технологий. Например, активно развивающиеся технологии редактирования генома, в первую очередь система CRISPR/Cas9, пришедшая на смену ZFN и TALEN, создали настоящий бум в научном сообществе. Количество научных публикаций, посвященных редактированию генома растений, увеличилось с 19 в 2013 году до 148 в 2017 году (Мирошниченко и др., 2018). Однако энтузиазм и оптимизм многих ученых снизились после 25 июля 2018 года, когда Суд

Европейского Союза постановил, что организмы, полученные с помощью технологий редактирования генов, таких как CRISPR/Cas9, являются генетически модифицированными организмами (ГМО) и подпадают под действие существующих европейских законов, ограничивающих выращивание и продажу ГМ культур (Court of the European Union, 2018). Таким образом, по нашему мнению, разработка традиционных подходов трансгеноза растений, интерес к которым в значительной степени снизился после распространения технологий редактирования генома, остается актуальной и в настоящее время. Это особенно верно при создании цисгенных и интрагенных растений.

Отсутствие генов устойчивости к антибиотикам, вероятно, станет требованием для получения разрешения на высвобождение генетически модифицированных организмов в открытые системы, особенно в регионах с недоверием к ГМО, таких как Европейский Союз. Например, в 2010 году картофель AMFLORA с высоким содержанием амилопектина был разрешен к коммерческому выращиванию в ЕС. AMFLORA подверглась критике за наличие гена устойчивости к антибиотику *nptII* и была отозвана Европейской комиссией в 2013 году с рынка ЕС из-за процедурных ошибок в процессе одобрения (Kamle et al., 2017). В одном из отчетов Европейской комиссии прозвучало заявление, что цисгенные растения становятся более принимаемыми и одобряемыми в Европе (Gaskell et al., 2013). Чтобы соответствовать современным тенденциям, некоторые правительства реализуют глобальные проекты с подходами по минимизации чужеродной ДНК в геномах технических культур. С 2006 по 2015 годы Университет и научно-исследовательский центр Вагенингена осуществляли проект «Стабильная устойчивость картофеля к фитофторе», направленный на стимулирование исследований по генетической модификации и проведение публичных дебатов по таким инновационным генетическим методам, как цисгенез (Haverkort et al., 2016).

Для получения трансгенных растений используются системы селекции, в которых трансформированные клетки и ткани получают возможность роста в селективных условиях с использованием различных химических агентов. Гены,

кодирующие устойчивость к специфическим антибиотикам и гербицидам, нашли наибольшее применение для быстрой идентификации трансформированных клеток, тканей и регенерирующих корней. Антибиотики и гербициды убивают нетрансгенные растительные клетки с помощью различных механизмов. Использование селективного давления в средах для регенерации позволяет выжить клеткам, трансформированным селективными маркерными генами, тогда как нетрансгенные клетки в этих условиях гибнут.

Создание растений с новыми признаками, которые не содержат вирусный или бактериальный генетический материал, является современным подходом, а благодаря научному и биотехнологическому прогрессу этот подход отвечает реалиям XXI века и растущим требованиям биобезопасности. Подходы без применения селективных маркерных генов для получения трансгенных растений применяются достаточно редко в силу долгого и кропотливого отбора трансформированных тканей. Все вышеперечисленное привело к необходимости разработки технологий для получения трансгенных растений, не содержащих в своем геноме селективных маркерных генов.

### **1.2.1. Позитивная селекция**

Все вышеперечисленные способы отбора трансформированных клеток заключаются во встраивании генов, которые позволяют этим клеткам расти на селективной среде, тогда как нетрансформированные клетки гибнут – это так называемая негативная селекция. Однако в последнее время все большую популярность приобретают альтернативные стратегии, при которых нетрансформированные клетки останавливались в развитии, а трансформированные получали метаболическое преимущество. Такие системы получили название позитивная селекция или «antibiotic-free selection» и в них применяли гены, позволяющие трансгенным клеткам использовать некоторые вещества, недоступные для метаболизма нетрансформированных клеток. В ряде случаев использование позитивной селекции позволяло существенно повысить частоту трансформации, но главное преимущество позитивной селекции

заключается в отсутствие генов устойчивости к антибиотикам в трансгенных растениях.

#### Использование не утилизируемых сахаров для растительной селекции

Широкое использование в качестве селективных агентов при трансформации растений получили не утилизируемые растениями сахара (Haldrup et al., 1998).

Подобные схемы позитивной селекции были разработаны при использовании генов *xylA* и *DOG<sup>R1</sup>*. Так, ген *xylA*, кодирующий фермент ксилозоизомеразу, позволяющий утилизировать ксилозу как источник углеводов, изолированный из бактерий *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* и из *Streptomyces rubiginosus*, был использован для трансформации картофеля, табака и томата (Haldrup et al., 1998). Ген *DOG<sup>R1</sup>*, кодирующий фермент 2-дезоксиглюкозо-6-фосфат фосфатазу (2-DOG-6-P), был изолирован из дрожжей и использовался для трансформации табака и картофеля, придавая трансформированным клеткам устойчивость к 2-дезоксиглюкозе (Kunze et al., 2001).

Ген *galT*, кодирующий фермент галактозо-1-фосфат уридилтрансферазу, был использован при трансформации картофеля на селективной среде с добавлением галактозы. В растительной клетке происходит фосфорилирование галактозы ферментом галактокиназой с образованием токсичного продукта галактоза-1-фосфата. В нетрансформированных клетках галактозо-1-фосфат ингибирует фермент фосфоглюкомутаза, преобразовывающий глюкозо-1-фосфат в глюкозо-6-фосфат (Deu, 1980), что вызывает гибель клетки. Полное метаболизирование галактозо-1-фосфата может быть достигнуто при использовании двух ферментов: галактозо-1-фосфат уридилтрансферазы, переводящей галактозо-1-фосфат в UDP-галактозу, и UDP-галактозо-эпимеразы, переводящей UDP-галактозу в UDP-глюкозу. Однако в данной селективной системе повышение устойчивости трансформированных клеток к галактозе было достигнуто при экспрессии только одного фермента *galT*, по-видимому, являющегося ключевым в метаболизме галактозы.

Еще один метод позитивной селекции был предложен Erikson с коллегами

(Erikson et al., 2004). Данный метод основан на токсичности различных D-аминокислот и их метаболитов для растений. Ген *dao1* кодирует оксидазу D-аминокислот (DAAO), катализирующую окислительное дезаминирование таких аминокислот. С использованием гена *dao1* были получены трансгенные растения арабидопсиса.

И, наконец, использование маннозы в качестве селективного агента основано на неспособности растений использовать этот сахар в качестве источника углерода при гетеротрофном питании. Это обусловлено низким уровнем эндогенной концентрации фермента фосфоманнозо-изомеразы (PMI) у большинства видов растений. Однако, трансгенные клетки, экспрессирующие ген *pmi* (*man*), получают способность переводить маннозо-6-фосфат во фруктозо-6-фосфат, делая возможным включение маннозы в цикл гликолиза (Joersbo et al., 1998). В противном случае экзогенная манноза, присутствующая в селективной среде в значительно более высоких, чем физиологические, концентрациях, превращается в накапливающийся в клетках маннозо-6-фосфат, что приводит к резкому недостатку фосфата, участвующего в огромном числе биохимических процессов в клетке и АТФ голоданию. Также было показано, что маннозо-6-фосфат может вызывать апоптоз клетки путем индукции эндонуклеаз (Stein and Hansen, 1999). Это явление было названо токсичностью маннозы и в случаях, когда уровень эндогенной фосфоманнозо-изомеразы особенно низок, это может приводить к гибели клеток (Weiner et al., 1992). Таким образом, манноза может выступать в качестве прекрасного селективного агента: она хорошо растворяется в культуральных средах, активно поглощается растительными клетками, достаточно дешева, легкодоступна и хранится длительное время.

Селекция на маннозе была успешно применена при трансформации сахарной свеклы, кукурузы, пшеницы, овса, ячменя, томата, картофеля и подсолнечника, сливы (Joersbo and Okkels, 1996; Joersbo et al., 1998; Bojsen et al., 1998; Negrotto et al., 2000; Wang et al., 2000; Boscariol et al., 2003; Sidorova et al., 2017). В некоторых случаях при использовании позитивной селекции на маннозе частота трансформации в 10 и более раз превышала частоту трансформации,

наблюдаемую при использовании в качестве селективного агента канамицина (Wright et al., 2001; Joersbo and Okkels, 1996).

#### Использование неметаболизируемых гормональных конъюгатов

Другая концепция отбора трансгенных растений с использованием позитивной селекции была предложена в 1996 году (Joersbo and Okkels, 1996). Принцип метода основывается на факте, что при добавлении цитокининов в среду для растений создаются оптимальные условия для регенерации эксплантов. При добавлении цитокинина в виде неактивного глюкуронидного производного, растительные клетки, приобретенные ранее репортерный ген *gusA* с помощью трансформации способны конвертировать цитокинин бензиладенин-N-3-глюкуроид в активный цитокинин бензиладенин. Этот цитокинин действует только на трансформированные клетки, стимулируя их регенерацию, но не влияет на нетрансформированные клетки (Okkels et al., 1997). Дополнительным плюсом данной стратегии является то, что ген *gusA* выполняет двойную функцию – селективного и маркерного генов. В первых экспериментах селекция инокулированных агробактериями листовых эксплантов табака на бензиладенин-N3-глюкуроиде вызывала 1,7–2,9 кратное повышение частоты трансформации по сравнению с селекцией на канамицине (Joersbo and Okkels, 1996).

Еще одним примером позитивной селекции, основанной на изменении уровня фитогормонов, может служить система, получившая название МАТ (multi-auto-transformation или multi-autonomous-transformation system) (Ebinuma et al., 1997). Система МАТ основана на визуальном отборе трансгенных растений, содержащих *ipt* ген (Endo et al., 2001; Ebinuma and Komamine, 2001). Ген *ipt*, кодирующий фермент изопентенил фосфотрансфераза, был изолирован из Ti-плазмиды *Agrobacterium tumefaciens*. Экспрессия этого гена в трансгенных растениях повышает уровень изопентенил-АМФ, который является предшественником для нескольких цитокининов, в результате чего эндогенный уровень цитокининов повышается, а растения теряют выраженное апикальное доминирование и способность укореняться. Такого типа фенотип легко обнаруживается визуально, и получил название «цитокининовый синдром»

(extreme shooty phenotype). В качестве других альтернативных маркерных генов в этой системе могут использоваться *rol* гены, выделенные из штаммов *Agrobacterium rhizogenes*. Гены *rol* ответственны за пролиферацию «бородатых корней» за счет повышения чувствительности к ауксинам, что также делает возможным визуальный отбор трансгенных тканей. Таким образом, используя онкогены в качестве селективных агентов, трансформированные ткани легко отбираются визуально, однако для получения трансгенных растений с нормальным фенотипом, онкогены должны быть удалены из генома. Вторым шагом, для получения трансгенных растений с нормальным фенотипом, *ipt* или *rol* гены удаляются из генома. В первых МАТ системах удаление *ipt* осуществлялось с использованием инвертированных повторов *Ac* транспозона из кукурузы, однако, частота выпадения маркерного *ipt* гена была очень низкой (0,1–0,5%). Позже для удаления маркерного гена стали использовать R/RS систему рекомбинации из *Zygosaccharomyces rouxii* (Sugita et al., 1999, 2000), благодаря чему эффективность удаления возросла до 70%. Еще большая эффективность получения свободных от маркерных генов трансгенных линий была достигнуто за счет использования дексаметазон-индуцибельной системы экспрессии маркерного гена *ipt* (Kunkel et al., 1999).

Плюсом данной концепции так же, как и при селекции на неметаболизируемых сахарах является отсутствие необходимости интродуцировать в растительный геном гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам.

Из недостатков можно отметить невысокую универсальность стратегии для разных видов растений, поскольку для достижения высокого уровня регенерации (который бы позволил отобрать трансгенные клетки) для каждой культуры цитокинина, как и его концентрация должны подбираться отдельно. В ряде случаев этого сделать вообще не удастся. Другим недостатком является присутствие в растительном геноме репортерного гена бактериального происхождения.

### 1.2.2. Котрансформация

Один из способов получения безмаркерных растений – это котрансформация. Когда целевой и маркерный гены интродуцированы в растительный геном отдельно, использование приемов селекции позволяет получить растения, содержащие только целевой ген, т. е. безмаркерные. В классическом методе получения трансгенных растений целевой и маркерный гены объединены в едином регионе Т-ДНК вектора, соответственно они наследуются в поколениях как одна единица. Чтобы этого избежать целевой и маркерный гены должны быть интегрированы как различные сайты и располагаться в разных хромосомах растительного генома.

Применение котрансформации с использованием агробактерий возможны различные варианты расположения маркерного и целевого генов в векторе:

- два разных штамма агробактерий, несущих векторы для трансформации, один из которых содержит маркерный ген, а другой – целевой;
- один бактериальный штамм с двумя векторами, каждый со своим геном;
- один бактериальный штамм с одним вектором, в котором оба гена локализованы в различных позициях (в двух областях Т-ДНК).

Котрансформацию можно считать успешной, если оба гена интегрированы независимо друг от друга. Многочисленными исследованиями показано, что все три приема могут с успехом применяться для котрансформации, однако эффективность процесса сильно варьирует между различными видами растений, в том числе и в экспериментах с арабидопсисом, рапсом и табаком. Есть данные, что коперенос двух областей Т-ДНК, находящихся в одном «супер-бинарном» векторе в одном бактериальном штамме идет со значительно большей эффективностью, чем при использовании двух различных штаммов (Depicker et al., 1985). Однако в чем преимущество этой системы остается непонятным, поскольку также возрастает вероятность интеграции обеих областей Т-ДНК в один локус.

Второй шаг для получения безмаркерных растений – это сегрегация. После того как целевой и репортерный гены были независимо интродуцированы в



растительный геном, они могут быть разделы в следующих поколениях трансгенных растений. Сегрегация основывается на таком фундаментальном процессе как наследование. Большинство растений содержат как минимум двойной набор хромосом. Однако нововведенный трансген (целевой или маркерный ген) локализован только в одном наборе хромосом. Другой набор либо не содержит вставки трансгена либо содержит только один из них. При образовании гамет хромосомы расходятся, таким образом, каждая такая клетка может содержать в своем хромосомном наборе либо один трансген, либо оба. При этом возможно большое количество комбинаций. По статистике в среднем 25% нового поколения растений не содержат маркерного гена. Таким образом, с помощью данного метода маркерный ген, изначально способствующий идентификации успешно трансформированного растения, может быть удален из растительного генома.

К минусам котрансформации можно отнести, то, что этот метод не может быть применен к вегетативно размножаемым растениям, а также к деревьям, генерации которых достаточно длительный процесс. Другим минусом являются большие временные затраты, поскольку после выявления растений без маркерных генов необходимо отобрать в дальнейшем потомков со стабильным наследованием признака.

### **1.2.3. Удаление маркерных генов с помощью транспозонов**

В конце 40-х годов прошлого века Barbara McClintock сделала ошеломляющее открытие. При изучении мозаичной окраски эндосперма у кукурузы она обнаружила два фактора ДНК транспозиций в кукурузе: *Ds* (диссоциатор) и *Ac* (активатор). Было сделано предположение, что нестабильные фенотипы кукурузы вызваны перемещением или транспозицией элемента *Ds* (McClintock, 1950). Так стали известны транспозоны, также известные как «прыгающие гены», представляют собой последовательности ДНК, которые перемещаются из одного местоположения в геноме в другое. Они кодируют как минимум один белок, который делает их способными к репликации. Такие

элементы также начали использовать для получения трансгенных безмаркерных растений. Применение транспозонных элементов для удаления маркерных генов включает несколько шагов:

- вставка маркерного гена в транспозон, элемент, который «прыгает» внутри растительного генома;
- котрансформация с целевым геном;
- сегрегация маркерного гена в поколениях.

Опосредованную транспозоном реинтеграцию трансгена первоначально использовали, чтобы репозиционировать репортерный ген *uidA* на основе диссоциации в трансгенном томате (Goldsbrough et al., 1993). В первых МАТ системах, как было сказано ранее, удаление селективных маркерных генов осуществляли с использованием инвертированных повторов *Ac* транспозона из кукурузы. Эти векторы, содержащие также ген *ipt*, были спроектированы таким образом, чтобы после трансформации листовых сегментов табака, дальнейшее удаление маркерного гена осуществлялась без опыления и получения семян (Ebinuma et al., 1997).

Однако существуют серьезные недостатки данной системы удаления маркерных генов:

- в разных видах растений уровень транспозиций сильно варьирует;
- метод требует значительных денежных и временных затрат для получения следующих поколений и их анализов;
- низкая эффективность получения безмаркерных трансгенных растений благодаря повторному (многократному) встраиванию транспозонных элементов в растительный геном;
- неточное вырезание;
- появление мутаций из-за нескольких циклов вырезания-встраивания;
- геномная нестабильность трансгенных растений благодаря длительному присутствию гетерологичных транспозонов (Scutt et al., 2002).

#### 1.2.4. Удаление маркерных генов с помощью рекомбиназ

Одним из удобных подходов для получения растений без маркерных генов является использование индуцибельных сайт-специфических рекомбиназ, которые после отбора растений с соответствующим агентом позволяют удалить нежелательную ДНК. На сегодняшний день хорошо описаны три основные системы, основанные на сайт-специфических рекомбиназах. Это система Cre/Lox фага P1 (Dale and Ow, 1991), система рекомбиназы FLP/FRT из *Saccharomyces cerevisiae* (Lyznik et al. 1996) и система рекомбиназы R/RS из *Zygosaccharomyces rouxii* (Onouchi et al. 1995; Sugita et al., 1999, 2000).

Одним из самых удачных примеров разработки и совершенствования такой системы – векторные конструкции упоминаемой ранее МАТ системы (Ebinuma et al., 1997). Система МАТ была основана на визуальном отборе трансгенных растений, содержащих онкогены – *ipt* или *rol* гены (Ebinuma et al., 1997; Endo et al., 2001; Ebinuma and Komamine, 2001). В современных МАТ системах для создания безмаркерных биотехнологических культур нового поколения удаление селективных генов осуществляется с использованием R/RS системы рекомбинации из *Z. rouxii* (Sugita et al., 2000). После отбора трансформантов химическая активация рекомбиназы приводит к элиминации ненужной части Т-ДНК из растительного генома.

К настоящему времени создано большое количество векторов, использующих МАТ систему – в них реализованы различные комбинации онкогенов, в том числе под различными регуляторными элементами, с репортерными генами, кодирующими GUS и GFP, а также селективными генами. С помощью данных векторов были получены трансгенные растения табака, тополя, маниока, цитрусовых, декоративных цветов нирембергии. Для создания безмаркерных нанобиотехнологических культур нового поколения выбор МАТ вектора (соответственно селективного онкогена и репортерного гена) должен осуществляться с учетом особенностей культуры растения и опыта по его регенерации и трансформации.

Поскольку способы получения растений, свободных от маркерных

(селективных) генов приобрели особую актуальность лишь недавно, первые работы посвящены обработке новых разрабатываемых технологий и, несмотря на более чем десятилетнюю историю развития МАТ системы, работ, в которых созданы безмаркерные растения с целевыми генами, единицы. Поэтому очень важно использовать современные наработки в российской прикладной науке, это позволит продвинуть отечественную биотехнологию на новый конкурентоспособный уровень.

Одна из последних систем, использующих рекомбиназу R, была разработана в Wageningen Plant Research (Вагенинген, Нидерланды; Schaart et al., 2004). Она получила название pMF (marker-free). В этой системе не используются гены, повышающие регенерационную способность растений. Отбор трансгенных растений на первом этапе осуществляется с помощью селекции на широко распространенных в биотехнологии агентах (и, соответственно, для многих видов растений разработаны методики по трансформации). На сегодняшний день доступны 3 вектора данной системы: с генами растительной устойчивости к канамицину, гигромицину и фосфинотрицину. Выбор вектора со своим селективным маркерным геном зависит от трансформируемой культуры. Самый распространенный антибиотик для селекции трансгенных растений – канамицин, однако для некоторых видов растений он не подходит в силу низкой чувствительности тканей к нему. Например, для многих плодовых растений (яблони, груши и сливы) гораздо удобнее использовать гигромицин в качестве селективного агента. Основным преимуществом этой системы над другими является последовательная двойная селекция. После агробактериальной трансформации, на первом этапе регенеранты отбираются с использованием антибиотиков, таких как канамицин или гигромицин. В дальнейшем происходит химическая активация рекомбиназы, которая вырезает последовательности ДНК (содержащие ген самой рекомбиназы, а также селективные гены), фланкированные интактными сайтами рекомбинации (RS). Рекомбиназа в трансляционном слиянии с лиганд-связывающим доменом (LBD) глюкокортикоидного рецептора находится в инактивированном состоянии. Ее

активация осуществляется после инкубации растительной ткани в растворе дексаметазона. На втором этапе происходит отбор побегов на среде с 5-фторцитозином (5-ФЦ). Растительные ткани, в которых не было осуществлено удаление ДНК с селективными генами, не образуют вторичных регенерантов, так как в них экспрессируется ген *codA*, кодирующий цитозин-деаминазу. Этот фермент превращает нетоксичный 5-ФЦ в цитотоксический 5-фторурацил, что делает невозможным получение химер из-за неполного удаления ДНК. Эта система была успешно применена на таких культурах, как клубника, яблоня и груша (Schaart et al., 2004; Vanblaere et al., 2011; Righetti et al., 2014; Krens et al., 2015). Описанные векторы для трансформации растений системы pMF коммерчески доступны, более подробную информацию можно найти на сайте Международного исследовательского центра растений (URL: <http://www.pri.wur.nl/uk>).

Из нескольких методов получения трансгенных растений, не содержащих в своем геноме чужеродных нежелательных последовательностей ДНК (селективные, маркерные гены) доступных на сегодняшний день, включая котрансформацию и сегрегацию, наиболее предпочтительным является использование современных векторных систем, созданных с применением новых знаний и методов в области молекулярной биологии, позволяющим удалять селективные гены.

### **1.3. Суперсладкий белок тауматин и его использование в биоинженерии растений**

Для людей с диабетом и людей, склонных к ожирению, замена сахарозы на низкокалорийные или некалорийные натуральные подсластители, часто является единственным вариантом, позволяющим избежать изменений в привычках питания по медицинским показаниям. Среди немногих сладких на вкус белков тауматин является наиболее изученным, коммерциализированным и регулируемым (O'Brien-Nabors, 2011; Garcia-Almeida et al., 2018). Тауматин был выделен из плодов африканского растения *Thaumatococcus daniellii* Benth. (van der

Wel and Loeve, 1972). Он имеет в 3000 раз больше сладости, чем сахароза, а в молярном соотношении примерно в 100000 раз ее слаще (Nikoleli and Nikolelis, 2012). Восприятие сладости тауматина в некоторой степени задерживается – сладкий вкус сохраняется в течение длительного времени, и он оставляет небольшое лакричное послевкусие (Nairn et al., 1986). Пороговое значение сладости тауматина у людей составляет 50 нМ, это одно из самых низких значений среди белков со сладким вкусом. Восприятие сладости в некоторой степени задерживается, и оно оставляет легкий лакричный привкус (Nairn et al., 1986). Тауматин безопасен в качестве подсластителя и не обладает аллергенностью или токсичностью. Он был одобрен в Европейском Союзе с 1984 года (пищевая добавка E 957; Scientific Opinion on the safety of the extension of use of thaumatin (E 957), 2015). Зрелый белок состоит из одной цепи из 207 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 22 кДа (van der Wel and Loeve, 1972). Тауматин также действует как усилитель вкуса и модификатор в пищевой промышленности. Кроме того, тауматин II обладает противогрибковой активностью и способен выполнять защитные функции у трансгенных растений (Vigers et al., 1992; Popowich et al., 2007).

В первых работах с геном тауматина II в качестве объектов использовали растения картофеля (Witty, 1990) и огурца (Szwacka et al., 1996). Экспрессия гена тауматина II в трансгенном огурце вызывала не только более сладкий вкус, но и улучшение аромата (Szwacka et al., 1996). К настоящему времени создано немало количество культур, включая сельскохозяйственные, которые экспрессируют ген тауматина II, среди которых картофель (Witty, 1990), огурец (Szwacka, 1996), груша (Lebedev et al., 2002), томат (Bartoszewski et al., 2003), яблоня (Dolgov et al., 2004), клубника (Schestibratov and Dolgov, 2005), табак (Rajam et al., 2007), гиацинт (Popowich et al., 2007), морковь (Sidorova et al., 2013) и др.

Важным компонентом в описании классического вкуса томатов является сахар. Сорты сладких томатов всегда ценились потребителями и фермерами. Не секрет, что безвкусные томаты постепенно наводнили рынок Российской Федерации. Совсем недавно было обнаружено, что при одомашнивании и

улучшении томата, особенно направленных на повышение устойчивости к болезням, происходит значительная потеря генов и интенсивный негативный отбор генов (Gao et al., 2019). Это объясняет, среди прочего, ухудшение вкуса томата во время селекции. Повышение сладости яблок также является актуальной проблемой в условиях умеренного российского климата. Можно предположить, что повышение сладости плодов томата и яблони, а также придание им пикантного послевкуся, похожего на лакрицу, способно поднять интерес покупателей к такой продукции.

Цели вышеупомянутых исследований по модификации вкуса или повышению устойчивости были достигнуты благодаря высокой экспрессии тауматина, за счет использования вирусного конститутивного промотора, а геномы растений содержат маркерные гены.

Для целей селекции желательно производить растения, в которых отсутствуют гены устойчивости к антибиотикам и которые проявляют специфическую для плодов экспрессию гена тауматина II. Кроме того, в случае высокой экспрессии как результата подбора подходящего промотора, такие растения могут рассматриваться как потенциальные продуценты рекомбинантного тауматина II вместо микроорганизмов. В работе мы использовали один из самых хорошо охарактеризованных промоторов томата – *E8*. Транскрипция гена *E8* активируется на ранних стадиях созревания плодов (Deikman et al., 1992), поэтому промотор гена *E8* считается не просто плодоспецифичным, а специфичным для процесса созревания. Учитывая все вышеизложенное, в нашей работе мы использовали преимущественно плодоспецифичные промоторы – классический промотор *E8* и охарактеризованный нами сильный промотор *ELIP* для направленной экспрессии белка тауматина II в томатах (Timerbaev and Dolgov, 2019).

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Растительный материал

#### 2.1.1. Томат

Семена томата (*S. lycopersicum*) гибридной линии Ялф были любезно предоставлены Г. Монахосом (Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва). Растения томата выращивали в теплице Лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) (ФИБХ РАН, Пущино) при 25°C с 16-часовым фотопериодом.

Активность GUS в листьях, стеблях, корнях, цветах и плодах растений дикого типа и трансгенных линий анализировали методом гистохимического окрашивания сразу после сбора урожая. Для гистохимического и флуорометрического анализов плоды томатов собирали на пяти разных стадиях созревания: незрелая зеленая (10–12 дней после стадии антезис), зрелая зеленая, бланжевая, оранжевая (3–4 дня после бланжевой стадии) и стадия красной спелости (8–9 дней после бланжевой стадии).

#### 2.1.2. Яблоня

В экспериментах использовали растения гибрида яблони, полученные в результате свободного опыления сорта Мельба из Центральной генетической лаборатории (Мичуринск, Россия). Этот гибрид обладает лучшими характеристиками родительского сорта и в то же время имеет повышенную устойчивость к низким температурам, что важно в условиях умеренного климата. Растения яблони выращивали в теплице при тех же условиях, что и томат.



## **2.2. Создание бинарных векторов**

### **2.2.1. Бинарные векторы с новым промотором гена *ELIP* томата**

Геномная ДНК была выделена из молодых листьев стерильных растений томата гибридной линии Ялф с использованием набора GeneJET Plant Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Очищенную ДНК использовали в качестве матрицы в полимеразной цепной реакции. 5'-регион промотора *ELIP* длиной 2165 п.н. (относительно кодона инициации трансляции ATG) амплифицировали с использованием праймеров ES 5'-САТТАТТТТСТТСТАСТТGAG-3' и EF 5'-GAGCTGGGCTTTCCAAG-3', клонировали в векторе pGEM-T (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) и секвенировали. Делеционные варианты промоторной области гена *ELIP* (варианты -100, -200, -684 и -1065 п.н.) были получены с использованием обратного праймера ES и соответствующих прямых праймеров (EL100 5'-AGTAAATГААТАGGTTCGC-3', EL200 5'-АТТГААТТАСГТGGCTC-3', EL684 5'-ТАТТТТСАТТСТСААТТАТТТТ-3' и EL1065 5'-GTСТАТGТТТТGТААССАТG-3' соответственно). Другие версии промотора, -395 п.н. и -1369 п.н., были получены путем расщепления амплифицированного промоторного фрагмента с помощью рестриктаз *SacI* и *KpnI*, соответственно. Все делеционные варианты промотора *ELIP* (за исключением полной версии -2165 п.н.) были клонированы в векторе pUC18 (Yanisch-Perron et al., 1985). Корректность клонирования подтверждали секвенированием. Для создания бинарных векторов для агробактериальной трансформации растений последовательность конститутивного 35S промотора в плазмиде pBI121 (Clontech, Маунтин-вью, Калифорния, США) была заменена соответствующей версией промотора гена *ELIP*. Все созданные генетические конструкции были проверены с помощью рестрикционного анализа и названы в соответствии с длиной варианта.

### **2.2.2. Бинарные векторы для создания безмаркерных растений**

Бинарные векторы pMF-E8 и pMF-ELI, используемые для агробактериальной трансформации растений томата, были созданы на основе

вектора рМF1 (WPR, Вагенинген, Нидерланды; Schaart et al., 2004), который содержит рекомбиназу R из дрожжей *Z. rouxii*, слитую с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора и бифункциональный селективный ген *CodA-nptII*, позволяющий осуществлять отбор растений путем отрицательной селекции на 5-ФЦ после удаления нежелательного участка ДНК из генома. Общая схема стадий клонирования и создания плазмиды рМF-E8 была описана Timerbaev et al. (2019). Кодированная последовательность гена тауматина II была наработана с помощью ПЦР с плазмиды рUR528, содержащей фрагмент гена препротауматина II (Edens et al., 1982), с использованием праймеров Thau-CDS (Таблица 1). Фрагмент плодоспецифичного промотора E8 томата размером 1195 п.н. (GenBank № AF515784) и фрагмент терминатора гена *rbcS* томата размером 402 п.н. (GenBank № X05984) были получены методом ПЦР с геномной ДНК томата линии Ялф с наборами олигонуклеотидов E8-prom и 3A-ter соответственно. ПЦР-продукты были клонированы в модифицированный вектор рUC18 и секвенированы. Собранную экспрессионную кассету перенесли в вектор рМF1 по сайтам рестрикции *AscI* и *SbfI*. Клонирование ДНК проводили в соответствии со стандартными процедурами (Maniatis et al., 1982).

**Таблица 1** – Праймеры, использованные при клонировании и анализе растений яблони

Акроним	Ген или комбинация	Последовательность прямого/обратного праймеров (5'-3')	Размер ампликона (п.н.)	Метод применения
E8-prom	E8 (промотор)	СТАТСССГГГГАГГССГССАГААГГААТТ ТСАССГАААТС/ ТСАГГАТСССТТСТТТТГССАСТГТГААТГ	1146	ПЦР (клонирование)
3A-ter	Терминатор рибулозобисфосфаткарбоксилазы ( <i>rbcS3A</i> )	АСТГАССГГТТСТАГААААСТААТТГСС/ АСТССТГСАГГССАГГГАГТАГТАГАГАТ ААГ	423	--->---
Thau-CDS	Тауматин II (CDS)	ТАГГАТССАТГГСССГССАССАС/ АСТАССГГТТТАСТСГТСТТСААГТТСААГ	725	ПЦР (клонирование), Саузерн блоттинг
1. RS site	RS-сайт-35S промотор	СГАТТТГАТГАААГААТГААТТААТГ/ ГТГТГТССГТГССАССАТГ	526	ПЦР-анализ

## Продолжение Таблицы 1

2. CodA	CaMV35S промотор–цитозин деаминаза	ССААССАСГТСТТCAAAGCA/ AATGCCTTCAAACAGCGTGC	589	---»---
3. NptII	Неомицинфосфо- трансфераза II	TCTGATGCCGCCGTGTTCC/ ATGCGCGCCTTGAGCCTG	440	ПЦР-анализ, ОТ- ПЦР-анализ, Саузерн блоттинг
4. Nos ter	Терминатор нопалинсинтазы	CCGATCGTTCAAACAT/ GTAACATAGATGACACCGCG	249	ПЦР-анализ
5. 35S prom	CaMV35S промотор	AGCACGACACACTTGTCTACTC/ CTCTCCAAATGAAAT	406	ПЦР-анализ
6. RecR	Рекомбиназа R	ATGCGCAAGGAGGCAGGTCG/ GCCACACGGGAGACGCCTTC	637	ПЦР-анализ, ОТ- ПЦР-анализ, Саузерн блоттинг
7. Thau	Тауматин II	GCGCTGCCACCTTCGAGATCG/ GCAGGTGACGGTGGTTGGCT	584	ПЦР-анализ, ОТ- ПЦР-анализ
8. E8– Thau	E8 промотор– тауматин II	СТТААТCAGACGTATTGGGTTC/ AGCCTTTGATGTTGGAGATGTC	624	ПЦР-анализ
9. Thau– ter	Тауматин II– <i>rbcS3A</i> терминатор	GCTCAACCAGTACGGCAAGG/ CAAGGGAAAACCCAAAGGAG	445	---»---
NptIII	Неомицинфосфо- трансфераза III	CGGACAGCCGGTATAAAGG/ AGACAAGTTCCTCTTCGGGC	420	---»---
Actin	Актин 11	TCATCATACTCGGCCTTCGC/ CCATCCATGATTGGAATGGAAGC	302	ОТ-ПЦР-анализ
THFS	Формиат- тетрафолат лигаза	AGCAGCGTTGAATACTCAGAG/ ATACTGGGTTTTTCGCCATGC	99	Количественная ПЦР в реальном времени
TMp1	Мембранный белок типа I	AGACCGACTCAATGTTGCTCTC/ GTGGAAGGTGGTGCAAATCC	73	---»---
ACT11	Актин 11	GCTGTTCTTTCCCTCTACGC/ GCATGGGGAAAGAGCATATCC	110	---»---
Th84	Тауматин II	AGAGTCCTGGACCATCAAC/ CCGCTGTCGTCGAAATAG	84	---»---
Th113	----	GCACCGTGTTCAGACGAG/ GTCCAGGACATAACTGAACGC	113	---»---
Th95	----	AGCTCAACTCGGGAGAGTC/ GCTGTCGTCGAAATAGCAGTC	95	---»---

Обе плазмиды, содержащие кодирующую последовательность гена тауматина II, под контролем промотора гена *E8* длиной 1118 п.н. или промотора гена раннего светоиндуцируемого белка (ELIP), длиной 2165 п.н. (Timerbaev and Dolgov, 2019; GenBank № MK867692) и терминатора гена *rbcS* томата, длиной 402 п.н. Для агробактериальной трансформации яблони использовали бинарный вектор pMF-E8.

## **2.3. Агробактериальная трансформация растений**

### **2.3.1. Трансформация томата**

Агробактериальную трансформацию томата проводили согласно McCormick с соавторами (McCormick et al., 1986), с модификациями. Семена стерилизовали в течение 7–8 минут в 15% гипохлорите и переносили на среду Murashige и Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962). Через 2–3 недели семядоли, гипокотили и листья молодых проростков срезали, прекультивировали в темноте на агаризованной среде MS (здесь и далее имеется в виду твердая среда, если не указано иное), содержащей 5 мг/л 6-бензиламинопурина и 0,2 мг/л индол-3-уксусной кислоты (ИУК). Бинарные векторы, созданные в настоящем исследовании, так же как и плаزمида pBI121 (содержит ген *gusA* под контролем CaMV35S промотора) были введены в штамм *A. tumefaciens* AGL0 (Lazo et al., 1991) путем электропорации. Экспланты томата инокулировали суспензией трансформированных агробактерий в течение 30–60 минут на шейкере (150 об/мин) и затем помещали в среду MS без гормонов. Совместное культивирование проводили на свету в течение 2 суток. Затем, для элиминации агробактерий, экспланты промывали в воде с добавлением 600 мг/л тиментина и промакивали фильтровальной бумагой. После отмывки экспланты раскладывали на чашки Петри со средой MS с добавлением 1,0 мг/л зеатина и 0,1 мг/л ИУК, 50 мг/л канамицина и 300 мг/л тиментина для регенерации и отбора трансформантов. Побего-регенеранты срезали и укореняли на среде MS, содержащей 0,1 мг/л ИУК, 50 мг/л канамицина и 150 мг/л тиментина. Далее растения томата размножали на среде для укоренения, адаптировали и переносили в теплицу.

Трансгенная линия томата, с геном тауматина II под контролем конститутивного 35S промотора, полученная ранее (Firsov et al., 2012), была использована в качестве положительного контроля при проведении вестерн-блот-анализа.

### 2.3.2. Трансформация яблони

В условиях *in vitro* растения культивировали на агаризованной среде QL (Quorin and Lepoivre, 1977), содержащей 1,5–2,0 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,3 мг/л индол-3-масляной кислоты (ИМК). Укоренение побегов проводили на половинной среде QL с добавлением 0,5–1 мг/л ИМК. Фрагменты листьев растений, укорененных *in vitro*, использовали для трансформации. Кокультивирование листовых эксплантов со штаммом *A. tumefaciens* AGL0 (Lazo et al., 1991), несущим плазмиду pMF-E8, проводили на жидкой среде MS (Murashige and Skoog, 1962), содержащей 3 мг/л N-(2-хлор-4-пиридил)-N-фенилмочевину (4ХПФ), 1 мг/л 1-нафталинуксусной кислоты (НУК) и 1 мг/л 2,3,5-трийодбензойной кислоты (ТИБА) в течение 2–3 суток. Регенерацию проводили в темноте на той же среде с добавлением 500 мг/л цефотаксима и 35 мг/л канамицина. Побеги яблони непрерывно размножали и укореняли на половинной среде QL с добавлением 0,5 мг/л ИМК и 25 мг/л канамицина.

## 2.4. Функциональный анализ промотора гена *ELIP* томата

### 2.4.1. Отбор трансгенных растений томата с геном *gusA*

Наличие вставок в предполагаемых трансгенных растениях проверяли с помощью полимеразной цепной реакции с использованием праймеров *gusA1* (5'-TCGTAATTATGCGGGCAACGTC-3') и *gusA2* (5'-CGAATCSTTTGCCACGCAAG-3'). Семена растений T1 и T2 получали путем самоопыления растений томата. Семена стерилизовали и проращивали на среде MS, содержащей 150 мг/л канамицина. Чтобы избежать влияния множественных вставок T-ДНК на активность GUS, были отобраны только линии, демонстрирующие соотношение сегрегации 3:1 между устойчивыми и

неустойчивыми к канамицину растениями. Подобное соотношение должно свидетельствовать об однолокусной вставке. По пять гомозиготных линий (для каждого вектора), минимум по три растения на линию поколения T2 были адаптированы и перенесены в теплицу для дальнейшего анализа.

#### **2.4.2. Анализ последовательности промотора *ELIP***

5'-фланкирующую последовательность гена *ELIP* (2165 п.н. от старт-кодона ATG) анализировали *in silico* с использованием баз данных PLACE (Higo et al., 1999; URL: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) и PlantCARE (Lescot et al., 2002; URL: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) для выявления цис-регуляторных элементов. Для предсказания положения сайта инициации транскрипции (transcription start site, TSS) был использован ресурс Neural Network Promoter Prediction (Reese, 2001; URL: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)). Выравнивание областей гомологичных промоторов проводили с использованием онлайн-программы Pro-Coffee (Erb et al., 2012; URL: <https://tcoffee.vital-it.ch/apps/tcoffee/do:procoffee>). Поиск сходства последовательностей проводился с использованием онлайн программы Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) в National Center for Biotechnology Information (NCBI) (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### **2.4.3. Гистохимическое окрашивание GUS**

Для изучения гистохимической локализации активности GUS под контролем серии делеционных вариантов промотора *ELIP* и CaMV35S промотора, были проанализированы различные ткани растений томата, как описано Jefferson с соавторами, с некоторыми модификациями (Jefferson et al., 1987). Листья, цельные и разрезанные продольно цветы, поперечные продольные срезы стеблей, корневые сегменты и продольные срезы плодов на разных стадиях созревания инкубировали в темноте при 37°C в окрашивающем растворе на основе цитратного буфера (Vitha et al., 1993). Состав буфера включал 1 мг/мл X-Gluc (Thermo Fisher Scientific), 100 mM цитрат натрия (pH 8,0), 2 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 2 mM

$K_4Fe(CN)_6$ , 10 мМ EDTA (pH 8,0) и 0,1% Тритон X-100. После 12-часового окрашивания все ткани переносили в 70% этанол и инкубировали до полного удаления хлорофилла, периодически сменяя раствор этанола.

#### **2.4.4. Экстракция белка и флуориметрический анализ GUS**

Активность GUS определяли количественно по методике Jefferson с соавторами, с незначительными модификациями (Jefferson et al., 1987). Ткани плодов томата измельчали в жидком азоте с помощью фарфоровой ступки и пестика до порошкового состояния и суспендировали в буфере для экстракции белка (0,1 М  $NaHPO_4$ , pH 8,0, 0,1% додецилсульфат натрия, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол и 0,1% Тритон X-100), а затем центрифугировали. Супернатант использовали для количественного определения белка и флуориметрического анализа. Общая концентрация белка в образцах была определена методом Брэдфорда (Bradford, 1976) с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандарта. Активность GUS измеряли с использованием флуориметра FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия). Количество 4-метилумбеллиферона (4-ME) определяли с помощью стандартной кривой. Активность GUS выражали в виде количества 4-ME (нмоль), высвобождаемого в минуту на мг белка. Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для определения значимых различий в активности GUS в плодах томата различных трансгенных линиях. Для анализа использовали программу SPSS Statistics 6.0 (IBM, Армонк, Нью-Йорк, США). Были проанализированы по пять независимых линий для каждой генетической конструкции. Все количественные GUS-флуориметрические анализы повторяли три раза.

### **2.5. Создание безмаркерных растений томата**

#### **2.5.1. Подбор концентрации 5-фторцитозина для отрицательного отбора безмаркерных растений**

Перед началом экспериментов по получению безмаркерных растений томата мы исследовали влияние различных концентраций селективного агента 5-

ФЦ на эффективность регенерации томата. Поскольку цитозин-деаминаза (продукт гена *codA*) превращает нетоксичный 5-ФЦ в цитотоксический 5-фторурацил, это позволяет после активации рекомбиназы отбирать регенеранты с удаленной ДНК. Чтобы определить пороговое значение, при котором регенерация останавливается, мы выбрали пять концентраций 5-ФЦ от 50 до 250 мг/л. Гипокотили и семядоли нетрансгенных и трансгенных растений помещали в среду для регенерации с 5-ФЦ (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). После двух пассажей (около месяца) оценивали частоту регенерации.

### **2.5.2. Селекция безмаркерных растений томата**

После агробактериальной трансформации были применены две стратегии отбора безмаркерных трансгенных растений томата. При ранней селекции после трансформации векторами pMF-E8 и pMF-ELI были получены зеленые, плотные, морфогенные и устойчивые к канамицину каллусы. Отобранные каллусы размером приблизительно около 1 см<sup>3</sup> переносили в жидкую среду, содержащую 20 мкМ дексаметазона для индукции рекомбиназной активности. После инкубирования в течение одного часа на шейкере (150 об/мин), каллусы переносили на твердую среду для регенерации MS (1,0 мг/л зеатина и 0,1 мг/л ИУК) с добавлением 20 мкМ дексаметазона. После одной ночи экспланты культивирования перекладывали на ту же среду с добавлением 250 мг/л 5-ФЦ, а концентрацию дексаметазона уменьшали до 2 мкМ. Регенеранты, устойчивые к 5-ФЦ, отбирали и укореняли.

При использовании альтернативной стратегии отсроченной селекции после агробактериальной трансформации векторами pMF-E8 и pMF-ELI были получены стабильные трансгенные растения. Линии томата анализировали с помощью ПЦР, вестерн-блоттинга и органолептических тестов. Семена самоопыленных растений выбранных линий стерилизовали и проращивали на среде MS, содержащей 150 мг/л канамицина. Гипокотили и семядоли устойчивых к канамицину проростков срезали и обрабатывали дексаметазоном, как описано выше. После этого экспланты подвергали второму раунду регенерации побегов на селективной среде



с 5-ФЦ. Отобранные побеги анализировали с помощью ПЦР и переносили в теплицу для дальнейших экспериментов.

## **2.6. Создание безмаркерных растений яблони**

Растения трансгенных линий 1 и 6 размножали культивированием на среде для мультипликации. Далее листовые экспланты молодых побегов инкубировали в течение ночи на среде MS с добавлением 10 мкМ дексаметазона и переносили в среду для регенерации, содержащую 2 мкМ дексаметазона и 250 мг/л 5-ФЦ. Регенеранты укореняли и размножали на среде, содержащей 250 мг/л 5-ФЦ, и переносили в теплицу для дальнейших анализов.

## **2.7. Молекулярно-биологический анализ полученных растений**

### **2.7.1. ПЦР-анализ растений томата**

Для анализа ПЦР геномную ДНК из трансгенных и контрольных растений томата выделяли с использованием набора для очистки геномной ДНК растения GeneJET (Thermo Fisher Scientific). Первичные трансформанты томата, а также регенеранты, отобранные на среде с 5-ФЦ, были детально изучены на наличие целевых и селективных генов и их регуляторных элементов с помощью ПЦР-анализа. Первичные трансгенные линии проверяли на наличие последовательностей селективных генов и целевого гена с использованием следующих наборов праймеров: RS-сайт – 35S промотор (сайт RS; 5'-CGATTTGATGAAAGAATGAATTAATG-3' и 5'-GTGTGTCGTGCTCCACCATG-3'), неомицинфосфотрансфераза II (NptII; 5'-TCTGATGCCGCCGTGTTCC-3' и 5'-ATGCGCGCCTTGAGCCTG-3'), рекомбиназа R (RecR; 5'-ATGCGCAAGGAGGCAGGTCG-3' и 5'-GCCACACGGGAGACGCCTTC-3'), Thaumatin II (Thau; 5'-GCGCTGCCACCTTCGAGATCG-3' и 5'-GCAGGTGACGGTGGTTGGCT-3'). Предположительно безмаркерные линии анализировали с использованием праймеров, специфичных для промотора 35S вируса мозаики цветной капусты (35S prom; 5'-CTCCTCGGATTCCATTGC-3' и 5'-CCTCTCCAAATGAAATGAAC-3'), а также праймеров, специфичных для

терминатора нопалинсинтазы (nos ter; 5'-GATCGTTCAAACATTTGG-3' и 5'-CCGATCTGTAACATAGATG-3'), RecR и NptII для проверки отсутствия нежелательных фрагментов ДНК и подтверждения потери регуляторных элементов селективных генов. Праймер Thau и праймер на ген рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (*rbcS3A*) (5'-TCTAGAAAACTAATTGCC-3' и 5'-GAGGGAGTAGTAGAGATAAG-3') использовали для подтверждения присутствия экспрессионной кассеты целевого гена. Праймеры для селективного гена бактериальной устойчивости *nptIII* (5'-CGGACAGCCGGTATAAAGG-3' и 5'-AGACAAGTTCCTTTCGGGC-3') использовали для подтверждения отсутствия векторного остова в линиях томата без маркеров.

Реакции проводили с использованием ДНК-полимеразы Phire Hot Start II (Thermo Fisher Scientific) следующим образом: 1 цикл 30 с при 98°C, затем 29 циклов денатурации при 98°C в течение 5 с, отжига 5 с, элонгации при 72°C в течение 10 с и один последний цикл 60 с при 72°C. ПЦР проводили в 10-мкл реакционной смеси на приборе SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле, визуализировали с помощью бромида этидия в ультрафиолетовом свете и фотографировали.

### 2.7.2. ПЦР-анализ растений яблони

Геномную ДНК растений яблони выделяли из молодых листьев растений яблони *in vitro*, как описано Rogers and Bendich (Rogers and Bendich, 1994).

Первичные трансформанты яблони и все регенеранты, отобранные на среде с 5-ФЦ, были детально изучены на наличие целевых и селективных генов и их регуляторных элементов с помощью полимеразной цепной реакции. Девять пар праймеров были использованы для проведения ПЦР-анализа предполагаемых безмаркерных растений (Таблица 1). Реакции проводили с использованием HS Taq-полимеразы (Evrogen) следующим образом: 1 цикл 5 минут при 95°C, затем 29 циклов денатурации при 94°C в течение 20 с, отжиг 20 с, элонгация при 72°C в течение 40 с и один заключительный цикл продолжительностью 3 мин при 72°C.

Продукты ПЦР разделяли с использованием электрофореза в 1,2% агарозном геле, визуализировали с помощью бромида этидия в УФ-свете и фотографировали.

### 2.7.3. Саузерн-блот анализ

Геномную ДНК томата (20 мкг) и яблони (30 мкг) расщепляли 60U *Bgl*II и 60U *Hind*III, соответственно, в течение ночи при 37°C. Фрагменты ДНК разделяли в 0,9% агарозном геле и переносили на положительно заряженную нейлоновую мембрану Hybond N+ (GE Healthcare, Литл Чалфонт, Великобритания) капиллярным блоттингом в соответствии с инструкциями производителя. ДНК-зонды конструировали с помощью ПЦР с использованием плазмиды pMF-EI в качестве матрицы. ДНК-зонды размером 725 п.н. (для гена *thauII*), 440 п.н. (для гена *nptII*) или 637 п.н. (для гена *recR*) метили щелочной фосфатазой с использованием системы прямого мечения и обнаружения Amersham Gene Images AlkPhos (GE Healthcare). Предварительную гибридизацию, (в течение ночи при 62°C) с зондами, мечеными щелочной фосфатазой, и последующую промывку мембраны проводили в соответствии с протоколом системы прямой маркировки AlkPhos. Обнаружение проводили с использованием реагента обнаружения CDP-Star, следуя указаниям производителя (реагент Amersham CDP-Star Detection, GE Healthcare). Сигнал от блоттинга накапливали на рентгеновской пленке (Retina XBE blue sensitive, Carestream Health Inc., Рочестер, Нью-Йорк, США) в пленочной кассете при комнатной температуре в течение 24 часов. Рентгеновские пленки сканировали на приборе Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences, Япония). Один и тот же блот был использован несколько раз с разными зондами (*thauII*, *nptII* и *recR*). Блот стрипировали в 0,5% (вес/об.) растворе додецилсульфата натрия (SDS) при 60°C в течение 60 мин, как описано в протоколе для системы прямого мечения и детекции Amersham Gene Images AlkPhos.

## **2.8. Оценка экспрессии перенесенных генов**

### **2.8.1. Качественная полимеразная цепная реакция томата, сопряженная с обратной транскрипцией**

Тотальную РНК выделяли из листьев томата трансгенных и контрольных растений *in vitro* с использованием мини-набора GeneJET для очистки РНК растений (Thermo Fisher Scientific) и из красных, спелых плодов (через 8–9 дней после наступления бланжевой стадии) в соответствии с Meisel с соавторами (Meisel et al., 2005). Для этого два грамма ткани свежих плодов измельчали в фарфоровой ступке в присутствии жидкого азота и подвергали экстракции. Каждый образец обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Scientific), после чего спектрофотометрически измеряли концентрацию. кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы Maxima H Minus (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя с использованием олиго(dT)18 праймеров. Для реакции обратной транскрипции брали 3 мкг суммарной РНК. Для нормализации данных использовали специфичные праймеры для гена домашнего хозяйства рибосомного белка томата L2 (rpl2; 5'-GGTGACCGTGGTGTCTTTGC-3' и 5'-ACCAACCTTTTGTCCAGGAGG-3'; Fleming et al., 1993). Специфичные для тауматина II праймеры (ThauII; 5'-GCGCTGCCACSTTCGAGATCG-3' и 5'-GCAGGTGACGGTGGTTGGCT-3'), специфичные для неомицинофосфотрансферазы II праймеры (nptII; 5'-TCTGATGCCGCCGTGTTCC-3' и 5'-ATGCGCGCCTTGAGCCTG-3') и рекомбиназу R (recR; 5'-ATGCGCAAGGAGGCAGGTCG-3' и 5'-GCCACACGGGAGACGCCTTC-3') использовали для обнаружения экспрессии трансгена в полученных линиях томата. ПЦР-анализ и электрофорез проводили, как описано в разделе «2.7.1. ПЦР-анализ растений томата».

### **2.8.2. Полуколичественная ОТ-ПЦР яблони**

Суммарную РНК экстрагировали из листьев трансгенных и контрольных растений *in vitro* с использованием мини-набора для очистки РНК GeneJET Plant

(Thermo Fisher Scientific). Каждый образец обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Scientific).

кДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы Maxima H Minus (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. В реакционную смесь добавляли олиго(dT)<sub>18</sub> и случайные шестинуклеотидные (random hexamer) праймеры. Для каждого образца 3 мкг суммарной РНК отбирали для реакции обратной транскрипции в общем объеме 20 мкл. После проведения реакции смесь доводили до 40 мкл. Два мкл смеси кДНК использовали для реакции ПЦР. Ген «домашнего хозяйства» актин 11 использовали для нормализации данных в качестве внутреннего контроля. ПЦР проводили с использованием наборов праймеров на гены рекомбиназы R (RecR), неомицинфосфотрансферазы (NptII) и тауматина II (Thau) (Таблица 1), как описано выше. Количество циклов ПЦР было подобрано таким образом, чтобы ни один из продуктов анализируемых генов не достиг плато в конце амплификации, то есть они находились в экспоненциальной фазе амплификации. Образцы кДНК были проверены на контаминацию геномной ДНК с использованием контролей без обратной транскриптазы. Продукты ПЦР разделяли в 1,2% агарозном геле, фотографировали и анализировали с помощью программы GelQuant.NET (URL: <http://biochemlabsolutions.com>) для полуколичественной оценки.

### **2.8.3. Вестерн-блот анализ**

Растения томата выращивали в теплице, и для исследования использовали листья и красные, спелые плоды. Для приготовления общего растворимого белка плод томата (сегмент 0,5 г) или лист (0,1 г) измельчали в жидком азоте. Далее материал ресуспендировали в четырех объемах экстракционного буфера, содержащего 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ ЭДТА, рН 8,0, 10% (об./об.) глицерина, 30 мМ β-меркаптоэтанола, 4 мкг/мл аprotинина и 4 мкг/мл лейпептина. Общий (тотальный) белок экстрагировали в течение 20 мин при 4°C, затем центрифугировали в течение 10 мин при 16000g и 4°C, затем супернатант отбирали для дальнейшего анализа. Концентрацию белка измеряли с помощью

набора для анализа белка DC™ (BioRad, Геркулес, Калифорния, США). Общие белки разделяли с помощью SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (BioRad). Кроличьи поликлональные антитела против тауматина (разведенные 1 к 3000) служили первичными антителами. В качестве вторичного антитела использовали IgG кролика, конъюгированный с щелочной фосфатазой (1:6000) (Sigma). Блоты обрабатывали нитро синим тетразолием хлоридом (NBT), и 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфатом (BCIP) для визуализации. Коммерческий тауматин из *T. daniellii* (Sigma) использовали в качестве положительного контроля.

#### **2.8.4. Количественная оценка накопления тауматина в растениях томата**

Рекомбинантный тауматин определяли количественно с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Образцы белка серийно разводили в фосфатно-солевом буфере (PBS), pH 7,4 (0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 мг ОРБ (общий растворимый белок)/лунка), и в качестве референсного стандарта использовали тауматин из *T. daniellii* (Sigma). Планшеты инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре и блокировали PBS, содержащим 2% (вес/об.) бычьего сывороточного альбумина и 0,05% (об./об.) Твин-20 в течение 1 часа при 37°C. Затем планшеты инкубировали с кроличьими поликлональными антителами против тауматина (разведенным 1 к 6000) в течение ночи при 4°C, после чего вторичные антитела против кроличьего IgG конъюгировали с пероксидазой хрена (1:8000, BioRad). Между каждым этапом планшеты трижды промывали в течение 5 минут PBS с 0,05% Твин-20. Итоговые планшеты были получены путем добавления субстрата TMB Peroxidase EIA (BioRad). Односторонний дисперсионный анализ (ANOVA) использовали для определения значимости различий в концентрациях тауматина в листьях и плодах трансгенных линий с разными промоторами. ИФА проводили трижды для каждой анализируемой линии.

### **2.8.5. Анализ накопления тауматина в растениях яблони методом ПЦР в реальном времени**

Для количественного определения уровней РНК гена тауматина II провели ПЦР в реальном времени. Для реакции использовали кДНК контрольных и трансгенных растений яблони, полученных, как описано выше. Три референсных гена «домашнего хозяйства» были протестированы в качестве эндогенного контроля: *THFS*, *TMp1* и *ACT11* (Perini et al., 2014; Таблица 1). Мы также подобрали три набора праймеров для последовательности гена тауматина II (Таблица 1). Для каждой пары праймеров оптимальная температура отжига была найдена с использованием температурных градиентов. Мы проверили эффективность амплификации, используя серию 10-кратных разведений в трех повторностях. Эти значения были использованы для расчета стандартных кривых, а также для сравнения эффективности ПЦР. Эксперименты проводили на приборе LightCycler 96 (Roche Diagnostics GmbH, Мангейм, Германия) с использованием реагента PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) в планшетах (Axugen Biosciences, Юнион-Сити, Нью-Джерси, США) в объеме 20 мкл. Условия реакции ПЦР и анализ плавления продуктов были выбраны в соответствии с рекомендациями производителя. Метод  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak and Schmittgen, 2001) использовали для нормализации и калибровки значений *ThauII* относительно эндогенных контролей. Каждый образец был проанализирован в трех повторях. Расчет данных и статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения, поставляемого с устройством Roche, а также Microsoft Excel. Последовательности праймеров и размеры ампликонов приведены в Таблице 1.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Клонирование и анализ промотора *ELIP* томата

#### 3.1.1. Клонирование и анализ последовательности промотора *ELIP*

Фрагмент 5'-области гена *ELIP* томата размером 2165 п.н. был амплифицирован с геномной ДНК *S. lycopersicum*. Эту версию промотора мы условно назвали «полноразмерной» в настоящем исследовании. Для поиска гомологичных последовательностей в базе данных BLAST был проведен анализ 5'-региона, расположенного перед стартом инициации транскрипции. Оказалось, что область от –2047 до –1240 п.н. имеет 94% сходство с длинными концевыми повторами (ДКП, LTR, long terminal repeat,) ретротранспозона CopiaSL\_19 или ToRTL1 (Paz et al., 2017; Tam et al., 2007). Последовательность, окружающая ДКП, не содержит других элементов транспозона. 5'-область, частично находящаяся за пределами исследуемого промотора (от –3440 до –2132 п.н.), наиболее вероятно кодирует вариант транскрипта X2 гена *ELIP*, предсказанный с помощью автоматического вычислительного анализа (GenBank № XM\_026032693). Выяснилось также, что протяженный интрон из области между двумя экзонами (в функциональном гене *ELIP* три экзона) в обратной ориентации составляет основную часть (398 из 653 п.н.) третьего интрона гена Pb *S. lycopersicum* метилкетон-синтазы, расположенного на хромосоме 4 (GenBank № GU987113).

После клонирования промоторной области в векторе pGEM-T последовательность анализировали с использованием баз данных PLACE и PLANTCARE, доступных в сети интернет. Основные обнаруженные цис-регуляторные элементы и их местоположение представлены в Таблице 2. Анализ показал, что промоторная последовательность длиной 2165 п.н. содержит, по меньшей мере, 34 типа цис-регуляторные 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; поэтому было предсказано расположение TSS в положении –110 п.н.



**Таблица 2 – Цис-регуляторные элементы в последовательности промотора *ELIP***

Цис-регуляторный мотив	Последовательность (5'–3')	Положение	Описание	Количество копий в промоторе						
				–100	–200	–395	–684	–1065	–1369	–2165
ABRE	ACGTG	–1942, –1019, –230, –192	Вовлечен в ответ на абсцизовую кислоту	0	1	2	2	3	3	4
	AACCCGG	–1298		0	0	0	0	0	1	1
ARE	AAACCA	–1209	Обязательный элемент при индукции в анаэробных условиях	0	0	0	0	0	1	1
ARFAT	TGTCTC	–1901	Отвечает за реакцию на ауксины	0	0	0	0	0	0	1
BOXCPSAS1	CTCCCAC	–809	Вовлечен в негативную регуляцию светом	0	0	0	0	1	1	1
BOXIIITPA TPB	ATAGAA	–2045	Консервативный элемент для некоторых неконсенсусных промоторов II типа в пластидных генах	0	0	0	0	0	0	1

Продолжение Таблицы 2

ВОХПРСCH S	ACGTGGC	-191	Обязательный элемент при регуляции светом	0	1	1	1	1	1	1
CAAT-box	CAAT	-1952, -1886, -1824, -1808, -1769, -1683, -1634, -1337, -1325, -1314, -1233, -891, -864, -672, -637, -340, -332, -240, -73	Частый консенсусный элемент в энхансерах промоторов	1	1	3	6	8	12	19
	CAAAT	-1634, -1265, -1249, -1119, -1095, -962, -582, -437, -341		0	0	1	3	4	8	9
CACTFTPPC A1	YACT	-2108, -2098, -2073, -2030, -2001, -1996, -1876, -1760, -1716, -1499, -1460, -1429, -1366, -1334, -1311, -1213, -921, -856, -801, -765, -729, -723, -553, -522, -345, -257, -143, -70, -64	Ключевой компонент для генов, экспрессирующихся в мезофилле	2	2	5	7	13	17	29
CARGCW8G AT	CWWWWWWW WG	-2095, -1515	Сайт связывания для генов MADS бокса	0	0	0	0	0	0	1
CCA1ATLH CB1	AAMAATCT	-1770	Сайт связывания с транскрипционным фактором, относящийся к MYB-семейству, вовлечен в регуляцию фитохромов	0	0	0	0	0	0	1

Продолжение Таблицы 2

CIACADIAN LELHC	CAANNNNATC	-1242, -368	Вовлечен в циркадианный контроль	0	0	1	1	1	2	2
CPBCSPOR	TATTAG	-455	Критическая последовательность для связывания цитокинин-усиливающих белков	0	0	0	1	1	1	1
ERE	ATTTTAAA	-705	Вовлечен в регуляцию этиленом	0	0	0	0	0	1	1
	AWTTCAAA	-1123, -890		0	0	0	0	1	2	2
G-box	CACGAC	-1909	Вовлечен в ответ на свет	0	0	0	0	0	0	1
	TACGTG	-1943, -1020, -193		0	1	1	1	2	2	2
GAREAT	TAACAAR	-2056, -1244	Вовлечен в ответ на гиббереловую кислоту	0	0	0	0	0	1	2
GATABOX	GATA	-2046, -1132, -1021, -617, -524	Отвечает за высокий уровень экспрессии, тканеспецифичной экспрессии и ответ на свет	0	0	0	1	3	4	5
GT1CONSE NSUS	GRWAAW	-1988, -1774, -617, -7	Консенсусный сайт связывания во многих генов, регулируемых светом	1	1	1	2	2	2	4
IBOXCORE	GATAA	-1132, -617	Консервативная последовательность для генов, регулируемых светом	0	0	0	1	1	2	2

Продолжение Таблицы 2

INRNTPSAD B	YTCANTYY	-679, -554	Отвечает за светоиндуцированную транскрипцию	0	0	0	2	2	2	2
MYB	TAACCA	-1053	Сайт связывания с транскрипционным фактором MYB	0	0	0	0	1	1	1
MYBGANV	TAACAAA	-2056, -1244	Центральный элемент комплекса, отвечающего за ответ на гибберрелины	0	0	0	0	0	1	2
MYBPLANT	MACCWAMC	-1846	Сайт связывания с транскрипционным фактором MYB; консенсусная последовательность для промоторов генов, относящихся к биосинтезу финилпропаноидов	0	0	0	0	0	0	1
NTBBF1AR ROLB	ACTTTA	-1999, -904	Вовлечен в индукцию ауксинами и тканеспецифическую экспрессию	0	0	0	0	1	1	2
P-box	CCTTTTG	-937	Вовлечен в ответ на гибберрелины	0	0	0	0	1	1	1
SORLIP1AT	GCCAC	-271	Одна из очень часто встречающихся последовательностей в активируемых светом генах	0	0	1	1	1	1	1
SORLIP2AT	GGGCC	-431		0	0	0	1	1	1	1

Продолжение Таблицы 2

TATA-box	TATAAAT	-140	Коровый элемент, располагается часто в позиции -30 от сайта инициации транскрипции	0	1	1	1	1	1	1
TATCCACH VAL21	TATCCAC	-176	Компонент некоторых элементов необходимых для полного ответа на гиббереловую кислоту	0	1	1	1	1	1	1
TBOXATGA PB	ACTTTG	-123	Вовлечен в транскрипцию активируемых светом генов	0	1	1	1	1	1	1
TC-rich repeats	ATTCTCTAAC	-930	Вовлечен в защитные реакции, а также в ответ на стресс	0	0	0	0	1	1	1
TCCC-motif	TCTCCCT	-159	Компонент элемента, ответственного за экспрессию в ответ на свет	0	1	1	1	1	1	1
TCT-motif	TCTTAC	-2004, -1821	Компонент элемента, ответственного за экспрессию в ответ на свет	0	0	0	0	0	0	2
TGACG-motif	TGACG	-1453	Вовлечен в ответ на метилжасмонат	0	0	0	0	0	0	1
- 10PEHVPSB D	TATTCT	-506	Вовлечен в экспрессию светоактивируемых генов	0	0	0	1	1	1	1

Были идентифицированы многочисленные элементы, отвечающие за реакцию на свет: BOXIPCCHS, G-box, GATABOX, GT1CONSENSUS, IBOXCORE, INRNTPSADB, SORLIP1AT, SORLIP2AT, TBOXATGAPB, TCCC-мотив, TCT-мотив и -10PEHVPSBD. Среди них BOXCPSAS1 участвует в негативной регуляции светом. Другой цис-элемент, CIACADIANLELHC, отвечает за циркадианный контроль. Кроме того, были идентифицированы девять типов элементов, участвующих в ответе на фитогормоны: ABRE, ARFAT, CPBCSPOR, GAREAT, MYBGANV, NTBBF1ARROLB, P-box, TATCCACHVAL21 и TGACG-мотив; два типа сайтов связывания с MYB-факторами: MYBMYBPLANT и MYB; один тип CARGCW8GAT; сайт связывания MADS-box гена; и один элемент, богатый повторами TC, участвующий в защитной реакции или реакции на стресс. Кроме того, мы идентифицировали один ключевой компонент гена экспрессии мезофилла, элемент CACTFTPPCA1, встречающийся 29 раз, и элемент ERE, вовлеченный в регуляцию этиленом, который присутствует в трех положениях. Наличие этих элементов позволяет предположить, что регуляция гена *ELIP* в растении томата является сложной и зависит от различных сигналов. Для функционального анализа промотора гена *ELIP* было сконструировано семь делеционных вариантов в соответствии с расположением и плотностью цис-элементов в последовательности ДНК (Рисунок 1).

Для поиска гомологичных областей в последовательности промотора *ELIP* мы использовали следующие «классические» плодоспецифичные промоторы томата: *PG* (GenBank № FJ465170), *LeACO1* (X58273), *E8* (KJ561284) и *2A11* (M87659). В результате анализа было обнаружено большое количество не включенных в базы данных общих потенциальных цис-элементов протяженностью от 7 до 13 п.н. (Таблица 3). Промотор *ELIP* содержит 11 общих мотивов, также обнаруженных в промоторах *2A11*, *PG* и *E8*, и только четыре также обнаружены в промоторе гена *LeACO1*. Нуклеотидная последовательность полноразмерного промотора *ELIP*, клонированного в настоящем исследовании, была депонирована в NCBI (GenBank № MK867692).

**Таблица 3** – Общие гомологичные элементы, обнаруженные в промоторе ELIP и в других плодоспецифичных промоторах

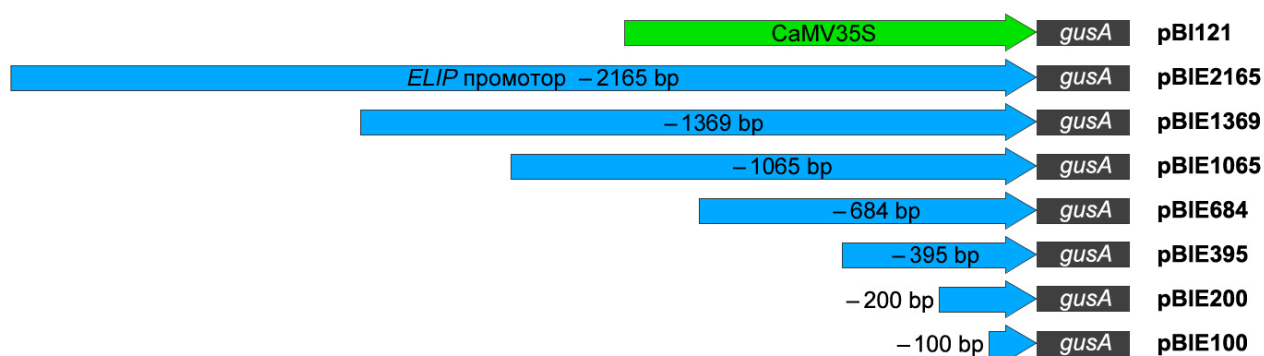
Последовательность	Ген	Положение относительно старт-кодона (п.н.)
AAATTAGTA	<i>ELIP</i>	-1094 до -1086
AAATTAGTA	<i>2A11</i>	-144 до -136
AAATTATTA	<i>PG</i>	-2381 до -2373
AAATTATTA	<i>PG</i>	-1200 до -1192
AAATTATTA	<i>2A11</i>	-3598 до -3590
AAATTATTA	<i>2A11</i>	-3084 до -3076
AATTGAAT	<i>ELIP</i>	-1220 до -1213
AATTGAAT	<i>ELIP</i>	-201 до -194
AATTGAAT	<i>PG</i>	-1563 до -1556
AATTGAAT	<i>2A11</i>	-424 до -417
AATTGAAT	<i>2A11</i>	-2931 до -2924
GTA-AGAA	<i>ELIP</i>	-1839 до -1833
GTA-AGAA	<i>E8</i>	-1181 до -1175
GTA-AGAA	<i>PG</i>	-2221 до -2216
GTATAGAA	<i>PG</i>	-4048 до -4041
GAATTTAA	<i>ELIP</i>	-411 до -404
GAATTTAA	<i>PG</i>	-593 до -586
GAATTTAA	<i>LeACO1</i>	-1889 до -1882
GAATTTAA	<i>E8</i>	-1177 до -1170
AAGTCTT	<i>ELIP</i>	-2151 до -2145
AAGTCTT	<i>PG</i>	-4760 до -4754
AAGTCTT	<i>PG</i>	-2992 до -2986
AAGTCTT	<i>E8</i>	-956 до -950
CGCATTTACAC	<i>ELIP</i>	-773 до -763
CGCGTTTACAC	<i>LeACO1</i>	-1429 до -1419
CGCGTTTACAC	<i>LeACO1</i>	-719 до -709
TAGTTTATATT	<i>ELIP</i>	-2121 до -2111
TATTTTATATT	<i>PG</i>	-4644 до -4634
TATTTTATATT	<i>2A11</i>	-4650 до -4640
TTTAATCSAA	<i>ELIP</i>	-1126 до -1117
TTTAATCSAA	<i>E8</i>	-2058 до -2049
TTTAATCSAA	<i>E8</i>	-994 до -985
TGATTTTA	<i>ELIP</i>	-1949 до -1941
TGATTTTA	<i>PG</i>	-4279 до -4272
TGATTTTA	<i>2A11</i>	-1712 до -1705

## Продолжение Таблицы 3

СТТТТАТА	<i>ELIP</i>	-1516 до -1509
СТТТТАТА	<i>2A11</i>	-3342 до -3335
СТТТТАТА	<i>2A11</i>	-3043 до -3036
TGACAGT	<i>ELIP</i>	-1407 до -1401
TGACAGT	<i>2A11</i>	-1277 до -1271
TGACAGT	<i>LeACO1</i>	-1277 до -1271
АСТАТАААТСССС	<i>ELIP</i>	-142 до -130
АСТАТАААТАССС	<i>LeACO1</i>	-128 до -116
АТАТАСТАСАТ	<i>ELIP</i>	-2076 до -2066
АТАТАСТАСАТ	<i>2A11</i>	-4441 до -4431
TCCCTTCATTA	<i>ELIP</i>	-360 до -350
TCCCTTCTTTA	<i>PG</i>	-427 до -417
AG-AAAATTAC	<i>ELIP</i>	-1990 до -1981
AGAAAAATTAC	<i>PG</i>	-4466 до -4456
АТСААТААСА	<i>ELIP</i>	-1235 до -1226
АТСААТААСА	<i>2A11</i>	-2734 до -2726
AAAAGTGTTT	<i>ELIP</i>	-1536 до -1527
AAAATTGTTT	<i>2A11</i>	-744 до -735
АТАТААГТАА	<i>ELIP</i>	-631 до -622
АТАТТАГТАА	<i>E8</i>	-611 до -602
ТТТАТТАГГА	<i>ELIP</i>	-458 до -449
ТТТТТАГГА	<i>E8</i>	-444 до -435
АТТТАГГАГТ	<i>ELIP</i>	-1699 до -1690
АТТГАГГАГТ	<i>E8</i>	-1525 до -1516
ТСТАСТАГГ	<i>ELIP</i>	-1368 до -1360
ТСТАСТАГГ	<i>E8</i>	-1346 до -1338
СТТАТТТАС	<i>ELIP</i>	-735 до -727
СТТАТТТАС	<i>2A11</i>	-1603 до -1595
СТСТСТТАГ	<i>ELIP</i>	-154 до -146
СТСТСТТАГ	<i>E8</i>	-133 до -125
ТТТТСААТС	<i>ELIP</i>	-1890 до -1882
ТТТТАААТС	<i>E8</i>	-1712 до -1704
ТСААААСТА	<i>ELIP</i>	-1258 до -1250
ТСАААААТА	<i>E8</i>	-1089 до -1081
СТАТСССАС	<i>ELIP</i>	-1753 до -1745
СТААСССАС	<i>PG</i>	-3915 до -3907
ТТТССТААА	<i>ELIP</i>	-1496 до -1488
ТТТСТТААА	<i>PG</i>	-3288 до -3280
АСАСААСА	<i>ELIP</i>	-1724 до -1717
АСАСААСА	<i>2A11</i>	-3788 до -3780

Примечание: участки с неполным соответствием выделены жирным шрифтом

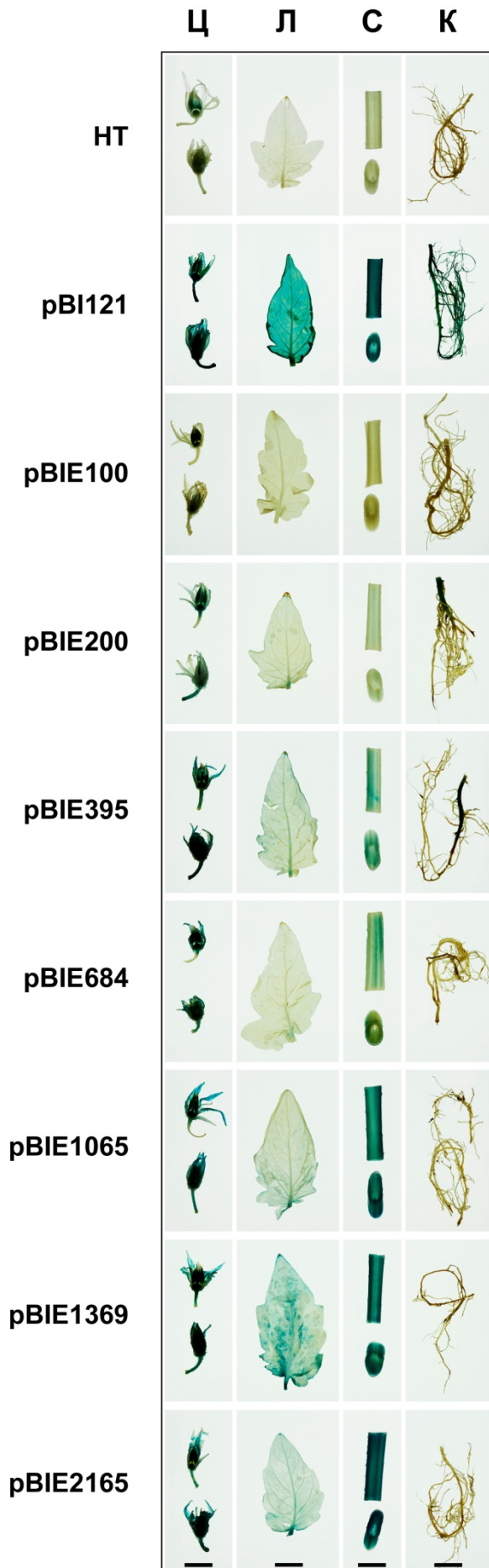




**Рисунок 1** – Схематическое изображение промотора *ELIP* и его делеционных вариантов, слитых с репортерным геном *gusA*. Вектор pBI121, содержащий промотор CaMV35S, использовали для контроля и сравнения силы промотора. Цифры слева указывают на положение 5'-укорочений. Справа приведены названия соответствующих векторов.

### 3.1.2. Гистохимический анализ активности GUS в различных органах томата

Фрагменты промотора *ELIP* были слиты с репортерным геном *gusA* и использованы для агробактериальной генетической трансформации томата. Вектор pBI121 с геном *gusA* под контролем CaMV35S использовали в качестве положительного контроля. Для определения гистохимической локализации продукта репортерного гена под контролем вариантов промотора *ELIP* были проанализированы следующие органы: лист, стебель, цветок, а также фрагменты корня. После инкубации в окрашивающем буфере в течение 12 часов хлорофилл удалили и ткани фотографировали. Окрашенные репрезентативные линии растений для каждого фрагмента промотора показаны на Рисунке 2. GUS-подобную эндогенную активность всегда наблюдали в пыльниках у нетрансгенных растений, но не в других анализируемых тканях так же, как и у растений, экспрессирующих pBIE100. Как и ожидалось, сильная экспрессия *gusA* была обнаружена во всех тестируемых тканях трансгенных растений, несущих конститутивный промотор CaMV35S.



**Рисунок 2** – Гистохимический анализ GUS-активности в различных тканях трансгенных растений томатов. Анализировали следующие ткани: цветок (Ц), лист (Л), стебель (С) и фрагменты корня (К). В качестве положительного контроля использовали трансгенные линии, несущие репортерный ген под контролем CaMV35S промотора (pBI121), а в качестве отрицательного контроля нетрансформированные томаты (НТ). Название вектора слева указывает на соответствующую версию промотора *ELIP*, с использованием которой получено трансгенное растение. Представлены изображения репрезентативных трансгенных линий томата. Масштабные линейки – 1 см.

Растения, трансформированные рВIE200, проявляли заметную активность GUS в цветах; при этом окрашивание было очень слабым в других тканях. Значительное увеличение активности GUS наблюдалось в линии, экспрессирующей рВIE395; окрашивание было слабым в листьях и стеблях, но достаточно интенсивным в цветах. Интересно, что с увеличением длины промотора до 680 п.н. активность репортерного гена в листьях снижалась до почти неопределяемого уровня. Максимальная активность гена в листьях (в серии ELIP::GUS) наблюдалась у растений, трансформированных рВIE1369. Однако эта активность была заметно слабее, чем у растений с 35S промотором. У растений, несущих конструкции с формами *ELIP* –2165 п.н., –1369 п.н. и –1065 п.н., выявлено сходное (интенсивное) окрашивание стеблей и цветов. Экспрессия *gusA* не наблюдалась в корнях трансгенных растений томата, трансформированных этими тремя версиями. Относительные уровни экспрессии репортерного гена в тестируемых органах приведены в Таблице 4.

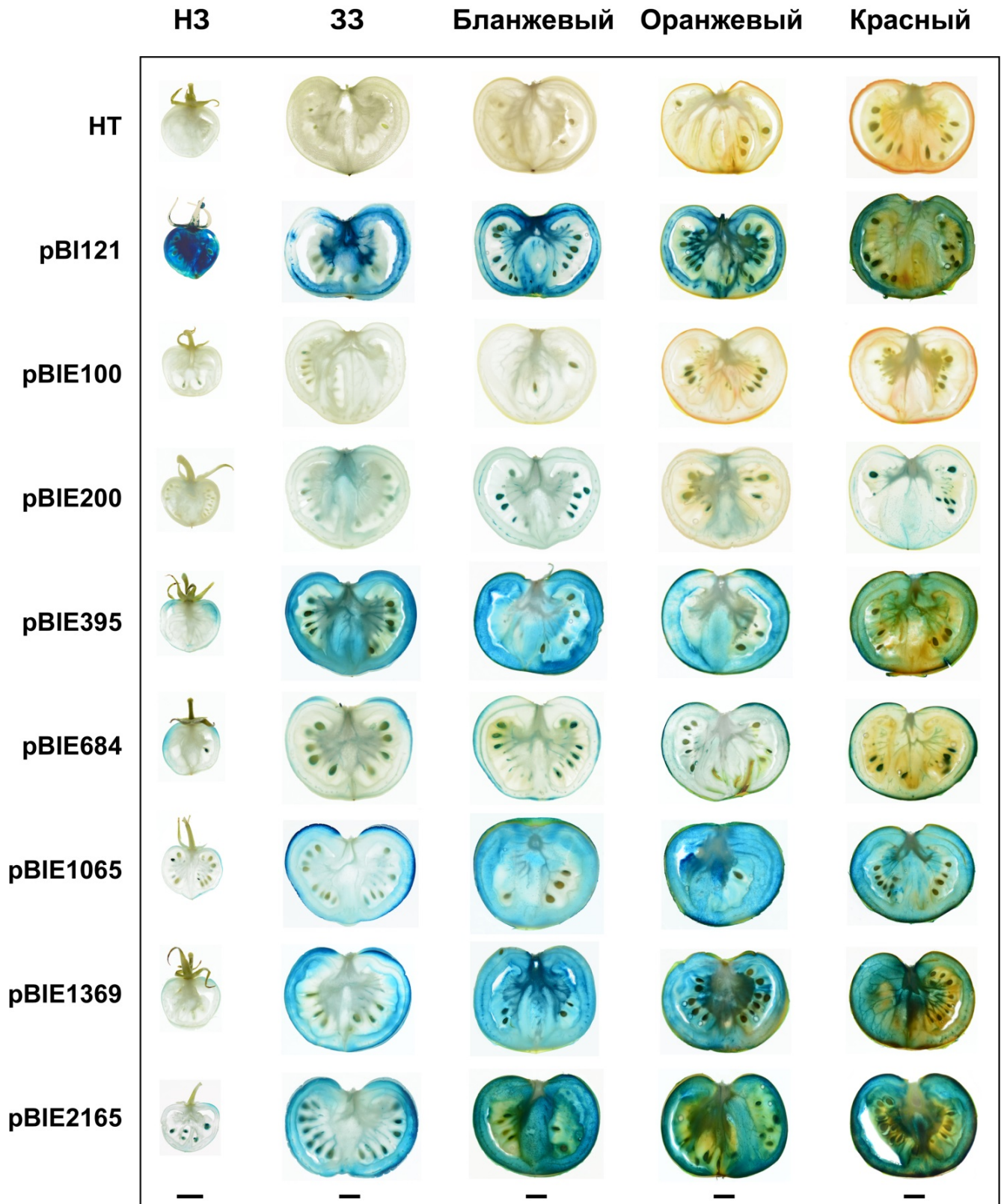
**Таблица 4** – Относительная экспрессия *gusA*, определенная гистохимически, в различных растительных тканях

Промотор	Цветок	Лист	Стебель	Корень
Отсутствует	±*	–	–	–
CaMV35S	++++	++++	++++	++++
ELIP–100	±	–	–	–
ELIP–200	++	+	+	+
ELIP–395	++++	++	++	+
ELIP–684	++	+	++	–
ELIP–1065	++	++	+++	–
ELIP–1369	+++	+++	+++	–
ELIP–2165	+++	++	+++	–

Примечание: \* слабое синее окрашивание, связанное с эндогенной GUS-подобной активностью

### 3.1.3. Гистохимический анализ активности GUS в плодах томата

Для оценки активности полноразмерного промотора *ELIP* и 5'-делеционных вариантов проводили гистохимическое окрашивание на активность GUS в тканях плодов томата на разных стадиях созревания (Рисунок 3). Синее окрашивание никогда не наблюдалась в мягких тканях плодов нетрансформированных растений томата. В редких случаях наблюдалось слабое окрашивание семян, что свидетельствует об эндогенной GUS-подобной активности. Высокая активность GUS наблюдалась во всех тканях на всех стадиях созревания плодов у растений, трансформированных плазмидой pBI121, за исключением локулярной ткани. Наиболее интенсивное окрашивание выявлено в проводящих тканях и сосудистых пучках. Активности GUS не наблюдалось в плодах растений с самым коротким протестированным фрагментом промотора *ELIP*. Более длинная версия промотора (–200 п.н.) обеспечивала очень слабую экспрессию репортерного гена в плодах на всех стадиях созревания. У незрелых зеленых плодов активность GUS была почти недетектируемой. Удлинение промотора до –395 п.н. заметно повышало уровень экспрессии *gusA*. У незрелых плодов слабое окрашивание наблюдалось преимущественно в перикарпе, тогда как в зрелых стадиях от зеленого до зрелого красного наблюдалась сильная активность *gusA* в большинстве тканей плода. В плодах растений с промоторным вариантом –684 п.н. активность GUS резко снизилась, оставаясь в эпидермисе и экзокарпе плодов томата. Остальные формы промотора *ELIP* (–1065 п.н. и –1369 п.н.) и полноразмерная (–2165 п.н.) версия демонстрировали сходные паттерны экспрессии. А именно: очень слабая экспрессия была обнаружена в незрелых плодах, и очень высокий уровень экспрессии в плодах на других стадиях созревания. Кроме того, в зрелых зеленых плодах не было обнаружено или было обнаружено только очень легкое окрашивание колумеллы. Она усиливалась на бланжевой стадии и сохранялась при дальнейшем созревании плода. Линии растений, несущие конструкции с полноразмерным промотором, показали более высокую экспрессию *gusA* начиная с бланжевой стадии и далее, чем с другими вариантами промотора *ELIP*.



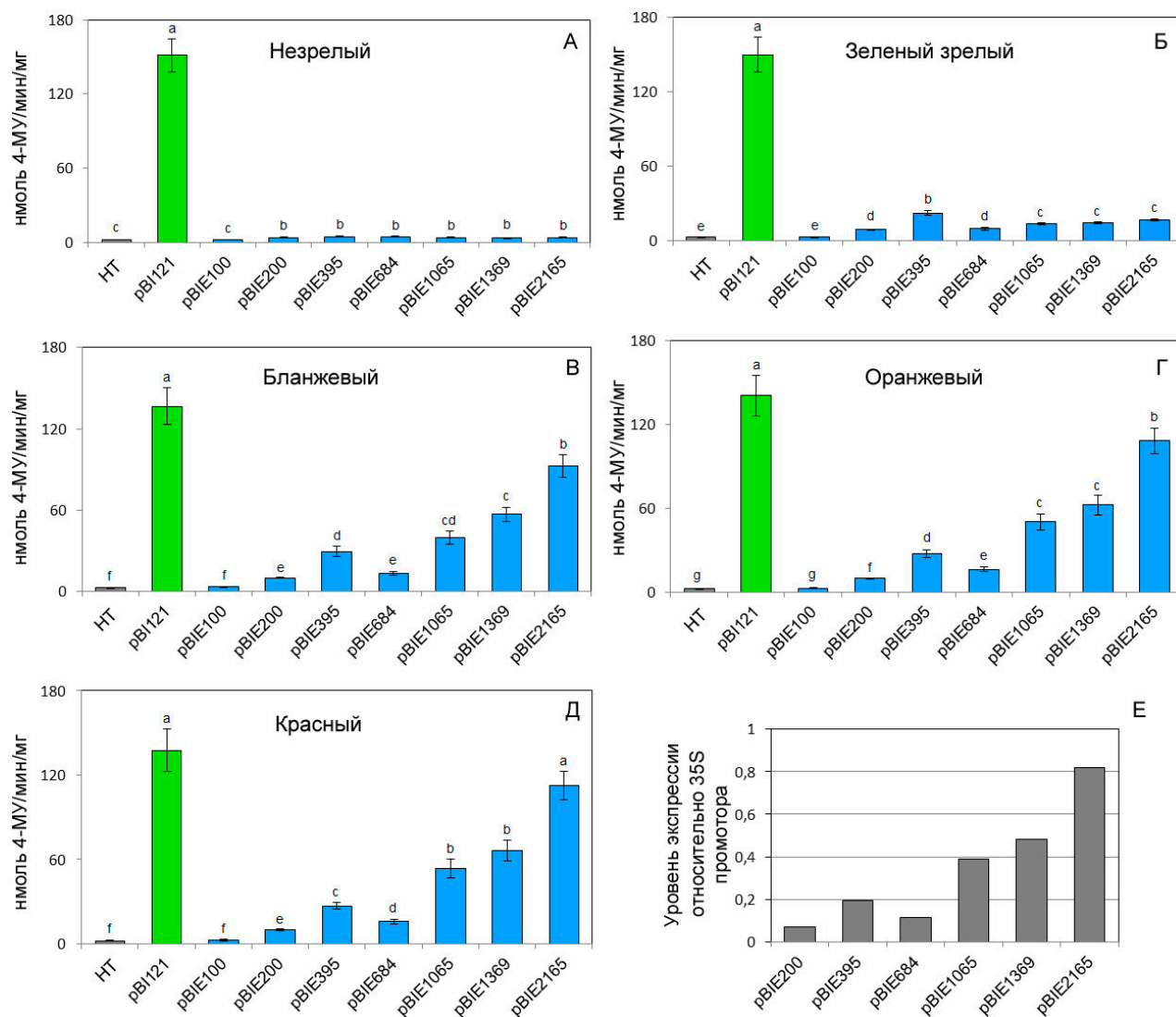
**Рисунок 3** – Гистохимический анализ активности GUS в трансгенных плодах томата в процессе созревания. Анализировали плоды на следующих стадиях созревания: зеленая незрелая (НЗ), зеленая зрелая (ЗЗ), бланжевая, оранжевая и красная стадии созревания. pBI121 – положительный контроль, плоды

трансгенных растений с геном *gusA*, под контролем CaMV35S промотора; НТ – отрицательный контроль, плоды нетрансформированных растений томата. Название вектора слева указывает на соответствующий делеционный вариант промотора *ELIP*, с использованием которого получено трансгенное растение. Представлены изображения репрезентативных трансгенных томатных линий. Масштабные линейки – 1 см.

Интересно, что в большинстве плодов трансгенных растений с различными формами промотора *ELIP*, за исключением промоторов –100 п.н. и –200 п.н., экспрессия репортерного гена была в целом выше во внешнем перикарпе и кожице, чем в других тканях. В то же время промотор CaMV35S не стимулировал высокую экспрессию *gusA* в эпидермисе плодов томата.

### **3.1.4. Количественный анализ активности GUS в плодах томата**

Чтобы определить силу полноразмерных и 5'-укороченных вариантов промотора *ELIP* был проведен количественный анализ активности GUS (Рисунок 4). Для этого собирали и анализировали плоды томата на пяти стадиях созревания. В плодах нетрансформированных растений дикого типа и линий, трансформированных pBIE100, базальный уровень активности GUS был обозначен как «отсутствие экспрессии». Экспрессия гена *gusA* под контролем промотора 35S была высокой и относительно неизменной независимо от стадии созревания плодов. Во всех плодах томата, трансформированных промоторными конструкциями *ELIP*, за исключением версии –100 п.н., продемонстрирована достоверно различимую активность GUS. Самая слабая активность GUS на одинаковом уровне была обнаружена в незрелых зеленых плодах. Начиная со стадии зеленой зрелости, в растениях, трансформированных pBIE200, не было отмечено увеличения активности репортерного гена при созревании. В этих растениях активность гена *gusA* оставалась на одном и том же уровне. Удлинение промотора *ELIP* с 200 до 395 п.н. приводило к 2-кратному увеличению активности GUS в зрелых зеленых, оранжевых и красных плодах.



**Рисунок 4** – Количественный флюориметрический анализ экспрессии *gusA* в плодах трансгенных растений томата. Активность GUS определяли в плодах на стадиях зеленая незрелая (А), зрелая зеленая (Б), бланжевая (В), оранжевая (Г) и красная (Д), (как описано в главе «Материалы и методы»). НТ – нетрансформированные растения (отрицательный контроль); pBI121 – положительный контроль и референс для определения силы делеционных вариантов промотора *ELIP*, растения с геном *GUS* под контролем конститутивного 35S промотора; серии pBIE – растения с геном *GUS* под контролем различных вариантов промотора *ELIP*. Е – сила различных вариантов промотора *ELIP* относительно CaMV35S в плодах на стадии красной спелости. Количественное определение активности GUS для каждой промоторной конструкции повторяли трижды. Значения представляют собой среднее  $\pm$  стандартное отклонение от пяти независимых трансгенных линий на конструкцию. Различные буквы над столбцами обозначают значимые различия при  $p < 0,05$ .

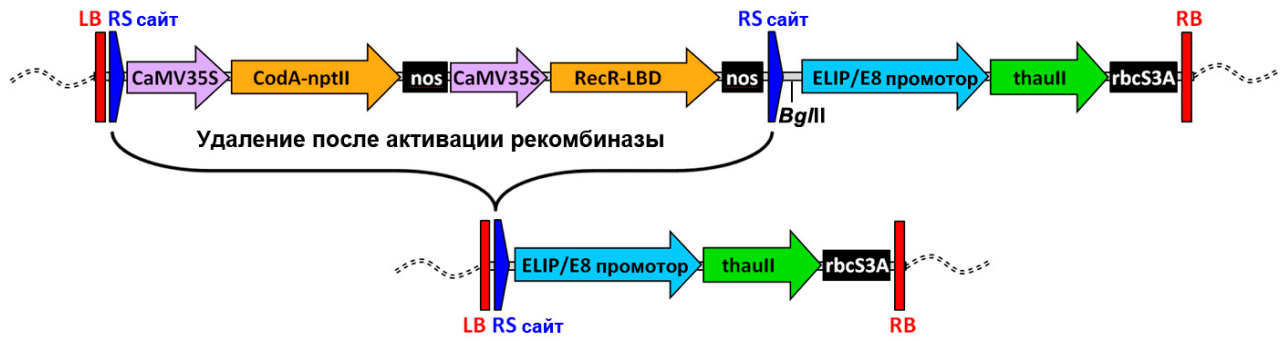
Любопытно, что активность GUS снижалась примерно в 1,5 раза при дальнейшем увеличении длины промотора с –395 до –684 п.н. Последующее удлинение промотора уже значительно увеличивало активность репортерного гена в трансгенных растениях. При этом протяженные формы промотора *ELIP* показали сходную картину активности. При созревании плодов, начиная со зрелой зеленой стадии, экспрессия гена *gusA* увеличивалась, достигая максимума на красной стадии. Кроме того, удлинение 5'-области от –1065 п.н. до –1369 п.н. приводило к дальнейшему увеличению активности GUS более чем на 20%, в то время как полная версия промотора обеспечивала увеличение экспрессии репортерного гена в 2 раза. Наибольшая активность GUS среди растений, несущих различные варианты промотора *ELIP*, наблюдалась в плодах красной спелости в растениях с pBIE2165. Уровень экспрессии *gusA* в них при этом незначительно (недостаточно) ниже, чем для 35S промотора.

## **3.2. Создание безмаркерных растений томата**

### **3.2.1. Конструирование бинарного вектора**

Для получения безмаркерных трансгенных растений томата мы использовали вектор pMF (WPR), содержащий ген рекомбиназы R из дрожжей *Z. rouxii*, слитый с лигандсвязывающим доменом глюкокортикоидного рецептора и бифункциональный селективный ген *CodA-nptII*. Система позволяет вести отбор растений путем негативной селекции на 5-ФЦ после удаления нежелательного участка ДНК из генома. Мы использовали ген белка тауматина II из тропического растения *Thaumatococcus daniellii*, клонированный Edens с соавторами (Edens et al., 1982) в качестве смыслового гена под контролем промоторов *ELIP* и *E8* томата и терминатора гена *rbcS* томата. Белок тауматин обладает суперсладким вкусом и проявляет противогрибковую активность, поэтому экспрессия гена позволяет улучшить вкусовые качества плодов и повысить устойчивость к фитопатогенам. Созданные векторы были названы pMF-ELI и pMF-E8. Схема бинарных векторов и принцип работы системы приведены на Рисунке 5.





**Рисунок 5** – Схематическое изображение области Т-ДНК векторов рMF-E8 и рMF-ELI до и после удаления последовательностей ДНК, фланкированных сайтами рекомбинации (RS). LB, RB – левая и правая границы; CaMV35S – промотор вируса мозаики цветной капусты; CodA-nptII – трансляционно слитые гены цитозин-деаминазы и неомицинфосфотрансферазы II; nos – терминатор нопалинсинтазы; RecR-LBD – трансляционно слитые гены рекомбиназы R и лиганд-связывающего домена глюкокортикоидного рецептора; ELIP/E8 промотор – фрагмент промотора гена *ELIP* или *E8*; thauII – кодирующая область гена тауматина II; rbcS – терминатор гена рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы; *Bgl*III – положение сайта рестрикции, по которому была расщеплена ДНК для анализа методом Саузерн-блоттинга.

### 3.2.2. Получение безмаркерных линий с применением стратегии быстрой селекции

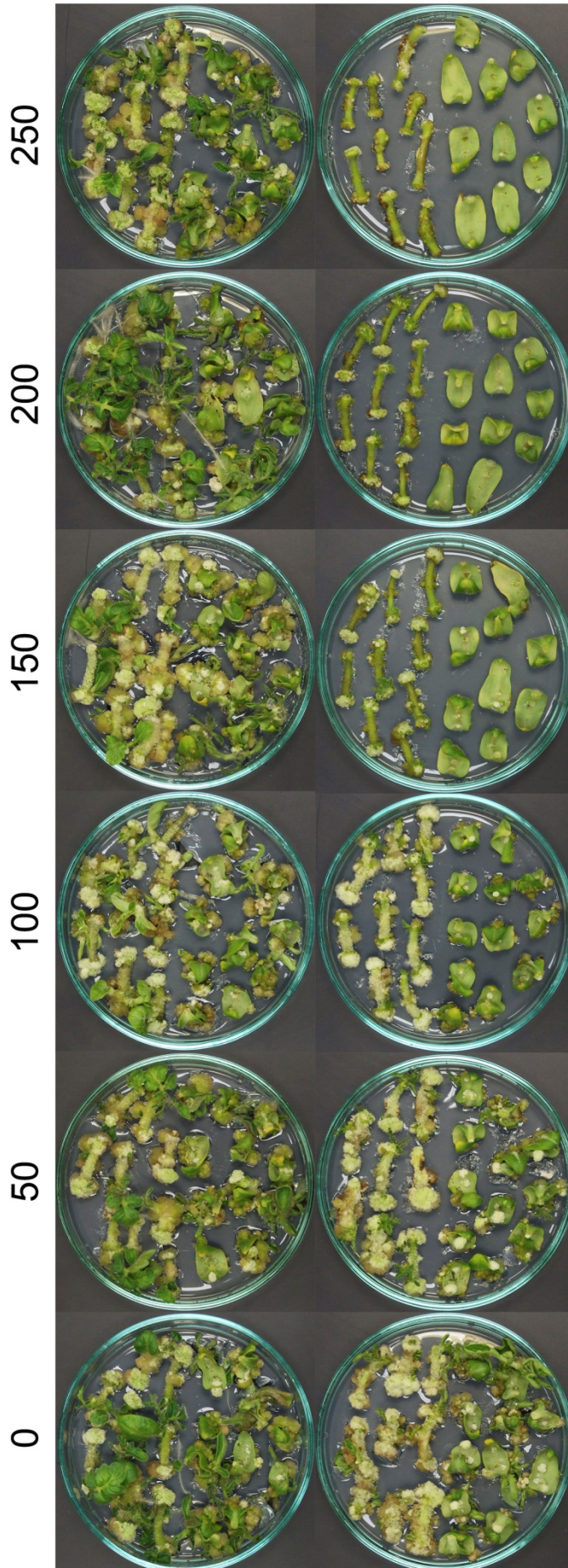
После проведения агробактериальной трансформации использовали две стратегии отбора безмаркерных трансгенных растений томата. При ранней селекции с использованием векторов рMF-ELI и рMF-E8, в общей сложности 65 и 90 зеленых и плотных устойчивых к канамицину каллусов было получено, соответственно (Таблица 5). Каллусы переносили на среду с добавлением дексаметазона для индукции рекомбиназной активности и затем помещали в среду для регенерации с 250 мг/л 5-ФЦ. Эта концентрация полностью ингибировала регенерацию гипокотилей и семядолей трансгенных растений (Рисунок 6). В то же время эта концентрация не оказывала отрицательного

влияния на регенерацию нетрансгенных тканей, которая оставалась на уровне 100% для обоих типов эксплантов. Из 155 каллусов только 40 дали побеги, которые преодолели селективный отбор на 5-ФЦ. 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 pMF-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 pMF-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.

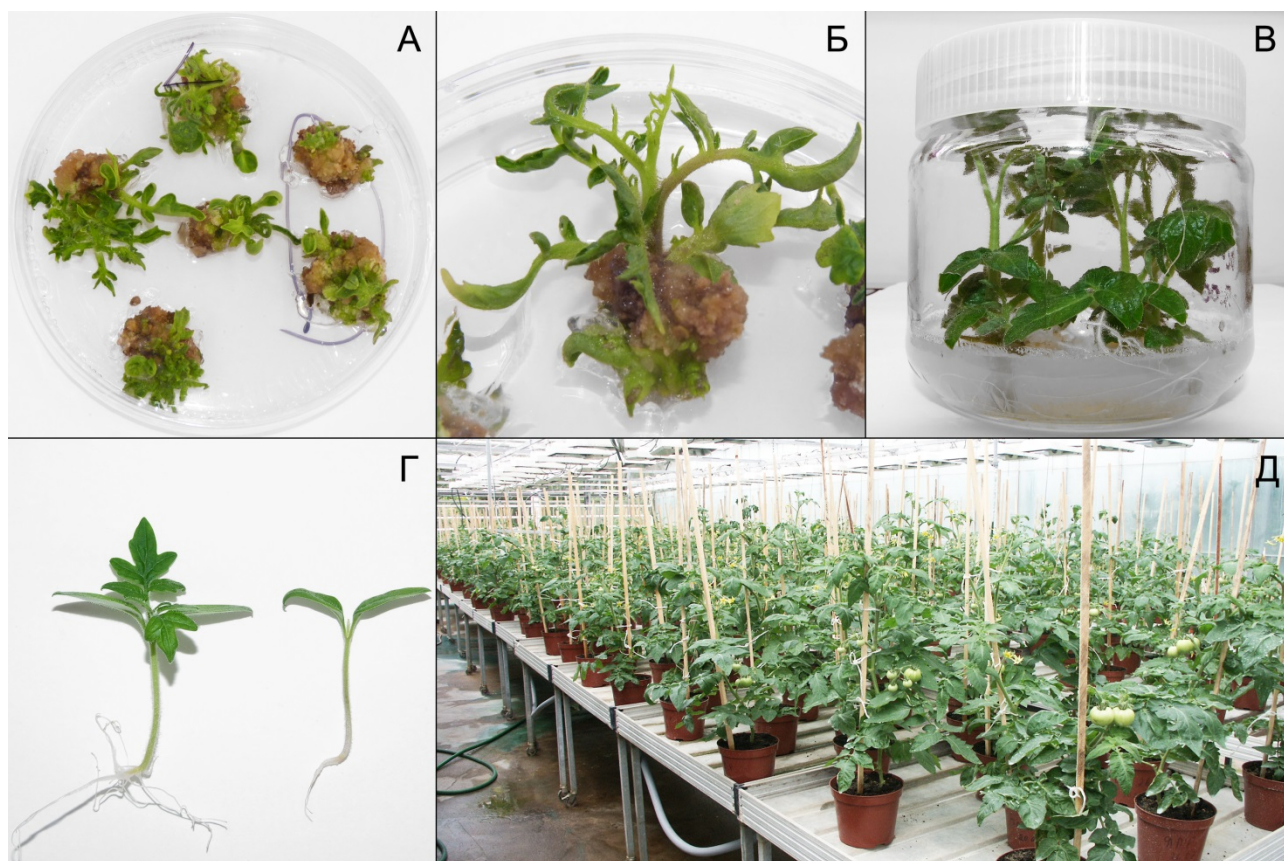
**Таблица 5** – Результаты экспериментов *in vitro* по получению безмаркерных трансгенных растений томата путем быстрой селекции

Вектор	Взято эксплантов для трансфор- мации	Количество каллусов					Количество сублиний (побегов)			
		Устойчи- вых к канамицину	Давших побеги (всего)	Давших <i>nptII</i> побеги	Давших <i>nptII</i> <sup>+</sup> побеги	Давших побеги двух типов	Всего	Нетрансен- ных ( <i>nptII thau</i> <sup>-</sup> )	Трансен- ных ( <i>nptII</i> <sup>+</sup> <i>thau</i> <sup>+</sup> )	Безмаркер- ных ( <i>nptII</i> <sup>-</sup> <i>thau</i> <sup>+</sup> )
pMF-ELI	600	65	21	12	4	5	65	40	24	1
pMF-E8	600	90	19	15	3	1	51	43	8	0

## Трансгенное    Нетрансгенное



**Рисунок 6** – Определение эффективной концентрации 5-фторцитозина для селекции безмаркерных растений томата. Концентрации представлены в миллиграммах 5-ФЦ на литр агаризованной среды.



**Рисунок 7** – Получение безмаркерных растений томата. А – регенерация томатов на селективной среде, Б – 5-фторцитозин-устойчивый побег, В – укоренение растений томата, Г – сегрегация томатов в поколении T1, устойчивое к канамицину растение (слева) и чувствительное к канамицину растение (справа), Д – исходные трансгенные линии и безмаркерные растения томата в теплице.

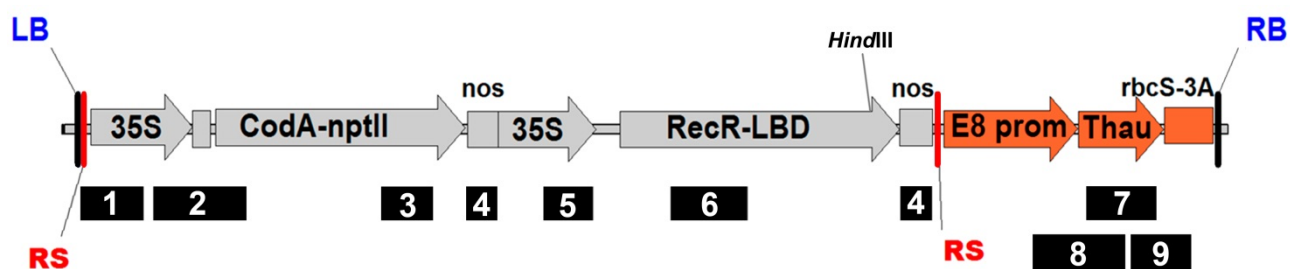
### 3.2.3. Получение стабильных трансгенных растений томата и ПЦР-анализ

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 (Таблица 6, Рисунок 7, А-В). В трансформации VI в качестве эксплантов использовали только гипокотили. Эффективность трансформации составила 18% и 27% для векторов pMF-E11 и pMF-E8 соответственно. В событии VIII использовали три типа эксплантов.

**Таблица 6 – Результаты трансформации томата**

Вектор	Трансформация	Тип экспланта	Количество эксплантов		ПЦР ( <i>nptII</i> ) позитивных		Эффективность трансформации, %	
			По типу	Всего	По типу	Всего	По типу	Всего
pMF1-E8	VI	гипокотиль	124	124	33	33	26,6	
pMF1-ELI	VI	гипокотиль	141	141	26	26	18,4	
pMF1-E8	VIII	гипокотиль	32	96	15	27	46,9	28,1
		семядольный лист	47		7		14,9	
		настоящий лист	17		5		29,4	
pMF1-ELI	VIII	гипокотиль	27	116	12	28	44,4	24,1
		семядольный лист	59		6		10,2	
		настоящий лист	30		10		33,3	

Средняя эффективность трансформации без учета типа эксплантата составила 24% и 28% для векторов рMF-ELI и рMF-E8, соответственно. Самую низкую эффективность (менее 20%) наблюдали при использовании семядолей, а самую высокую, которая превышала 40% в обоих случаях при использовании гипокотилей. Все полученные предположительно трансгенные линии были тщательно проанализированы с помощью ПЦР на наличие в их геномах полной последовательности Т-ДНК, включая RS-сайты (Рисунок 8, Таблица 7). Чуть менее половины из общего числа, 55 линий, содержали неполную область Т-ДНК. В этих растений отсутствовала последовательность сайта рекомбинации при левом бордере. Доля таких линий сильно варьировала между трансформациями – от 30% до 65%. Пятьдесят четыре линии (47,4%) содержали полную вставку Т-ДНК. Пять растений содержали только последовательность гена устойчивости к канамицину (*nptII*).



**Рисунок 8** – Схематическое изображение области Т-ДНК вектора рMF-E8 с положениями пар праймеров. RS – сайт рекомбинации; RB, LB – правый и левый границы (бордеры) Т-ДНК соответственно; 35S – промотор CaMV35S; CodA-nptII – трансляционный гибридный ген для позитивной (*nptII*) и негативной (*codA*) селекции; nos – терминатор гена нопалинсинтазы; Rec-LBD – трансляционное слияние рекомбиназы R и лиганд-связывающего домена глюкокортикоидного рецептора (LBD); E8 prom – промотор гена E8; Thau – кодирующая область гена тауматина II; rbcS3A – терминатор гена rbcS3A. Для интерпретации номеров наборов праймеров см. Таблицу 1. *HindIII* – положение сайта рестрикции, по которому расщепляли геномную ДНК для анализа методом Саузерн-блоттинга.

**Таблица 7 – Результаты анализа стабильных первичных трансформантов томата методом ПЦР**

Вектор	Трансформация	Всего трансгенных линий	<i>thau<sup>+</sup>nptII<sup>+</sup>RS<sup>+</sup></i>		<i>thau<sup>+</sup>nptII<sup>+</sup>RS<sup>-</sup></i>		<i>thau<sup>-</sup>nptII<sup>+</sup>RS<sup>-</sup></i>	
			Количество линий	%	Количество линий	%	Количество линий	%
pMF1-E8	VI	33	22	66,7	10	30,3	1	3,0
pMF1-ELI	VI	26	6	23,1	17	65,4	3	11,5
pMF1-E8	VIII	27	15	55,6	11	40,7	1	3,7
pMF1-ELI	VIII	28	11	39,3	17	60,7	0	0
Итого		114	54	-	55	-	5	-



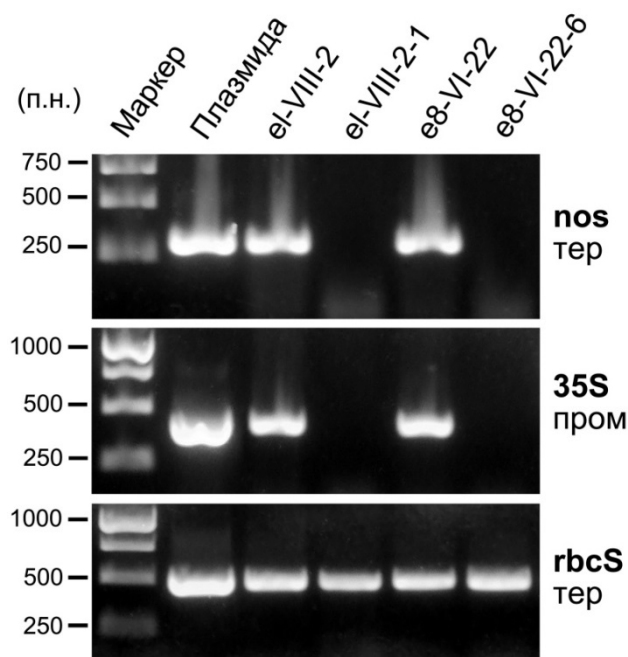
### 3.2.4. Активация рекомбиназы и получение безмаркерных растений

Из 54 линий, содержащих полную вставку T-ДНК, мы отобрали 24 линии без морфологических отклонений и довели их до плодоношения. Семена проращивали на среде с канамицином, а экспланты устойчивых побегов использовали для активации в них рекомбиназы. Двадцать линий продемонстрировали соотношение сегрегации 3:1 между нормальными устойчивыми и угнетенными сеянцами (Рисунок 7, Г), что указывает на однолокусную вставку. Три линии показали менделевское наследование, а одна, по-видимому, имела вставки в двух локусах (15:1) (данные не показаны). После индукции рекомбиназной активности в эксплантах гипокотилей и семядолей, 11 из них не продуцировали никаких регенерантов на среде с отрицательной селекцией (содержащей 5-ФЦ) (Таблица 8). 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 (будучи после отбора и размножения специально перенесены на среду с ним), ПЦР-анализ выявил присутствие последовательности гена *nptII* у 100 из них. Эти линии также были ПЦР-негативными по гену *recR*. Было получено только две потенциально безмаркерные линии трансгенных томатов – e1-VIII-2-1 и e8-VI-22-6.

Далее мы проверили предполагаемые безмаркерные линии на присутствие CaMV35S промотора и *nos* терминатора. В качестве подтверждения наличия целевой экспрессионной кассеты в полученных сублиниях также были использованы праймеры на терминатор гена Рубиско. Результаты анализа приведены на Рисунке 9. Последовательности регуляторных элементов селективных генов не были детектированы в отобранных сублиниях томата, тогда как они присутствуют в геномах исходных материнских линий.

**Таблица 8** – Результаты экспериментов *in vitro* по получению безмаркерных трансгенных растений томата методом отсроченной селекции

Вектор	Количество линий в экспериментах	Общее количество эксплантов	Количество линий, не давших устойчивых побегов	Количество линий, давших устойчивые побеги	Количество полученных и проанализированных сублиний	Количество неустойчивых к канамицину сублиний	Количество безмаркерных сублиний
pMF1-ELI	8	1311	5	3	11	9	0
pMF1-E8	16	2820	6	10	91	68	1

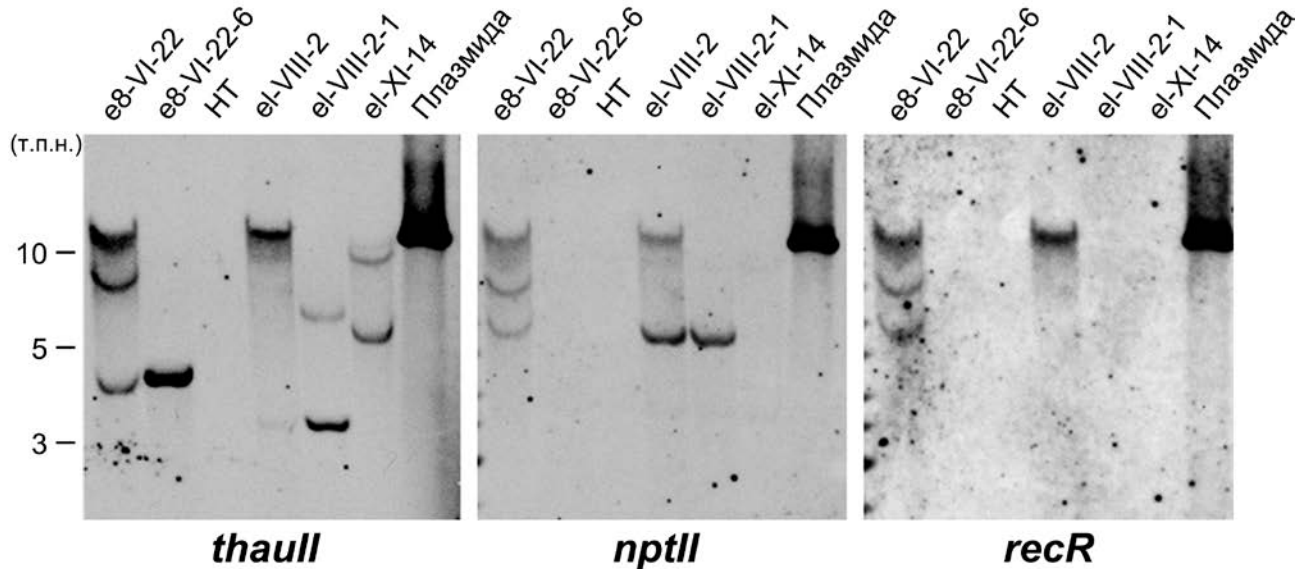


**Рисунок 9** – ПЦР-анализ на наличие генетических регуляторных элементов в первичных трансгенных растениях (el-VIII-2, e8-VI-22) и предполагаемых безмаркерных растениях (el-VIII-2-1, e8-VI-22-6). Маркер – маркер молекулярного веса; Плазмида – вектор pMF-ELI; nos тер – терминатор гена нопалинсинтазы; 35S пром – 35S промотор гена вируса мозаики цветной капусты; rbcS тер – терминатор гена рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы.

### 3.2.5. Молекулярно-биологический анализ трансгенных и безмаркерных линий томата

Для подтверждения удаления ДНК, фланкированной сайтами RS, провели Саузерн-блот-анализ. Для этого геномную ДНК родительских трансгенных линий и потенциально безмаркерных линий гибридизовали с зондами на последовательности генов *thauII*, *recR* и *nptII* (Рисунок 10). Три копии T-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. Паттерн наследования (3:1) гена *nptII* вкупе с этими данными, по-видимому, указывают на тандемное расположение вставок в исходной линии. К сожалению, последовательность гена *nptII* была обнаружена во второй отобранной линии el-

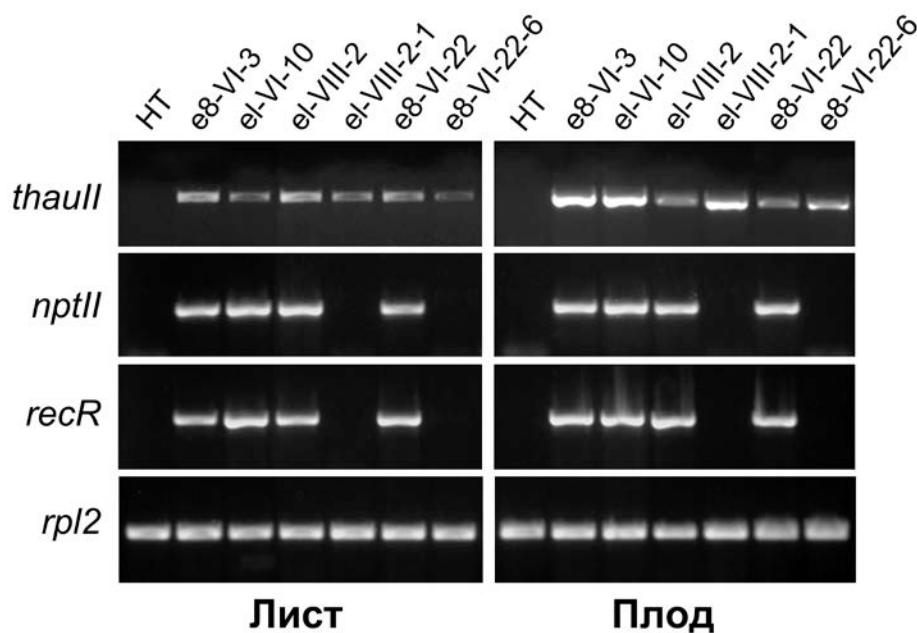
VIII-2-1. В то же время зонд для гена *recR* дал отрицательный результат. По-видимому, имеют место неполные множественные вставки Т-ДНК в линии eI-VIII-2. Только одна линия eI-XI-14, полученная с помощью быстрой селекции, была подтверждена как не содержащая маркеров. В ней было обнаружено две копии целевого гена тауматина II.



**Рисунок 10** – 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 – нетрансгенный контроль; Плазмида – вектор pMF-ELI.

Для подтверждения экспрессии гена тауматина II на уровне РНК была проведена ПЦР, сопряженная с обратной транскрипцией. Тотальную РНК из листьев молодых стерильных растений и из красных спелых плодов использовали в качестве матрицы для обратной транскрипции. В дополнение к целевому гену мы проанализировали экспрессию селективных генов неомоцинофосфотрансферазы (*nptII*) и рекомбиназы (*recR*) в родительских трансгенных растениях и некоторых отобранных сублиниях. В качестве подтверждения нормализации полученной кДНК был использован продукт гена «домашнего хозяйства» *rpl2*. Результаты анализа показаны на Рисунке 11. Экспрессия анализируемых генов из области Т-ДНК была обнаружена у всех первичных трансформантов. В двух сублиниях после нежелательного удаления

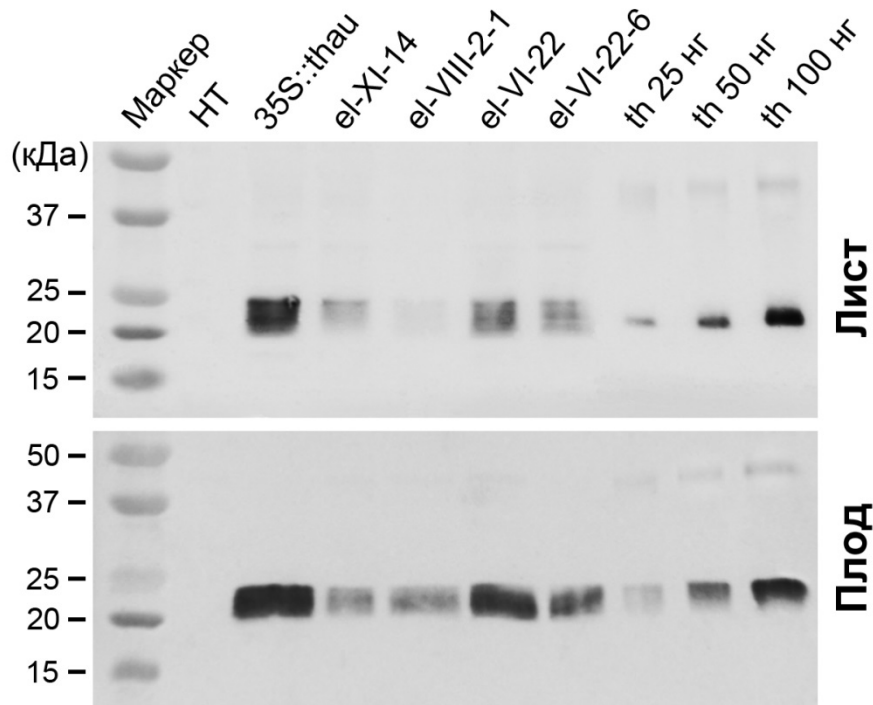
ДНК была обнаружена только мРНК гена тауматина II. В сублинии eI-VIII-2-1 мРНК гена *nptII*, (последовательность которого была ранее обнаружена методом Саузерн-блоттинга) отсутствовала. Этот результат, вместе с тем фактом, что растения потеряли способность расти на канамицине, показал, что в геноме сублинии eI-VIII-2-1 имеется нефункциональная, возможно неполная, копия гена *nptII*.



**Рисунок 11** – ОТ-ПЦР-анализ четырех генов в листьях и плодах растений томата. NT – нетрансгенное растение томата; eI-VIII-2-1 и e8-VI-22-6 – сублинии, полученные после активации рекомбиназы; другие числа, первичные трансгенные линии томатов.

С использованием метода вестерн-блоттинга мы также показали накопление целевого белка в некоторых трансгенных и не содержащих маркеров растениях томата (Рисунок 12). Были обнаружены полосы, размером около 22 кДа, соответствующих зрелому белку тауматину. Экспрессию гена тауматина II наблюдали как в зрелых плодах, так и в листьях анализируемых линий под контролем обоих промоторов *ELIP* и *E8*. Кроме того, в этом эксперименте в качестве положительного контроля использовали линию с высоким уровнем экспрессии, содержащую промотор *CaMV35S*. Несмотря на то, что это качественный метод, по интенсивности полос можно видеть, что в растениях с

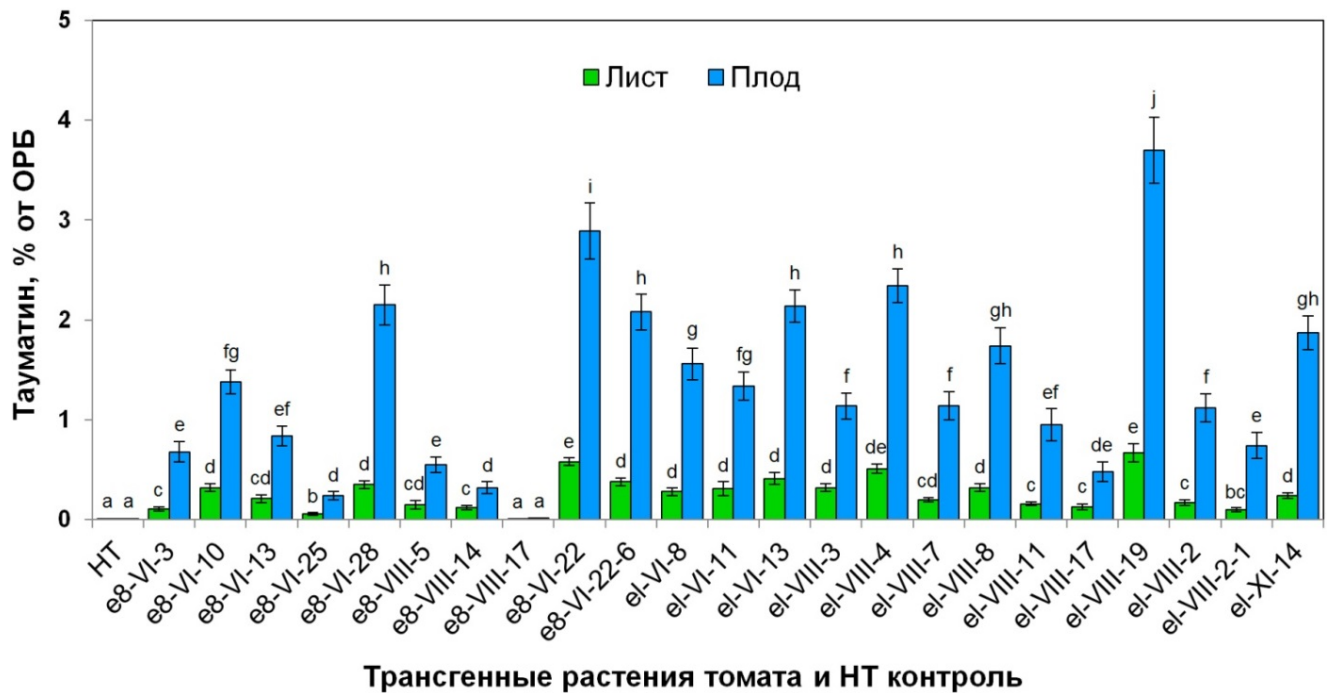
промоторами *ELIP* и *E8* белок накапливается в плодах в больших количествах, чем в листьях. В растениях с конститутивным промотором, как и ожидалось, количество белка было примерно одинаковым в обеих тканях.



**Рисунок 12** – Вестерн-блот анализ трансгенных растений томата. Маркер – маркер молекулярного веса; НТ – нетрансгенное растение томата; 35S::Thau – трансгенная линия томата с геном тауматина II, под контролем CaMV35S промотора; e8-VI-22-6 и eI-XI-14 – безмаркерные линии; e8-VI-22 – родительская трансгенная линия; eI-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 13). Для анализа использовали исходные трансгенные линии, отобранные для получения безмаркерных растений томата. Все линии показали накопление белка в листьях и плодах, за исключением одной линии и нетрансгенных растений. Количество 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 eI-VIII-19 и e8-VI-22,

соответственно. Интересно, что в двух линиях, отобранных после элиминации ДНК, уровень белка был достоверно ниже, чем в материнских линиях. Для безмаркерной сублинии e8-VI-22-6 количество белка уменьшилось с 2,9% до 2,1%, а для белка сублинии eI-VIII-2-1 снизилось с 1,12% до 0,75%. 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, использованных в экспериментах по получению растений без маркеров и ИФА, продемонстрировали четко выраженный сладкий вкус с лакричным послевкусием, типичным для тауматина II. Это косвенно указывает на правильный фолдинг тауматина в полученных растениях томата.



**Рисунок 13** – Иммуноферментный анализ тауматина II в растениях томата. НТ – нетрансгенный контроль; eI-XI-14 – линия, полученная способом быстрой селекции; eI-VIII-2-1 и e8-VI-22-6 – сублинии, полученные с использованием отсроченной селекции; другие числа – первичные трансгенные линии томатов. Статистический анализ был выполнен с использованием одностороннего дисперсионного анализа. Значения представляют собой среднее  $\pm$  стандартное отклонение от трех повторностей на трансгенную линию. Различные буквы над столбцами указывают на значимые различия при  $p < 0,05$ .

### 3.3. Создание безмаркерных растений яблони

#### 3.3.1. Конструирование бинарного вектора

Для получения безмаркерных трансгенных растений яблони мы использовали один из созданных на базе рМФ векторов, содержащий ген белка тауматина II под контролем плодоспецифичного промотора *E8* и терминатора гена *rbcS* томата (рМФ-Е8).

#### 3.3.2. Трансформация яблони и анализ переноса генов

Мы провели два эксперимента по получению трансгенных растений яблони, в которых было использовано 160 и 85 листовых эксплантов. Три линии устойчивых к канамицину (две и одна, соответственно) были получены в результате агробактериальной трансформации яблони с использованием вектора рМФ-Е8. Частота трансформации составила 1,2%. Эти растения были тщательно проанализированы с помощью ПЦР на наличие всех генов из области T-ДНК и на наличие обоих сайтов рекомбинации, что является необходимым условием для правильного удаления ДНК. Результаты анализа ПЦР приведены в Таблице 9.

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 T-ДНК, имело место только в линии 6.

**Таблица 9** – ПЦР-анализ первичных трансгенных растений яблони

Линия	RS-сайт	<i>codA</i>	<i>nptII</i>	<i>recR</i>	35S пром.	Тауматин (кодир.)	Тауматин-термин.
1	–	+	+	+	+	+	+
2	–	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+

#### 3.3.3. Селекция безмаркерных растений яблони

По сравнению с томатом частота трансформации яблони значительно ниже. Помимо этого, результаты экспериментов с тканями томата выявили, что невозможно получить гомогенный трансгенный каллус – в нем неизбежно



присутствуют немодифицированные клетки дикого типа. Поэтому для создания безмаркерных растений яблони было решено использовать стратегию отсроченного отбора. Она предполагает получение стабильных трансформантов и активацию рекомбиназной активности в их тканях.

Для экспериментов по получению безмаркерных линий путем индукции рекомбиназы и последующего культивирования эксплантов на среде с дексаметазоном были спроектированы несколько экспериментальных вариантов, они представлены в Таблице 10.

**Таблица 10** – Экспериментальные варианты получения безмаркерных растений яблони

Код	Название	Индукция, 10 мкМ дексаметазона	Селекция, 250 мг/л 5-ФЦ (немедленная)	Селекция, 250 мг/л 5-ФЦ (отложенная на 7 суток)	Описание назначения
0-0	Нет селекции	–	–	–	Базовая регенерация
0-2	Отсроченная селекция	+	–	+	Элиминация ДНК, основной эксперимент
250-0	Отсутствие индукции	–	+	+	Спонтанная элиминация ДНК
250-2	Немедленная селекция	+	+	+	Элиминация ДНК, основной эксперимент, влияние 5-ФЦ и дексаметазона на регенерацию

Методом ПЦР было показано, что полная последовательность Т-ДНК с сайтом рекомбинации у левой границы присутствует только в линии 6. Наличие обоих сайтов рекомбинации, фланкирующих селективные гены в области Т-ДНК, является обязательным условием для успешной элиминации ДНК. Тем не менее, мы произвольно выбрали одну из оставшихся линий (линия 1) для первого эксперимента в качестве отрицательного контроля, при этом линия 2 была исключена. Уже во втором эксперименте использовали только экспланты линии 6, а вариант 0-2 с отложенной селекцией был исключен.

Суммарно было использовано 1800 листовых эксплантов яблони. После регенерации было отобрано и размножено на селективной среде в присутствии 250 мг/л 5-ФЦ 45 побегов. В результате этих экспериментов было получено пять регенерантов из эксплантов линии 1 и 40 из эксплантов линии 6 (Таблица 11, Рисунок 20, А–В, ниже). Спонтанная рекомбинация и элиминация ДНК без обработки дексаметазона происходила в 14% случаев (от общего количества безмаркерных растений) – 4 сублинии были получены из эксплантов линии 6.

**Таблица 11** – Отбор предположительно безмаркерных регенерантов яблони

Собы- тие	Вари- ант	Лин ия	Количество эксплантов		Количество регенерантов		Эффективность регенерации, %		
			Исход- но <sup>1</sup>	Перед регенерацией <sup>2</sup>	Среза- но <sup>3</sup>	Укоренено <sup>4</sup>	Первич- ная <sup>5</sup>	Финаль- ная <sup>6</sup>	
I	0-2	1	127	101	8	1	7,9	1,0	
		6	226	198	35	11	17,7	5,6	
	250-0	1	159	159	2	0	1,3	0	
		6	161	161	32	2	19,9	1,2	
	250-2	1	155	152	27	4	17,8	2,6	
		6	180	162	48	13	29,6	8,0	
	0-0	НТ	159	104	78	-	75,0	-	
	250-2		142	119	66	-	55,5	-	
	II	250-0	6	253	53	12	2	22,6	3,8
		250-2		98	74	17	12	23,0	16,2
0-0		НТ	66	31	14	-	45,2	-	
250-2			75	37	10	-	27,0	-	
Общее количество полученных регенерантов						45			

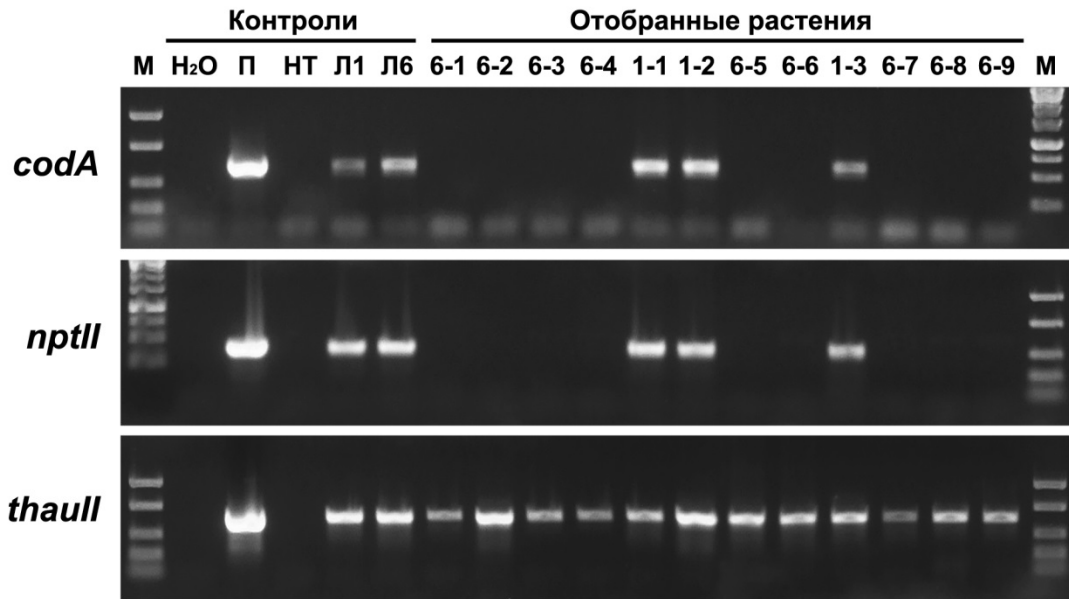
Примечание: <sup>1</sup> общее количество эксплантов, срезаемых для экспериментов; <sup>2</sup> оставшееся количество эксплантов после 2 пассажей; <sup>3</sup> количество побегов, отделенных от экспланта для укоренения; <sup>4</sup> число укорененных побегов; <sup>5</sup> отношение срезаемых побегов к общему количеству эксплантов перед регенерацией; <sup>6</sup> отношение укорененных побегов к общему количеству эксплантов до регенерации

Стратегия немедленного отбора (250-2) была несколько более эффективной по сравнению с задержкой на семь дней (0-2). Для первого варианта эффективность составила 8%, а для второго – 5,6%. Частота регенерации для нетрансгенного контроля составляла 27% и 55,5% в присутствии дексаметазона и 5-ФЦ, достигала 45,2% и 75% без активатора рекомбиназы и селективных агентов в среде для первого и второго эксперимента соответственно.

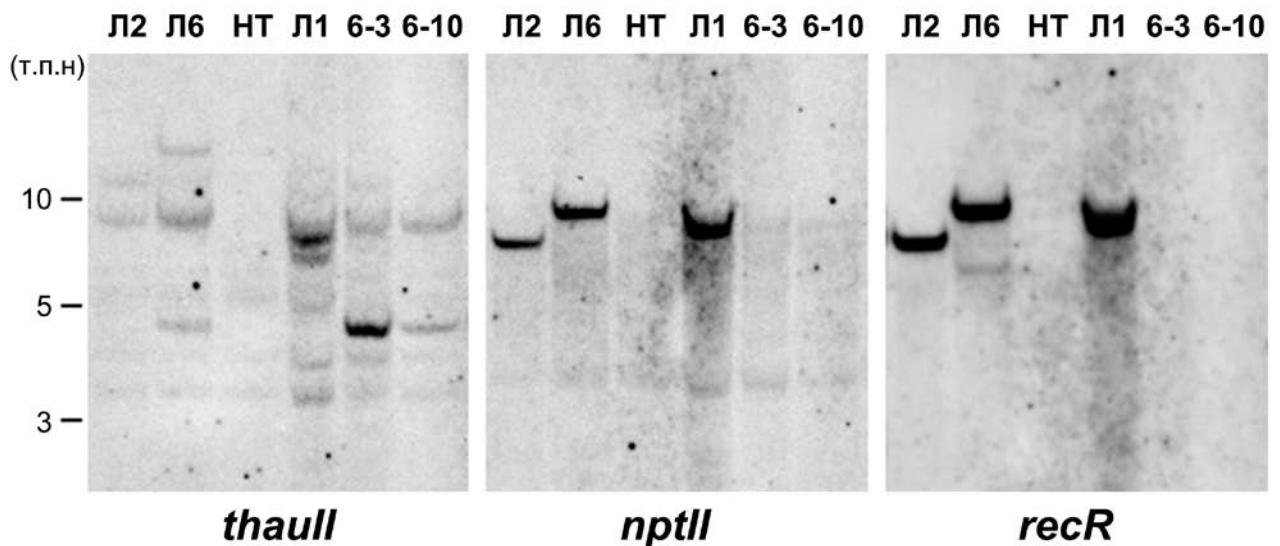
### **3.3.4. Молекулярно-биологический анализ безмаркерных растений яблони**

ПЦР-анализ выявил, что все пять сублиний, полученных из эксплантов линии 1, являются эскейпами, то есть по генотипу близки с материнской линией, поскольку в дополнение к гену *thauII* они содержат последовательности генов *nptII*, *codA* и *recR*, фланкированных сайтами RS. Положительный сигнал отсутствовал для селективных генов в ПЦР с геномной ДНК всех сублиний, полученных из линии 6, в то время как целевой ген с его регуляторными последовательностями присутствует во всех сорока сублиниях, что указывает на более или менее правильное удаление обоих трансляционно слитых селективных генов. На Рисунке 14 представлен ПЦР-анализ 9-ти сублиний, полученных из линии 6, и 3-х сублиний, полученных из линии 1 (электрофореграмма на ген *recR* не приведена).

Чтобы подтвердить результаты, полученные с помощью ПЦР, мы провели гибридизацию по Саузерн-блоттингу с использованием геномной ДНК трех материнских и двух потенциальных безмаркерных сублинии (Рисунок 15). 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. По-видимому, во всех случаях произошла частичная интеграция области T-ДНК только с целевым геном. В обеих проанализированных сублиниях (получены после активации рекомбиназы) зонды на гены *recR* и *nptII* не гибридизуются, но присутствуют по две полосы для гена тауматина.



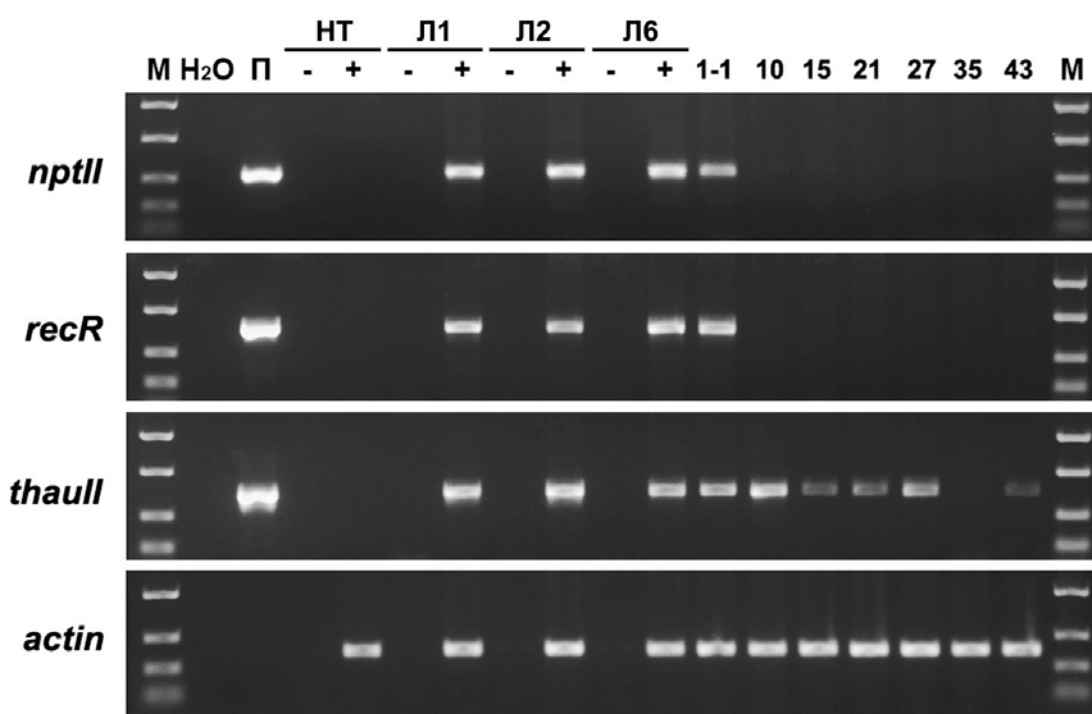
**Рисунок 14** – Молекулярный анализ растений яблони после индукции рекомбиназы. ПЦР-анализ с использованием специфических праймеров для генов *codA*, *nptII* и *thauII*. H<sub>2</sub>O – вода; П – плаزمида рMF-E8; НТ – нетрансгенное растение; Л1, Л6 – первичные трансгенные линии; другие числа – полученные сублинии, первое число указывает, из какой линии получено растение; М – маркер молекулярного веса.



**Рисунок 15** – Саузерн-блоттинг родительских (Л1, Л2, Л6) и безмаркерных (6-3, 6-10) растений яблони. НТ – нетрансгенный контроль.

### 3.3.5. Анализ экспрессии перенесенных генов методом ОТ-ПЦР

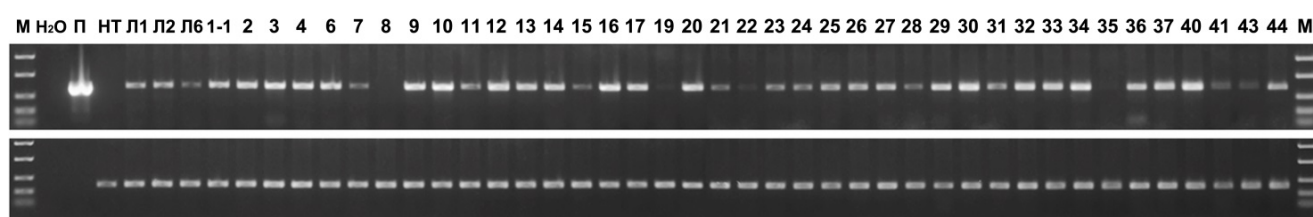
Для оценки уровня транскрипции целевого гена в безмаркерных растениях яблони мы использовали полуколичественную ПЦР, сопряженную с обратной транскрипцией. Для этого суммарную РНК выделяли из молодых стерильных растений, а затем использовали в качестве матрицы для обратной транскрипции. В первом эксперименте, помимо целевого гена, мы проанализировали экспрессию селективных генов неомицинофосфотрансферазы (*nptII*) и рекомбиназы (*recR*) в родительских трансгенных растениях и в некоторых полученных сублиниях. Результаты анализа показаны на Рисунке 16. В качестве подтверждения выравнивания полученной кДНК был использован продукт актинового «домашнего хозяйства» гена. Экспрессия всех генов из Т-ДНК была обнаружена в трех родительских линиях.



**Рисунок 16** – Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ четырех генов в растениях яблони. М - маркер молекулярной веса; H<sub>2</sub>O – вода; П – плаزمида рMF-E8; НТ – нетрансгенный контроль; Л1, Л2 и Л6 – родительские трансгенные линии; другие цифры – некоторые из полученных сублиний; - отрицательный контроль – реакцию проводили без добавления обратной транскриптазы; + - реакцию проводили в присутствии обратной транскриптазы.

В мРНК сублиний, полученных из линии 6, после удаления нежелательной ДНК остался только ген тауматина II. В сублинии 1-1, полученной из линии 1, также была обнаружена мРНК селективных генов. Ранее, с помощью ПЦР и Саузерн-блоттинга, было обнаружено, что растение этой сублинии является эскейпом (прошло через стадию отрицательного отбора).

Далее, используя метод полуколичественной ОТ-ПЦР, мы оценили относительный уровень экспрессии гена тауматина II во всех полученных безмаркерных растениях яблони (Рисунок 17).

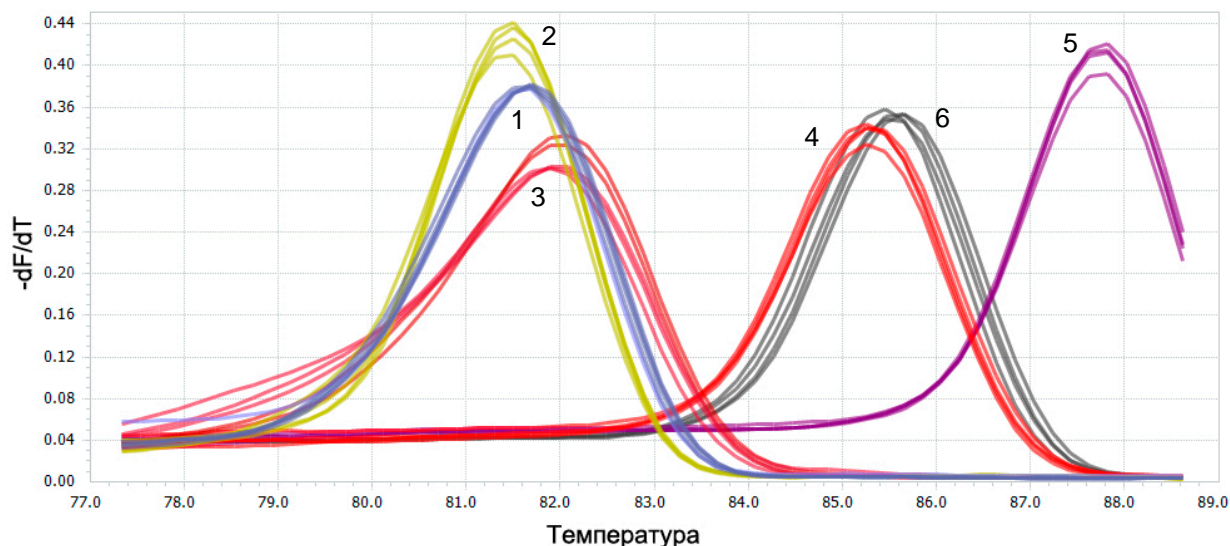


**Рисунок 17** – Полуколичественный ОТ-ПЦР-анализ экспрессии гена тауматина II в безмаркерных растениях яблони. На верхней панели реакция на ген тауматина, на нижней панели – на ген актина («домашнего хозяйства»). М – маркер молекулярного веса; H<sub>2</sub>O – вода; П – плаزمида рMF-E8 (использовали для трансформации яблони); НТ – нетрансгенный контроль; Л1, Л2 и Л6 – родительские трансгенные линии; другие цифры – безмаркерные сублинии (за исключением 1-1).

Ровный сигнал на ген актина демонстрирует, что количество кДНК, взятой для реакции, одинаково во всех анализируемых образцах. Разница в уровне сигнала целевого гена указывает на индивидуальные характеристики сублиний яблони. Несмотря на присутствие последовательности гена тауматина во всех растениях яблони, мРНК этого гена в наших экспериментальных условиях не была обнаружена в двух сублиниях, и еще в других шести сублиниях она была очень слабой. С помощью программы GelQuant сравнили относительный уровень экспрессии среди всех полученных безмаркерных сублиний. В результате анализа были отобраны восемь суперэкспрессирующих растений.

### 3.3.6. Анализ экспрессии целевого гена методом ПЦР в реальном времени

Перед проведением экспериментов по оценке уровня экспрессии перенесенного гена тауматина II в растениях яблони было необходимо определить, подходят ли выбранные праймеры для количественного определения ПЦР в реальном времени, их специфичность, а также подобрать оптимальные температуры отжига для каждой пары. Для этого проводили реакции ПЦР с градиентом температуры отжига от 58°C до 68°C с последующим анализом кривых плавления продуктов реакции. Этот метод позволяет определить, присутствуют ли неспецифические продукты в смеси или димеры праймеров. Поскольку в наших экспериментах используется интеркалирующий краситель, который связывается с любой двухцепочечной ДНК, специфичность реакции имеет фундаментальное значение для правильной оценки результатов. Для ампликонов, полученных со всеми парами праймеров, было обнаружено только по одному пику, что указывает на гомогенность продукта и высокую специфичность реакции (Рисунок 18).



**Рисунок 18** – Нормализованные пики плавления продуктов ПЦР с разными наборами праймеров на гены «домашнего хозяйства» (1-3) и целевой ген (4-6). 1 – АСТ11, 2 – ТНFS, 3 – ТМр1, 4 – Th84, 5 – Th113, 6 – Th95.

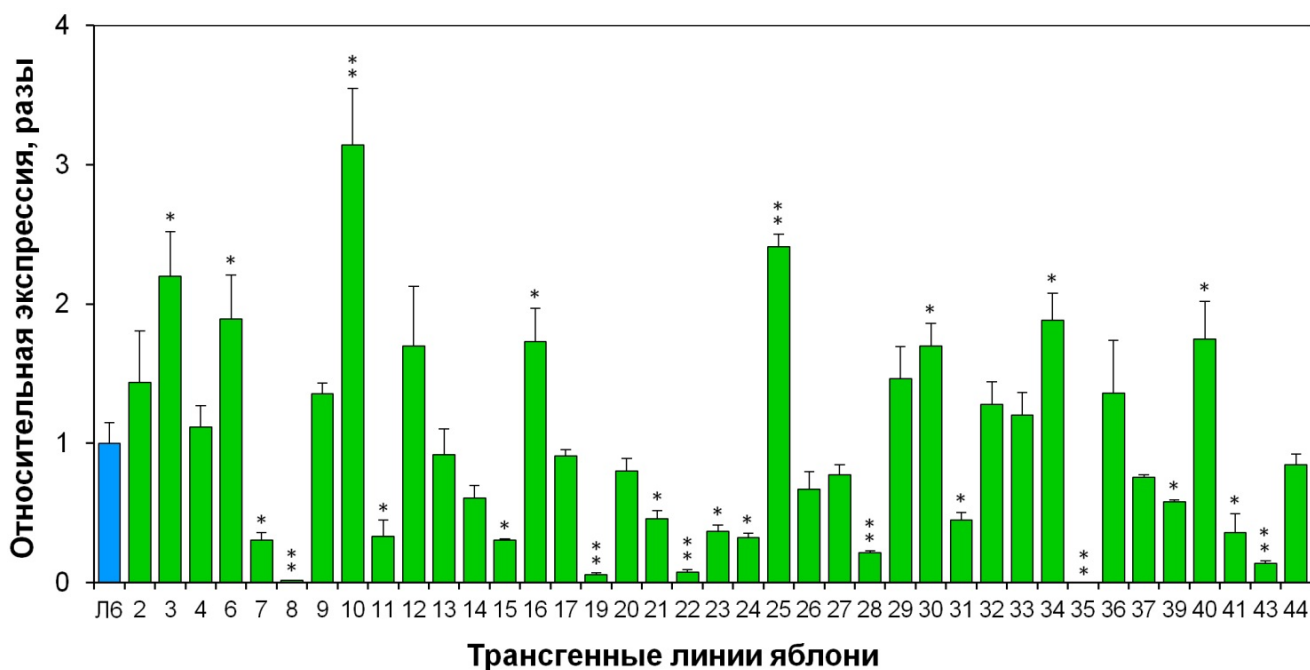
Оптимальные температуры отжига для разных наборов (по акронимам) оказались равными: АСТ11 – 62°C, THFS – 65°C, ТМр1 – 65°C, Th84 – 62°C, Th113 – 65°C, Th95 – 62°C. Эффективность реакции также является важным параметром при оптимизации условий реакции. В идеальных условиях она равна 2, то есть на каждом цикле амплификации происходит удвоение продукта. В наших экспериментах эффективность реакций для праймеров генов «домашнего хозяйства» варьировала от 1,90 до 1,95, а для праймеров гена тауматина II – от 1,79 до 1,90, причем наилучший результат был обнаружен для пары Th84. В некоторых случаях особенности вторичной структуры ДНК изучаемого гена, а также высокая степень нуклеотидной гомологии с другими генами не позволяют конструировать праймеры, обеспечивающие идеальные условия для протекания реакции. Поскольку все выбранные праймеры были пригодны для ПЦР-анализа в реальном времени, мы использовали набор Th84 для целевого гена и все три пары для генов «домашнего хозяйства». Среднее геометрическое значение трех выбранных генов домашнего хозяйства было выбрано в качестве точного коэффициента нормализации (Vandesompele et al., 2002). Уровень экспрессии гена тауматина в родительской линии 6 был принят за 1.

Экспрессия гена тауматина II была обнаружена во всех безмаркерных сублиниях, кроме сублинии 35 (Рисунок 19). 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. Метод количественной оценки экспрессии гена тауматина в значительной степени подтвердил результаты, полученные с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР.

Таким образом, растения со слабым уровнем сигнала в ПЦР в реальном времени также показали крайне низкие значения, а линии с высоким сигналом в ОТ-ПЦР показали лучшие результаты в анализе ПЦР в реальном времени. Только для сублинии 25 результаты двух методов анализа вступили в противоречие друг



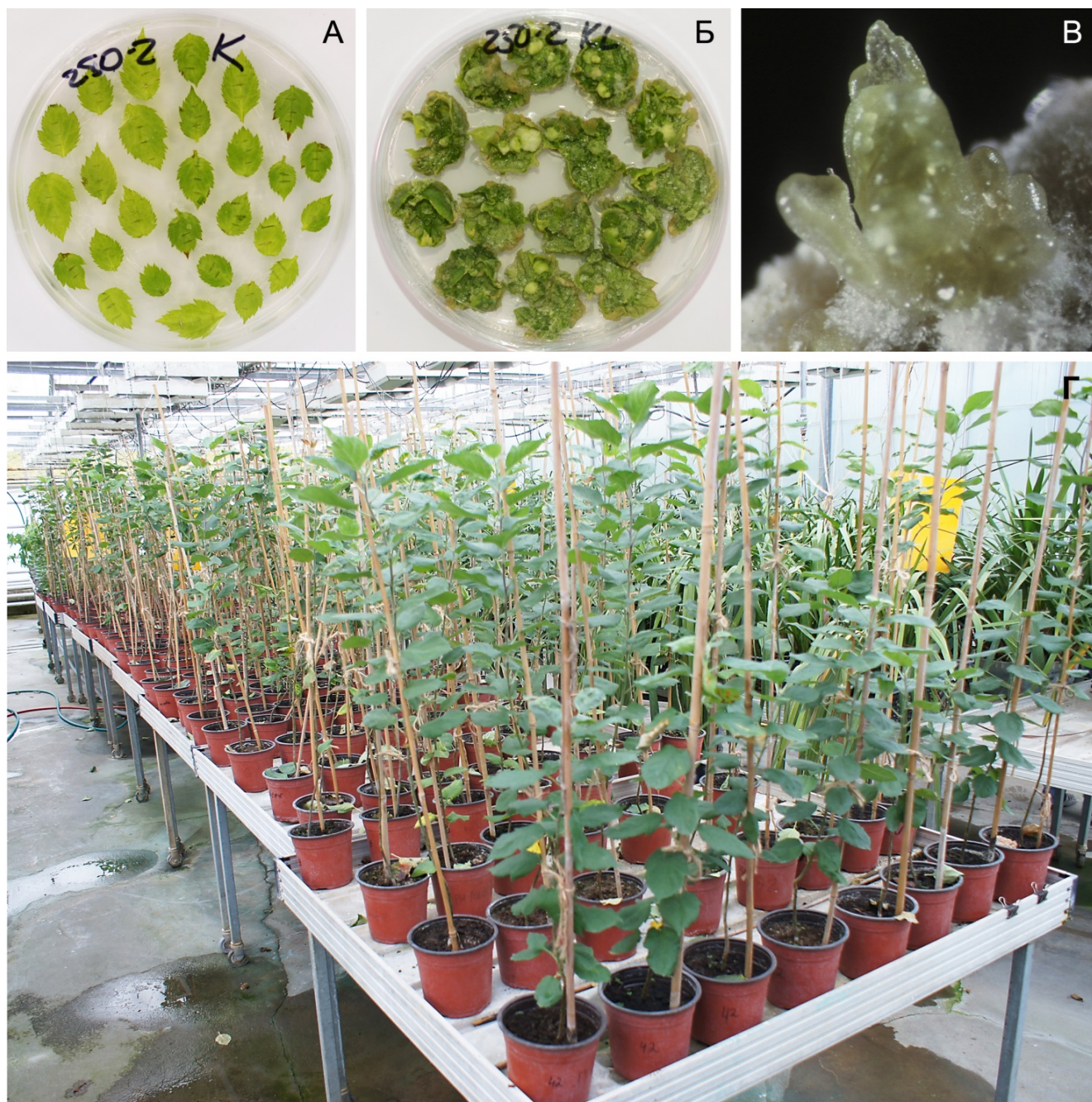
с другим – метод ПЦР в реальном времени выявил значительно больший относительный уровень мРНК, чем было показано с помощью полуколичественной ОТ-ПЦР.



**Рисунок 19** – 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 1 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.

Для оценки уровня экспрессии гена тауматина II в безмаркерных растениях оба метода оказались подходящими и продемонстрировали сходные результаты. Полуколичественная ПЦР с обратной транскрипцией позволяет, прежде всего, исключить растения без экспрессии или при очень низких значениях, тогда как метод ПЦР в реальном времени позволяет получить более точную оценку – в этом случае можно получить данные насколько уровень мРНК анализируемого гена в конкретном растении изменяется относительно других сублиний и первичных трансгенных линий.

В результате мы отобрали восемь высокоэкспрессирующих сублиний, в которых уровень мРНК гена тауматина II превышал значение родительской линии 6 в 1,5–3 раза. Эти сублинии были размножены и привиты на карликовые подвои для ускоренного плодоношения (Рисунок 20, Г). Мы планируем количественно измерить накопление белка в плодах и оценить улучшение и модификацию вкуса.



**Рисунок 20** – Получение безмаркерных растений яблони. А – листовые экспланты родительской трансгенной линии 6. Б – регенерация на среде, содержащей 5-ФЦ. В – развитие молодых побегов. Г – растущие в теплице привитые безмаркерные растения яблони.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Клонирование и анализ промотора *ELIP* томата

В биотехнологии растений часто желательно контролировать экспрессию генов на определенной стадии роста растений или в конкретной растительной ткани. Для этой цели требуются регуляторные последовательности, которые обеспечивают желаемую инициацию транскрипции в соответствующем типе клеток и/или периоде развития растения, не оказывая серьезного вредного влияния на развитие и продуктивность растения. В этой работе мы охарактеризовали промотор гена *ELIP* из томата.

*ELIP* был впервые идентифицирован в горохе как белок, связанный с мембраной хлоропласта, 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 светом, а также при 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). Идентификация белков *ELIP* у разных видов и их потенциальная фотозащитная функция дополняется представлением о том, что эти белки участвуют в восстановлении фотосинтетического аппарата (Berti and Pinto, 2012). Также было высказано предположение, что белки *ELIP* играют роль в транзициях хлоропласта в хромопласт у созревающих плодов томата. Известно, что количество мРНК гена *ELIP* резко возрастает к бланжевой стадии развития плода (Bruno and Wetzal, 2004), что побудило нас исследовать промотор гена *ELIP* и провести его функциональную характеристику как потенциально сильного, специфичного для созревания промотора. Анализ экспрессии репортерного гена *gusA* под контролем промотора *ELIP* позволил понять регуляцию гена *ELIP*.

Чтобы определить тканевую специфичность, регуляцию развития и силу промотора *ELIP*, мы клонировали 5'-область –2165 п.н. (полноразмерный промотор) гена *ELIP* и слили его с геном *gusA*. Анализ последовательности выявил большое количество цис-регуляторных элементов в этом регионе, которые ранее были идентифицированы в промоторах растений. В соответствии с их местоположением мы сконструировали серию делеционных вариантов промотора *ELIP*. С помощью программы, предсказывающей положение старта инициации трансляции, удалось выявить наличие нетранслируемой области размером 110 п.н.

Самый короткий вариант промотора, –100 п. н., не обеспечивал экспрессию *gusA* во всех анализируемых тканях. Это было ожидаемо, потому что, несмотря на наличие трех цис-регуляторных мотивов в усеченном промоторе, отсутствует существенный основной элемент для этого типа промотора, ТАТА-бокс. Соответственно, растения, трансформированные pVIE100, в данном исследовании мы использовали в качестве отрицательного контроля, содержащего ген *gusA*. Минимальным промотором, управляющим экспрессией *gusA*, оказалась область –200 п.н.

Гистохимический анализ экспрессии гена *gusA* в различных тканях показал, что короткие версии промотора *ELIP* (версии –200 п.н. и –395 п.н.) направляли экспрессию репортерного гена во все ткани, включая участки главного корня, прилегающие к зоне транзиции (между корнем и стеблем). Отсутствие в последовательностях этих версий промотора многих цис-элементов, в первую очередь участвующих в регуляции светом, стало причиной их слабой конститутивной активности. Кроме того, GATABOX, ответственный за высокую активность промотора и тканеспецифическую экспрессию (Lam and Chua, 1989), также не представлен в этих двух коротких промоторах. Мотивы GATA были идентифицированы в таких сильных промоторах, экспрессируемых в зеленой ткани, как промоторы *rbcS* (Manzara et al., 1991) и *Lhcb* (Anderson and Kay, 1995). Удаление этих элементов из промотора гена АСР-десатуразы (stearoyl-acyl carrier protein), кодирующего пластид-локализованный фермент, приводило к резкому

снижению силы промотора (Taha et al., 2012). Другие делеционные формы промотора демонстрировали похожий паттерн экспрессии гена *gusA*, наблюдаемой в цветке, стебле и, слабо, листе. Интенсивность окрашивания GUS незначительно увеличивалась при удлинении 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). САСТФТРРСА1 является наиболее распространенным цис-элементом в промоторе гена *ELIP*, что не является неожиданным, поскольку *ELIP* является хлоропластным белком.

Профиль экспрессии репортерного гена в зеленых неплодовых тканях в нормальных условиях, даже управляемый полноразмерным промотором *ELIP*, не соответствовал профилю нативного (*ELIP*) гена. мРНК *ELIP* образуется только на ранних стадиях озеленения после экспозиции на свету этиолированных побегов и плодов с максимальным накоплением на бланжевой стадии спелости (Bruno and Wetzel, 2004). Вполне вероятно, что некоторые дистальные мотивы, которые не присутствуют в анализируемой последовательности, определяют решающую роль гена в ранней активации светом и тканевой специфичности. Также возможно, что обнаруженные участки ДНК, общие для промотора *ELIP* и некоторых других плодоспецифичных промоторов, являются потенциальными цис-регуляторными элементами (Таблица 3). Выявленные последовательности, возможно, позволят в дальнейших исследованиях идентифицировать новые регуляторные мотивы.

Гистохимический анализ локализации GUS-активности в плодах показал, что промотор *ELIP* в основном стимулировал экспрессию, специфичную для созревания. Очень слабая экспрессия была отмечена в незрелых плодах с заметным увеличением интенсивности от зрелой зеленой стадии и далее с

максимальной экспрессией на красной стадии для полноразмерного промотора. Преобладающая экспрессия в кожице плодов растений, несущих pVIE684, свидетельствует о том, что негативные регуляторные мотивы расположены в области между -395 и -684 п.н. В этой версии промотора (с удлинением последовательности) встречается несколько цис-элементов, ответственных за регуляцию светом, например, GATABOX, IBOXCORE, INRNTPSADB и -10PENVPSBD. В то же время небольшое количество мотивов СААТ-бокса (9 из 28 в полноразмерном промоторе), известных как энхансерные области, и отсутствие этилен-чувствительного 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.

Низкая активность гена *gusA* (относительно CaMV35S) под контролем промотора *ELIP* была обнаружена в неплодовых тканях трансгенных линий томата. В связи с этим мы сосредоточились на исследовании силы промотора в плодах томата на разных стадиях созревания с использованием количественного флюориметрического анализа. Количественные данные коррелировали с гистохимическим GUS-окрашиванием плодов томата. Самая сильная активность промотора была продемонстрирована полноразмерной версией промотора *ELIP*. Кроме того, анализ выявил очень низкий уровень GUS в незрелых зеленых плодах, который возрастал вплоть до 30-кратного значения в красных спелых плодах. Эти наблюдения согласуются с данными, полученными ранее при анализе двух трансгенных линий, несущих -1293 п.н. версию промотора *ELIP*. Авторы исследования, посвященного разработке мультисайтового инструментария (multisite gateway-based toolkit), показали, что область промотора 1293 п.н.

направляет экспрессию репортерного гена преимущественно во внешний перикарп на незрелых стадиях созревания плодов. При созревании экспрессия распространяется на весь плод, причем самые высокие уровни наблюдаются на красной стадии спелости (Estornell et al., 2009). Сравнение относительного уровня экспрессии *gusA* под контролем 35S промотора и полноразмерного промотора *ELIP* показало, что на красной стадии различия в экспрессии перестают быть достоверно различимы (рисунок 4, E). Это говорит о том, что версия –2165 п.н. промотора *ELIP* сравнима по силе с конститутивным CaMV35S промотором. Укорочение до –1369 п.н. уменьшало силу промотора почти в 2 раза. По-видимому, полная версия промотора не содержит каких-либо негативных регуляторных мотивов, и в то же время полный набор цис-элементов, включая энхансеры, определяет высокую силу промотора.

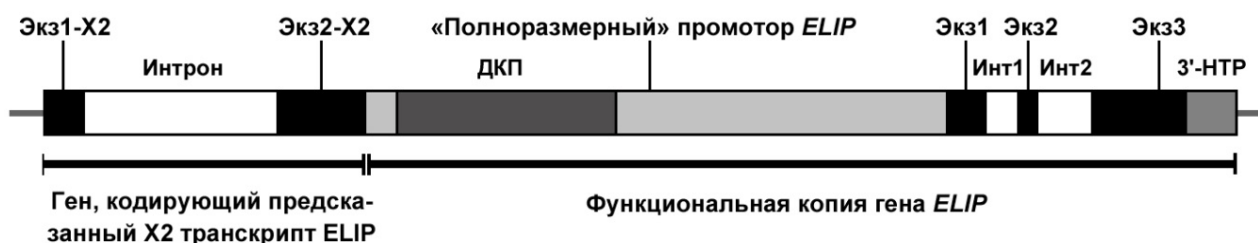
Анализ с использованием онлайн-инструмента BLASTn показал, что промотор *ELIP* содержит весь ДКП ретротранспозона *CopiaSL\_19*. Ретротранспозоны представляют собой класс мобильных элементов, наиболее распространенных в геноме растений, и могут существенно влиять на эволюцию генома. Ретротранспозонные элементы составляют почти 62% генома томата (Paz et al., 2017). ДКП не кодируют какие-либо известные белки, но содержат промоторы, энхансеры и другие элементы, связанные с транскрипцией (Kumar and Bennetzen, 1999). Кроме того, сами ретроэлементы часто проявляют конститутивную или тканеспецифическую транскрипционную активность (Neumann et al., 2003; Tam et al., 2007). Это говорит о том, что мотивы в регуляторных последовательностях ретроэлемента распознаются транскрипционной системой растения как цис-регуляторные элементы. Кроме того, ДКП имеет сходство с компонентами других промоторов и может использоваться в качестве самостоятельного промотора (Suoniemi et al., 1996). Считается, что растительные колимовирусы (которые обладают многими сильными конститутивными промоторами) представляют автономную систему ретроэлементов вместе с ДКП из-за их общих эволюционных связей, что было выявлено при сравнении последовательностей генов *gag* и *pol* (Llorens et al.,

2011). Интересно, что аналогичный элемент ДКП (обнаруженный в гене *ELIP*) в той же ориентации присутствует в 5'-области генов фитохрома В1 и 3-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим А-редуктазы 2 (HMC2) томата (GenBank № AJ002281 и № U68072, соответственно). Фитохромы – это фоторецепторные белки, которые участвуют в регуляции биогенеза пластид, синтеза крахмала и метаболизма каротиноидов в плодах томата (Bianchetti et al., 2018). HMC2 катализирует превращение гидроксиметилглутарил-кофермента А в мевалоновую кислоту, а мРНК HMC2 накапливается только на последних стадиях созревания плодов томата (Park et al., 1992). Связь между функцией (фитохромом) и профилем экспрессии (HMC2) этих генов и присутствием ДКП в их 5'-области и в гене *ELIP* позволяет провести некоторые аналогии о роли ДКП в специфической экспрессии гена. Интересно, что 5'-область гена *LeACO1* (в положении с –1722 п.н. до –590 п.н.) содержит повторяющийся *coria*-подобный ретротранспозон ДКП (Blume et al. 1997). Его последовательность содержит протяженные области, которые имеют гомологию с плодоспецифичными промоторами генов томата *E4* и *2A11* (Blume and Grierson, 1997). Общий консенсусный мотив (из гена *LeACO1*) с геном *ELIP*, CGCa/gTTTACAC, находится только в повторах ДКП, но не в гене *ELIP*. Здесь ДКП влияет на силу промотора *ELIP*, но не влияет на специфичность.

Участок, прилегающий к 5'-региону промотора *ELIP*, который кодирует предсказанный транскрипт X2 гена *ELIP*, содержит только два экзона и один интрон с потенциально функциональной открытой рамкой считывания (Рисунок 21). В то же время кодирующая область гена *ELIP* включает три экзона и два интрона. Выравнивание аминокислотных последовательностей предсказанного белкового продукта X2 и *ELIP* показывает очень высокое сходство, но в первой трети N-конца продукта X2 отсутствуют 24 аминокислотных остатка, обнаруженных в *ELIP*. Функция укороченной версии предсказанного белка остается неизвестной и требует дальнейшего изучения. Интересно, что ДКП-составляющая промотора *ELIP* является одновременно терминатором транскрипции для гена предсказанного транскрипта X2. Последовательности 5'- и 3'-ДКП транспозона *CoriaSL\_19* имеют очень высокую нуклеотидную гомологию



(98%). Учитывая это, а также тот факт, что они фланкируют кодирующие области генов ретротранспозонов, эти области, очевидно, содержат как промоторы, так и терминаторы в одном элементе. В совокупности эти данные указывают на большое влияние ДКП на эволюцию тканеспецифических промоторов растений, вероятно, из-за универсальности эффективных регуляторных элементов, присутствующих в последовательности ДКП.



**Рисунок 21** – Схематическое изображение структуры гена *ELIP* и окружающих его элементов в геноме томата. Карта основана на анализе клонированного промотора *ELIP* и хромосомной последовательности ДНК. Экз – экзон; Инт – интрон; 3'-НТР – 3'-нетранслируемый регион; ДКП – длинный концевой повтор.

В будущем было бы интересно изучить влияние различных биотических и абиотических факторов на активность промотора *ELIP*. Поскольку промотор принадлежит гену светоиндуцируемого белка, в первую очередь это касается влияния света. Результаты, представленные в этом исследовании, собранные данные и более точное картирование функциональных элементов промотора *ELIP* расширяют знания о регуляции сильных индуцибельных промоторов.

#### 4.2. Получение безмаркерных растений томата

Для получения безмаркерных трансгенных растений томата мы использовали вектор pMF1, содержащий ген рекомбиназы R из дрожжей (*Z. rouxii*), слитый с лиганд-связывающим доменом глюкокортикоидного рецептора, а также бифункциональный ген CodA-nptII, позволяющий отбирать растения на 5-ФЗ после удаления нежелательной области ДНК из генома. В качестве смыслового гена, мы использовали ген суперсладкого белка тауматина II из

тропического растения катемфе (*T. daniellii*). В дополнение к получению растений без маркеров, другой важной задачей в нашем исследовании было обеспечение высокого уровня накопления белка в плодах томата. Поэтому, для контролируя экспрессии гена тауматина II, мы использовали недавно охарактеризованный сильный промотор гена *ELIP* томата (Timerbaev and Dolgov, 2019). Поскольку это первое сообщение о применении промотора *ELIP* для направленной гетерологичной экспрессии, в качестве положительного контроля мы также использовали классический плодоспецифичный промотор *E8* томата.

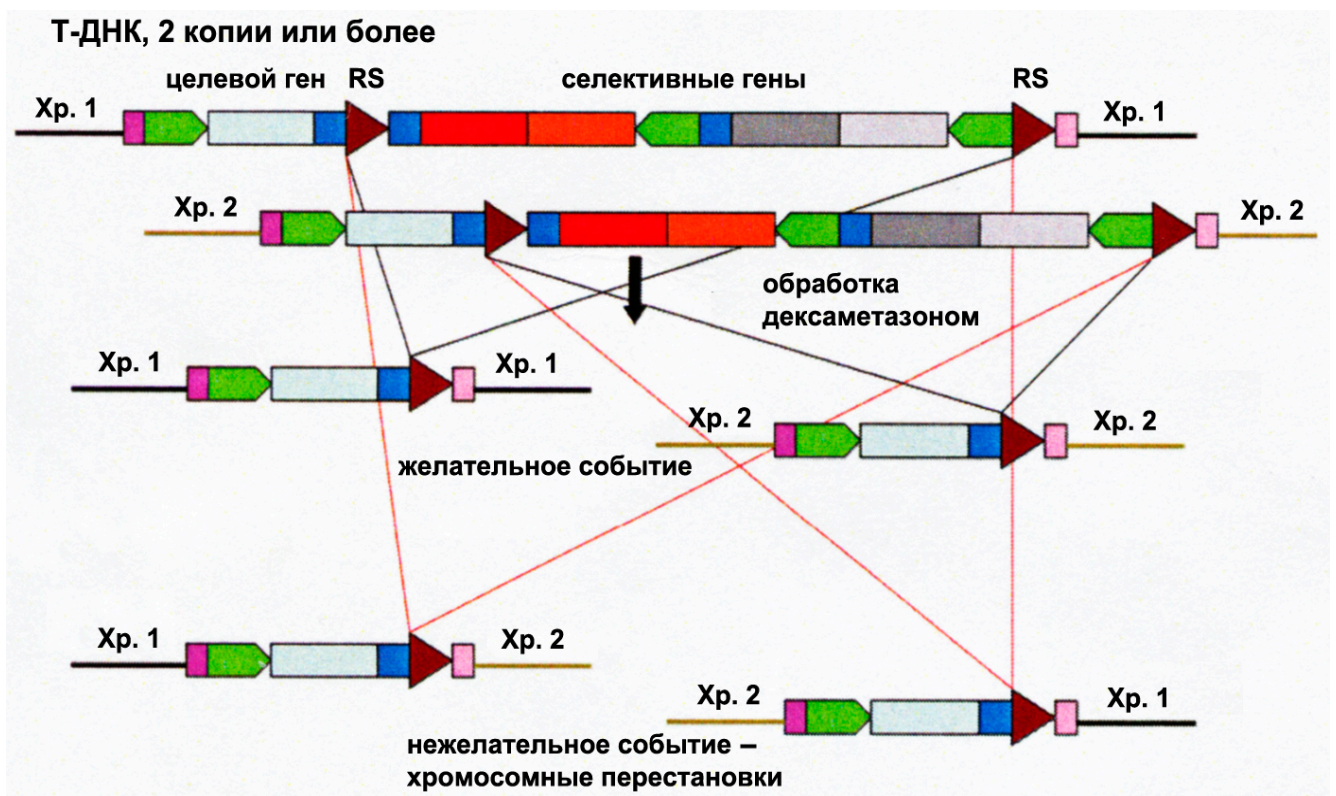
Производители векторной системы pMF1, которую мы использовали в наших экспериментах для получения безмаркерных растений томата, предлагают два варианта отбора растений без маркеров: немедленная и отложенная селекции. В нашем исследовании мы использовали оба. Низкая эффективность быстрой селекции без получения стабильных трансгенных растений, в которой из 155 предполагаемых трансгенных каллусов было получено только одно растение без маркера, 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 T-ДНК, что указывает на слабое селективное давление выбранной концентрации 5-ФЦ; несмотря на то, что в предварительных экспериментах при 250 мг/л регенерация была полностью подавлена (Рисунок 6), для стратегии раннего отбора эта концентрация оказалась недостаточной. Кроме того, достигнутые результаты свидетельствуют о низкой эффективности опосредованного рекомбиназой вырезания ДНК. Чтобы понять, почему это происходит, а также сравнить подходы, мы получили стабильные томатные трансформанты. Тщательный анализ трансгенных растений показал, что почти половина из них не содержала полной последовательности T-ДНК, что выразилось, в первую очередь, в отсутствии RS-сайта вблизи левого бордера T-ДНК. Этот результат соотносится

с данными о том, что большинство интеграций Т-ДНК у томата требуют гомологии между последовательностями левой границы Т-ДНК (LB) и геномной ДНК растений (Thomas and Jones, 2007). Подобные структуры ДНК в предлагаемом механизме интеграции были также обнаружены в *Nicotiana tabacum*, что предполагает общий механизм для видов пасленовых. Основное требование наличия обоих сайтов рекомбинации для успешного удаления ДНК делает особенно важным получение растений с полными вставками Т-ДНК. Поэтому для активации рекомбиназы и селекции безмаркерных растений были выбраны только линии с полными вставками Т-ДНК. Больше половины из использованных в экспериментах линий (13 из 24) дали устойчивые к 5-ФЦ побеги, среди которых только один не содержал маркерных генов. Несмотря на то, что большинство других сублиний утратили способность расти на среде с антибиотиком канамицином, они содержали нефункциональные фрагменты гена *nptII*. Мы полагаем, что в этих случаях произошла неполное вырезание и/или хромосомные перестройки вследствие наличия множественных и абберантных или частичных вставок Т-ДНК. Возможные варианты хромосомных перестроек после активации рекомбиназы в случаях с множественными вставками были описаны Krens с соавторами (Krens et al., 2010) и представлены на Рисунке 22. Необходимость высокой гомологии между последовательностями левого бордера и томатной ДНК для полной интеграции Т-ДНК, а также вероятность множественных вставок при высокой эффективности трансформации (в наших экспериментах до 47%) делает томат довольно трудным объектом для специфического удаления селективных генов при использовании выбранной векторной системы. Несмотря на это, нам удалось получить две полностью безмаркерные линии томата (с обоими промоторами), в которых было продемонстрировано накопление белка тауматина в плодах. Было показано, что в геномах сублиний отсутствовали регуляторные элементы вирусного и бактериального происхождения, а также мРНК селективных генов.

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 сайт-специфической R/RS-системы рекомбинации на основе векторной системы MAT (Khan et al., 2011).

Нами впервые заявлено об отсутствии строгой плодовой специфичности промотора *E8*. Ранее было показано, что активность *E8* не наблюдается даже в незрелых плодах (Deikman et al., 1992; Good et al., 1994). Однако в наших экспериментах экспрессия гена на уровнях мРНК и белка под контролем *E8* была обнаружена в листьях. Timerbaev с соавторами также показали накопление мРНК тауматина в листьях яблони под контролем промотора *E8* томата (Timerbaev et al., 2019). Для яблони этот промотор является гетерологичным, что может частично объяснить экспрессию гена под его контролем в листьях.



**Рисунок 22** – Возможные рекомбиназные события в растительном геноме при множественных вставках T-ДНК. Хр. 1, Хр. 2 – хромосома 1 и 2, соответственно, RS – сайт рекомбинации (по Krens et al., 2010, с изменениями).

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). Наиболее широко экспрессируемый ген *rbcS* составляет 5–6% от общего растворимого белка в растительной клетке (Outchkourov et al., 2003). Достигнутые нами значения накопления белка тауматина были ненамного ниже и составили 3,7% при использовании промотора *ELIP*, что указывает на почти максимальную эффективность созданной экспрессионной кассеты. В большинстве работ, посвященных экспрессии чужеродных белковых генов в растениях со стабильной ядерной трансформацией, накопление 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 накопленного белка в спелых плодах варьировало от 1,8% до 4,6% от ОРБ. Высокие концентрации тауматина под контролем промотора *ELIP*, соответствуют представленным ранее данным (см. раздел 3.1.), согласно которым уровень активности репортерного гена *gusA*, под контролем полной версии (2165 п.н.) промотора *ELIP*, был сопоставим с уровнем, обеспечиваемым промотором CaMV35 в красных, спелых плодах томата (Timerbaev and Dolgov, 2019).

### 4.3. Получение безмаркерных растений яблони

Сладость является одним из основных факторов потребительских предпочтений для фруктов, поэтому повышение сладости является важной темой в программах по селекции и выращиванию яблони. Параллельно с этим, продолжаются исследования состава плодов яблони и влияния различных метаболитов на вкус и сладость (Ma et al., 2015; Aprea et al., 2017). Вместо классического отбора с поиском новых диких форм со сладкими плодами, мы предлагаем более многообещающий подход – гетерологичное экспрессию суперсладких белков в яблоне. Мы успешно работали над улучшением вкуса плодов различных плодовых культур, в том числе древесных растений (Dolgov et al., 2011). В настоящей работе мы применили технологию создания безмаркерных растений, одновременно используя только гены растительного происхождения для получения яблони, экспрессирующих сверхсладкий белок тауматин. Стратегия отложенной селекции включала получение трансгенных растений и активацию рекомбиназы в их тканях. Рабочая концентрация дексаметазона в качестве такого активатора составила 10 мкМ в соответствии с рекомендациями разработчика системы; имеются также доказательства того, что максимальный индукционный эффект (выход на плато) наблюдается при концентрации дексаметазона 10 мкМ (Aoyama and Chua, 1997). Vanblaere с соавторами использовали такую же концентрацию для активации рекомбиназы (Vanblaere et al., 2011), однако в более поздней работе создатели системы pMF неожиданно повысили концентрацию до 50 мкМ (Krens et al., 2015). В другом исследовании, увеличение концентрации дексаметазона с 10 до 50 мкМ не приводило (за исключением одной линии яблони) к достоверно значимому увеличению рекомбиназной активности в яблоне и груше (Righetti et al., 2014).

Замена жидкой среды на твердую агаризованную на стадии культивирования с дексаметазоном положительно влияла на жизнеспособность эксплантов (и как результат эффективность регенерации) без потери эффективности элиминации ДНК (данные не приведены).

Мы получили безмаркерные растения яблони с использованием бифункционального селективного гена и индуцибельной сайт-специфической рекомбиназой R. ПЦР анализ показал, что все отобранные сублинии (полученные из линии б) были свободны от селективных маркеров. При использовании процедуры отложенного отбора (вариант 0-2) удалось получить 11 безмаркерных растений, и 13 растений было получено при немедленной селекции (вариант 250-2) в первом эксперименте. Часто временное откладывание селективного давления при агробактериальной трансформации растений позволяет повысить эффективность регенерации, но в случае отбора на 5-ФЗ желаемого положительного эффекта не наблюдалось.

Схожие для двух вариантов результаты свидетельствуют, что они оба одинаково подходит для эффективного протокола, и это коррелирует с работами, в которых быстрая селекция была успешно применена для создания безмаркерных растений яблони (Vanblaere et al., 2011; Krens et al., 2015).

На основании результатов, полученных с помощью Саузерн-блоттинга, можно предположить, что в геноме исходной трансгенной линии б есть одна полная копия Т-ДНК и две дополнительные вставки только с кассетой экспрессии целевого гена, которые сохраняются в геноме после рекомбиназной 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. Дополнительные подробные молекулярные исследования структуры вставок генов в безмаркерных растениях достоверно подтвердят это предположение, а также охарактеризуют интеграционные и элиминационные события. Ранее был проведен полный молекулярный анализ трансгенных 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). Существует мнение, что возможные перестройки хромосом или делеции являются одним из основных недостатков при использовании систем с сайт-специфическими рекомбиназами (Yau and Stewart, 2013).

Архитектура T-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-фтороцитозина составляла 250 мг/л, однако она обеспечила высокое селективное давление. В это же время отсутствие эскейпов для линии 6 приводит к выводу, что использованная концентрация 5-ФЦ (250 мг/л) 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), однако в более поздней работе концентрация была увеличена до 500 мг/л (Krens et al., 2015).

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 Нооукаас, 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 нетрансгенной ткани, снижая частоту регенерации примерно в 1,5 раза (с 75 до 55%, с 45 до 27% в первом и втором экспериментах, соответственно).

В экспериментах с тканями яблони спонтанная рекомбинация и элиминация ДНК происходила в среднем в 14% случаев (при сравнении вариантов 250-0 и 250-2) – получено четыре сублинии из эксплантов линии 6. Наблюдение, что рекомбинация имеет место без активации дексаметазоном, свидетельствует, что происходит неиндуцированная экспрессия гена. Аналогичный результат был получен также в экспериментах с растениями земляники (Schaart et al., 2004). Еще более высокий уровень спонтанной рекомбинации ранее был продемонстрирован в растениях яблони и груши – в 19–34% трансгенных линий обнаруживалась частичная рекомбинация в отсутствие индукции дексаметазоном (Righetti et al., 2014). Использование термина «спонтанная» по отношению к рекомбинации не совсем корректно в случаях использования дексаметазона и LBD, поскольку таковой она является только для исследователя. В клетке же рекомбиназа R обладает постоянной минорной ферментативной активностью, даже пребывая в неоптимальном конформационном состоянии в составе белкового комплекса с LBD. Это приводит к снижению эффективности достаточно продуманной системы, основанной на рMF – часть трансформантов избавляются от трансгеной вставки еще в процессе селекции, тем самым не позволяя их отобрать. Таким образом, описанные недостатки использованного подхода открывают поле для совершенствования систем создания безмаркерных растений с помощью сайт-специфических рекомбиназ.

В нашей работе для экспрессии гена белка тауматина II мы использовали один 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. 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 в незрелых плодах, так же, как и в листьях, цветах и стеблях не обнаруживалась мРНК этого фермента (Good et al., 1994). Интересно, что Kurokawa и соавторы отмечают в названии своей работы, что «...кассета с промотором E8 и терминатором гена белка теплового шока обеспечивает накопление рекомбинантного белка на высоком уровне преимущественно в плодах трансгенных растений томата...» (Kurokawa et al., 2013), по-видимому, благодаря присутствию миракулина также и в зеленых, незрелых плодах. Был сделан вывод, что терминатор гена теплового шока является сильно выраженным энхансером экспрессии, который может нарушать тканевую специфичность E8 промотора (Kurokawa et al., 2013). И это несмотря на то, что ранее уже было показано, что версия промотора длиной 2181 п.н., в отличие от других укороченных делеционных форм, обеспечивает накопление E8-продукта в незрелых плодах томата (Deikman et al., 1992). Исследования молекулярной эволюции промотора гена E8 томата и поиск различий между функциональными областями у разных видов рода *Solanum* возможно позволит ответить на возникающие вопросы (Zhao et al., 2009). В наших руках даже под контролем промотора E8 размером 1193 п.н. наблюдалась экспрессия генов в вегетативных тканях трансгенных растений томата. Вестерн-блот-анализ позволил выявить, что хоть уровни экспрессии в листьях и плодах значительно варьируют, тем не менее, коррелируют друг с другом. Количественная оценка методом ИФА показала, что уровень белка тауматина в плодах томата в несколько раз выше, чем в листьях. В связи с этим, стало возможным оценить уровень транскрипции целевого гена в листьях безмаркерных растений яблони с использованием полуколичественной ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени. Мы ожидаем увидеть значительно более высокие значения экспрессии гена *thauIII* в плодах яблони, поскольку E8 промотор работает преимущественно в зеленых и спелых плодах, а не в листьях.

Итоговые результаты селекции растений яблони и анализ экспрессии генов Т-ДНК приведены в Таблице 12. Всего было получено 45 сублиний; пять из них оказались нетрансгенными эскейпами, 40 – не содержали маркерных генов. С помощью ПЦР в реальном времени, была показана экспрессия целевого гена белка тауматина в 39 безмаркерных растениях, восемь из которых отобрали для дальнейших анализов. Растения этих сублиний были размножены и привиты на карликовые подвои для ускоренного плодоношения; после получения плодов будут проведены исследования на предмет повышения сладости и улучшения вкуса.

Таким образом, используя вектор на основе системы рМF1, мы разработали протокол, позволяющий получить безмаркерные растения яблони, при этом была продемонстрирована высокая эффективность удаления нежелательной ДНК из генома яблони – они получены только из одной материнской трансгенной линии.

**Таблица 12** – Итоговые результаты экспериментов по созданию безмаркерных растений яблони

Исходная трансгенная линия	Общее количество полученных сублиний	Сублинии с экспрессией гена <i>nptII-codA</i>	Безмаркерных сублиний	Сублинии с экспрессией гена <i>thauII</i>
1	5	5	0	5
6	40	0	40	39

Наши исследования демонстрируют, как с помощью безмаркерных технологий расширяются возможности для дальнейшего улучшения традиционных сортов яблони. Разнообразие сортов яблони может быть расширено с помощью генетической инженерией без использования не растительных 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  $\beta$ -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, экспрессирующих GUS под контролем конститутивного CaMV35S промотора. 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.

В нашем исследовании для получения безмаркерных растений томата мы использовали векторную систему pMF1. 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 рибулозобисфосфаткарбоксылазы томата. Использование этого гена в нашей лаборатории позволило повысить сладость, а также улучшить вкусовые характеристики плодов таких культур как яблоня, клубника, морковь, томат и груша. Используя различные стратегии раннего 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 показали сладкий вкус. Количественная сравнительная оценка уровня экспрессии белка тауматина под контролем двух промоторов была проведена с использованием иммуноферментного анализа. Множественные и/или неполные вставки Т-ДНК, которые часто возникают во время трансформации представителей семейства *Solanaceae*, значительно снижают эффективность используемой системы.

Для получения безмаркерных трансгенных растений яблони мы также использовали вектор рMF1, 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-ФЗ. 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 pMF1, наблюдается неполная интеграция области T-ДНК. Это делает невозможным элиминацию селективных генов из геномов таких линий. Вероятно, хромосомные перестройки вследствие присутствия множественных и аберрантных или неполных вставок T-ДНК частое явление для трансгенных растений томата при высокой эффективности трансформации.

6. Протокол, разработанный на основе использования системы pMF1, применим для создания безмаркерных растений томата, однако особенности интеграции T-ДНК в геномы пасленовых, не позволяют 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 T-ДНК, позволит повысить эффективность получения безмаркерных растений томата.

7. При использовании сайт-специфической рекомбиназы и двух методологических подходов, получены безмаркерные трансгенные линии томата и яблони. 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 яблони – 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 яблони 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 pMF1, она, тем не менее, демонстрирует свою высокую эффективность – безмаркерные растения удалось получить только из одной родительской трансгенной линии.



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

4-МЕ	4-Метилумбеллиферон
5-ФЦ	5-Млюороцитозин
АЦК	Аминоциклопропанкарбоксилат
БАП	6-Бензиламинопурип
ГМО	Генетически модифицированный организм
ДКП	LTR, длинный концевой повтор
ИМК	Индол-3-масляная кислота
ИУК	Индол-3-уксусная кислота
ИФА	Иммуноферментный анализ
МАТ	Мультиавтотрансформация
НУК	1-Нафталинуксусная кислота
ОРБ	Общий растворимый белок
п.н.	Пар нуклеотидов
ТИБА	2,3,5-Трийодбензойная кислота
ANOVA	Односторонний дисперсионный анализ
BCIP	5-Бром-4-хлор-3-индолилфосфат
CaMV35S	35S промотор вируса мозаики цветной капусты
CRISPR/Cas9	Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами/ассоциированный с CRISPR белок 9
ELIP	Светоиндуцибельный белок
ERE	Этилен-чувствительный элемент
GFP	Зеленый флуоресцентный белок
<i>gusA</i>	Ген $\beta$ -Глюкуронидазы
GUS	$\beta$ -Глюкуронидаза
HSP	Белок теплового шока
LBD	Лиганд-связывающий домен
LeACO1	АЦК оксидаза 1 томата

LeACS4	АЦК синтаза 4 томата
LeExp1	Экспанзин 1 томата
MS	Культуральная среда Murashige и Skoog
MYB	Транскрипционный фактор
NBT	Нитро синий тетразолий хлорид
NCBI	Национальный центр биотехнологической информации
nptII, III	Неомицинфосфотрансфераза II, III
PBS	Фосфатно-солевой буфер
PG	Полигалактуроназа
PMI	Фосфоманнозо-изомераза
QL	Культуральная среда Quorin и Lepoivre
rbcS	Малая субъединица рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы
RecR	Рекомбиназа R
RPL2	Рибосомный белок L2 томата
RS	Сайт рекомбинации
TALLEN	Transcription activator-like effector nucleases, эффекторные нуклеазы
ThauII	Тауматин II
TomloxB	Липоксигеназа томата
TSS	Старт инициации транскрипции
ZFN	Нуклеаза цинковые пальцы

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

Мирошниченко Д.Н., Шульга О.А., Тимербаев В.Р., Долгов С.В. Достижения, проблемы и перспективы получения нетрансгенных растений с отредактированным геномом // Биотехнология. – 2019. – №1. – С. 3–26. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2019-35-1-3-26>

Тимербаев В.Р., Долгов С.В. Функциональность генетических конструкций, обеспечивающих конститутивное и тканеспецифическое ингибирование экспрессии гена АЦК-оксидазы томата (*Solanum lycopersicum* L.) посредством РНК-интерференции // Биотехнология. – 2011. – №3. – С. 15–28.

Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit Jr. M.E. Ethylene in plant biology, 2nd edn. San Diego: Academic Press. – 1992.

Adamska I., Kloppstech K. Evidence for an association of the early light-inducible protein (ELIP) of pea with photosystem II // Plant Mol Biol. – 1991. – Vol. 16. – P. 209–223. <https://doi.org/10.1007/BF00020553>

Ainley W., Key J. Development of a heat shock inducible expression cassette for plants: characterization of parameters for its use in transient expression assays // Plant Mol Biol. – 1990. – Vol. 14. – P. 949–967. <https://doi.org/10.1007/BF00019392>

An G., Costa M.A., Ha S.B. Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible // The Plant cell. – 1990. Vol. 2(3). – P. 225–233. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.3.225>

Anderson S.L., Kay S.A. Functional dissection of circadian clock and phytochrome related transcription of the *Arabidopsis* CAB2 gene // Proc Natl Acad Sci USA – 1995. – Vol. 92. – P. 1500–1504. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1500>

Aoyama T., Chua N.H. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants // Plant J. – 1997. – Vol. 11(3). – P. 605–612. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11030605.x>

Aprèa E., Charles M., Endrizzi I., Corollaro M.L., Betta E., Biasioli F., Gasperi F. Sweet taste in apple: the role of sorbitol, individual sugars, organic acids and volatile

compounds // Sci Rep. – 2017. – Vol. 7:44950. <https://doi.org/10.1038/srep44950>

Balazs E., Guilley H., Jonard G., Richards K. Nucleotide sequence of DNA from an altered-virulence isolate D/H of the cauliflower mosaic virus // Gene. – 1982. – Vol. 19. – P. 239–249. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90013-0)

Bartoszewski G., Niedziela A., Szwacka M., Niemirowicz-Szczytt K. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth // Plant Breed. – 2003. – Vol. 122. – P. 347–351. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00864.x>

Beaudoin N., Rothstein S.J. Developmental regulation of two tomato lipoxygenase promoters in transgenic tobacco and tomato // Plant Mol Biol. – 1997. – Vol. 33. – P. 835–846. <https://doi.org/10.1023/A:1005773722657>

Benfey P., Ren L., Chua N.-H. The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns // EMBO J. – 1989. – Vol. 8. – P. 2195–2202. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08342.x>

Benfey P.N., Chua N.-H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants // Science. – 1990. – Vol. 250(4983). – P. 959–966. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.959>

Berti M., Pinto M. Expression of early light induced protein in grapevine and pea, under different conditions and its relation with photoinhibition // Chilean J Agric Res. – 2012. – Vol. 72(3). – P. 371–378. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392012000300011>

Bhat D., Anjanasree K., Lenka S., Bansal K. Isolation and characterization of fruitspecific promoters ACS4 and EXP1 from tomato (*Solanum lycopersicum* L) // J Plant Biochem Biotechnol. – 2010. – Vol. 19. – P. 51–57. <https://doi.org/10.1007/BF03323435>

Bhullar S., Chakravarthy S., Advani S., Datta S., Pental D., Burma P.K. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: cis-elements in a novel dna context versus domain swapping // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 132(2). – P. 988–998. <https://doi.org/10.1104/pp.103.020602>

Bianchetti R., Lira B.S., Monteiro S.S., Demarco D., Purgatto E., Rothan C., Rossi M., Freschi L. Fruit-localized phytochromes regulate plastid biogenesis, starch synthesis, and carotenoid metabolism in tomato // *J Exp Bot.* – 2018. – Vol. 69(15). – P. 3573–3586. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery145>

Binyamin L., Falah M.S., Portnoy V., Soudry E., Gepstein S. The early light-induced protein is also produced during leaf senescence of *Nicotiana tabacum* // *Planta.* – 2001. – Vol. 212. – P. 591–597. <https://doi.org/10.1007/s004250000423>

Bird C., Smith C., Ray J., Moureau P., Bevan M., Bird A., Hughes S., Morris P., Grierson D., Schuch W. The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants // *Plant Mol Biol* – 1988. – Vol. 11. – P. 651–662. <https://doi.org/10.1007/BF00017465>

Blume B., Grierson D. Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli // *Plant J* – 1997. – Vol. 12. – P. 731–746. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12040731.x>

Bojsen K., Donaldson I., Haldrup A., Joersboe M., Kreiberg J.D., Nielsen J., Okkels F.T., Petersen S.B., (inventors). Man or xylose based positive selection. June 16, 1998. United States Patent No. 5767378.

Boscariol R. L., Almeida, Derbyshire, Mourjo Filho, Mendes. The use of the PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (*Citrus sinensis* L. Osbeck) // *Plant Cell Rep.* – 2003. – Vol. 22. – P. 122–128. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0654-1>

Bruno A.K., Wetzl C.M. The early light-inducible protein (ELIP) gene is expressed during the chloroplast-to-chromoplast transition in ripening tomato fruit // *J Exp Bot.* – 2004. – Vol. 55. – P. 2541–2548. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh273>

Cordes S., Deikman J., Margossian L., Fischer R. Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato // *The Plant Cell.* – 1989. – Vol. 1. – P. 1025–1034. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.10.1025>

Coupe S., Deikman J. Characterization of a DNA-binding protein that interacts

with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes // *Plant J.* – 1997. – Vol. 11(6). – P. 1207–1218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061207.x>

Court of the European Union. Press Release No. 111/18, 25 July 2018. Judgment in case C-528/16. URL: <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>

Cronshagen U., Herzfeld F. Distribution of the early lightinducible protein in the thylakoids of developing pea chloroplasts // *Eur J Biochem.* – 1990. – Vol. 193(2). – P. 361–366. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19347.x>

Dai S., Carcamo R., Zhang Z., Chen S., Beachy R.N. The bacterial cytosine deaminase gene used as a conditional negative selection marker in transgenic rice plants // *Plant Cell Rep.* – 2001. – Vol. 20. – P. 738–743. <https://doi.org/10.1007/s002990100390>

Dale E.C., Ow D.W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1991. – Vol. 88. – P. 10558–10562. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.23.10558>

Daley M., Knauf V.C., Summerfelt K.R., Turner J.C. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for Marker-free transgenics producing marker-free transgenic plants // *Plant Cell Rep.* – 1998. – Vol. 19. – P. 489–496. <https://doi.org/10.1007/s002990050430>

Davuluri G.R., van Tuinen A., Mustilli A.C., Manfredonia A., Newman R., Burgess D., Brummell D.A., King S.R., Palys J., Uhlig J., Pennings H.M., Bowler C. Manipulation of DET1 expression in tomato results in photomorphogenic phenotype caused by post-transcriptional gene silencing // *Plant J.* – 2004. – Vol. 40. – P. 344–354. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02218.x>

Deikman J., Kline R., Fischer R.L. Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*) // *Plant Physiol.* – 1992. – Vol. 100(4). – P. 2013–2017. <https://doi.org/10.1104/pp.100.4.2013>

Deikman J., Xu R., Kneissl M.L., Ciardi J.A., Kim K., Pelah D. Separation of cis elements responsive to ethylene, fruit development, and ripening in the 5'-flanking

region of the ripening-related E8 gene // *Plant Mol Biol.* – 1998. – Vol. 37. – P. 1001–1011. <https://doi.org/10.1023/A:1006091928367>

Dellapenna D., Lincoln J.E., Fischer R.L., Bennett A.B. Transcriptional analysis of polygalacturonase and other ripening associated genes in rutgers, rin, nor, and Nr tomato fruit // *Plant Physiol.* – 1989. – Vol. 90. – P. 1372–1377. <https://doi.org/10.1104/pp.90.4.1372>

Depicker A., Herman L., Jacobs A. Schell J., Montagu M.V. Frequencies of simultaneous transformation with different T-DNAs and their relevance to the *Agrobacterium*/plant cell interaction // *Molec Gen Genet.* – 1985. – Vol. 201(477). <https://doi.org/10.1007/BF00331342>

Dey P.M. Biochemistry of  $\alpha$ -D-galactosidic linkages in the plant kingdom. In: Tipson R.S. and Horton D. (eds), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry.* – 1980. – Vol. 37. Academic Press, New York, USA, P. 342–345. [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60023-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60023-2)

Dolgov S.V., Lebedev V.G., Firsov F.P. Pear fruit taste modification by thaumatin ii gene expression // *Acta Hortic.* – 2011. – Vol. 909. – P. 67–73. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2011.909.5>

Dolgov S.V., Schestibratov K.A., Mikhailov R.V. Apple transformation with the gene of supersweet protein thaumatin II // *Acta Hortic.* – 2004. – Vol. 663. – P. 507–510. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.663.90>

Dutt M., Dhekney S.A., Soriano L.D., Kandel R., Grosser J.W. Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops // *Horticulture Research.* – 2014. – Vol. 1(14047). <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.47>

Ebinuma H., Komamine A. MAT (multi-auto-transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants // *In Vitro Cell. Del. Biol. Plant.* – 2001. – Vol. 37. – P. 103–113. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0021-2>

Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga, E., Yamakado, M. Selection of markerfree transgenic plants using the isopentenyl transferase gene as a selectable marker // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94. – P. 2117–2121.

<https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2117>

Edens L., Heslinga L., Klok R., Ledebouer A.M., Maat J., Toonen M.Y., Visser C., Verrips C.T. Cloning of cDNA encoding the sweet-tasting plant protein thaumatin and its expression in *Escherichia coli* // *Gene*. – 1982. – Vol. 18(1). – P. 1–12. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(82\)90050-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(82)90050-6)

Endo S, Kasahara T, Sugita K, Matsunaga E, Ebinuma H. The isopentenyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SRI) // *Plant Cell Rep.* – 2001 – Vol. 20. – P. 60–66. <https://doi.org/10.1007/s002990000279>

Erb I., Gonzalez-Vallinas J., Bussotti G., Blanco E., Eyraes E., Notredame C. Use of ChIP-Seq data for the design of a multiple promoter-alignment method // *Nucleic Acids Res.* – 2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1292>

Erikson O., Hertzberg M., Nasholm T. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants // *Nat Biotechnol.* – 2004. – Vol. 22. – P. 455–458. <https://doi.org/10.1038/nbt946>

Estornell L.H., Orzaez D., Lopez-Pena L., Pineda B., Anton M.T., Moreno V., Granell A. A multisite gateway-based toolkit for targeted gene expression and hairpin RNA silencing in tomato fruits // *Plant Biotechnol J.* – 2009. – Vol. 7(3). – P. 298–309. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00402.x>

Fang R.-X., Nagy F., Sivasubramaniam S., Chua N.-H. Multiple cis regulatory elements for maximal expression of the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transgenic plants // *Plant Cell.* – 1989. – Vol. 1. – P. 141–150. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.1.141>

Firek S., Ozcan S., Warner S., Draper J. A wound-induced promoter during npt-II expression limited to dedifferentiated cells at wound sites is sufficient to allow selection of transgenic shoots // *Plant Mol Biol.* – 1993. – Vol. 22. – P. 129–142. <https://doi.org/10.1007/bf00039001>

Firsov A.P., Pushin A.S., Dolgov S.V. Transgenic plants as producers of supersweet protein thaumatin II. In: Merillon J.M., Ramawat K. (eds) / *Sweeteners. Reference Series in Phytochemistry.* Springer, Cham. – 2018. – P. 185–209.



[https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_11)

Firsov A.P., Pushin A.S., Korneeva I.V., Dolgov S.V. Transgenic tomato plants as supersweet protein thaumatin II producers // *Appl Biochem Microbiol.* – 2012. – Vol. 48. – P.746–751. <https://doi.org/10.1134/S0003683812090025>

Fleming A., Mandel T., Roth I., Kuhlemeier C. The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem // *Plant Cell.* – 1993. – Vol. 5. – P. 297–309. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.3.297>

Floss D.M., Falkenburg D., Conrad U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview // *Transgenic Res.* – 2007. – Vol. 16. – P. 315–332. <https://doi.org/10.1007/s11248-007-9095-x>

Fromm M., Taylor L., Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – Vol. 82. – P. 5824–5828. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.17.5824>

Gao L., Gonda I., Sun H., Ma Q., Bao K., Tieman D.M., Burzynski-Chang E.A., Fish T.L., Stromberg K.A., Sacks G.L., Thannhauser T.W., Foolad M.R., Diez M.J., Blanca J., Canizares J., Xu Y., van der Knaap E., Huang S., Klee H.J., Giovannoni J.J., Fei Z. The tomato pan-genome uncovers new genes and a rare allele regulating fruit flavor // *Nat Genet.* – 2019. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0410-2>

Garcia-Almeida J.M., Cornejo-Pareja I.M., Munoz-Garach A., Gomez-Perez A., Garcia-Aleman J. Sweeteners: regulatory aspects. In: Merillon J.M., Ramawat K. (eds) / *Sweeteners. Reference Series in Phytochemistry.* Springer, Cham. – 2018. – P. 613–642. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-27027-2_12)

Gaskell G., Stares S., Allansdottir A., Allum N., Corchero C., Fischler C., et al. *Europeans and Biotechnology in 2010: Winds of Change? – A report to the European Commission's Directorate-General for Research.* Brussels: European Commission. – 2013.

Gatz C., Froberg C., Wendenburg R. Stringent repression and homogenous de-repression of tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants // *Plant J.* – 1992. – Vol. 2. – P. 397–404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1992.t01-37-00999.x>

Gittins J.R., Pellny T.K., Hiles E.R., Rosa C., Biricolti S., James D.J. Transgene expression driven by heterologous ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* Mill.) // *Planta*. – 2000. – Vol. 210. – P. 232–240. <https://doi.org/10.1007/PL00008130>

Gleave A.P., Mitra D.S., Mudge S., Morris B.A. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of Cre recombinase and use of the conditional lethal dominant gene // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – Vol. 40. – P. 223–235. <https://doi.org/10.1023/A:1006184221051>

Goldsbrough A.P., Albrecht H., Stratford R. Salicylic acid-inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes // *Plant J.* – 1993. – V.3. – P. 563–571. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1993.03040563.x>

Goldsbrough A.P., Lastrella C.N., Yoder J.I. Transposition-mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomatoes // *Biotechnology*. – 1993. – Vol. 11. – P. 1286–1292. <https://doi.org/10.1038/nbt1193-1286>

Good X., Kellogg A.J., Wagoner W., Langhoff D., Matsumura W., Bestwick R. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase // *Plant Mol Biol.* – 1994. – Vol. 26. – P. 781–790. <https://doi.org/10.1007/BF00028848>

Gowik U., Burscheidt J., Akyildiz M., Schlue U., Koczor M., Streubel M., Westhoff P. Cis-regulatory elements for mesophyll-specific gene expression in the C4 plant *Flaveria trinervia*, the promoter of the C4 phosphoenolpyruvate carboxylase gene // *Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16(5). – P. 1077–1090. <https://doi.org/10.1105/tpc.019729>

Grimm B., Kloppstech K. The early light-inducible proteins of barley. Characterization of two families of 2-h-specific nuclear-coded chloroplast proteins // *Eur J Biochem.* – 1987. – Vol. 167(3). – P. 493–499. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13364.x>

Guilley H., Dudley R., Jonard G., Balazs E., Richards K. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter sequences and characterization of

transcripts // Cell. – 1982. – Vol. 30. – P. 763–773. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90281-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90281-1)

Haldrup A., Petersen S., Okkels F. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 18. – P. 76–81. <https://doi.org/10.1007/s002990050535>

Haseloff J., Amos B. GFP in plants // Trends Genet. – 1995. – Vol .11. – P. 328–329. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(95\)90186-8](https://doi.org/10.1016/0168-9525(95)90186-8)

Hatorangan M.R., Sentausa E., Wijaya G.Y. In silico identification of cis-regulatory elements of phosphate transporter genes in rice (*Oryza sativa* L.) // Journal of Crop Science and Biotechnology. – 2008. – Vol. 12. – P. 25–30. <https://doi.org/10.1007/s12892-008-0054-8>

Haverkort A. J., Boonekamp P., Hutten R., Jacobsen E., Lotz B., Kessel G., Vossen J.H., Visser R.G. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh project // Potato Research. – 2016. – Vol. 59. – P. 35–66. <https://doi.org/10.1007/s11540-015-9312-6>

Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., Korenaga T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999 // Nucleic Acids Res. – 1999. – Vol. 27(1). – P. 297–300. <https://doi.org/10.1093/nar/27.1.297>

Holtorf S., Apel K., Bohlmann H. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana* // Plant Mol Biol. – 1995. – Vol. 29. – P. 637–646. <https://doi.org/10.1007/BF00041155>

Huang Y-X., Yin Y-G., Sanuki A., Fukuda N., Ezura H., Matsukura C. Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) deficiency affects the germination, growth and fruit sugar content in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) // Plant Physiol Biochem. – 2015. – Vol. 96. – P. 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.08.021>

Itzhaki H., Maxson J.M., Woodson W.R. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene // Proc Natl Acad Sci USA. – 1994. – Vol. 91(19). – P. 8925–8929. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8925>

Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6(13). – P. 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>

Jiang X., He Z., Peng Z., Qi Y., Chen Q.Y., Yu S. Cholera toxin B protein in transgenic tomato fruit induces systemic immune response in mice // *Transgenic Res.* – 2006. – Vol. 16. – P. 169–175. <https://doi.org/10.1007/s11248-006-9023-5>

Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S., Brunstedt J., Okkels F. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet // *Mol Breed.* – 1998. – Vol. 4. – P. 111–117. <https://doi.org/10.1023/A:1009633809610>

Joersbo M., Okkels F.T. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection // *Plant Cell Rep.* – 1996. – Vol. 16. – P. 219–221. <https://doi.org/10.1007/BF01890871>

Kamle M., Kumar P., Patra J. K., Bajpai V. K. Current perspectives on genetically modified crops and detection methods // *3 Biotech.* – 2017. – Vol. 7(219). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0809-3>

Khan R.S., Nakamura I., Mii M. Development of disease-resistant marker-free tomato by R/RS site-specific recombination // *Plant Cell Rep.* – 2011. – Vol. 30(6). – P. 1041–1053. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1011-4>

Kim H., Youm J., Moon K., Ha J., Kim Y.H., Joung H., Jeon J. Expression analysis of human  $\beta$ -secretase in transgenic tomato fruits // *Protein Expression Purif.* – 2012. – Vol. 82(1). – P. 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.11.012>

Klee H. Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis // *Plant Physiol.* 1993. – Vol. 102. – P. 911–916. <https://doi.org/10.1104/pp.102.3.911>

Kohli A., Griffiths S.G., Palacios N.I., Twyman R.M., Vain P., Laurie D.A., Christou P.N. Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination // *Plant J.* – 1999. – Vol. 17(6). – P. 591–601. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00399.x>

Krasnyanski S.F., Sandhu J.S., Domier L.L., Buetow D.E., Korban S.S. Effect of

an enhanced CaMV 35S promoter and a fruit-specific promoter on *uidA* gene expression in transgenic tomato plants // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. – 2001. – Vol. 37. – P. 427–433. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0075-1>

Krens F.A., Joshi S.G., Tinnenbroek-Capel I.E.M., Kodde L., Schaart J.G. Genome stability after gene pyramiding using the pMF marker-free vector system. International Horticultural Congress. Lisbon (Portugal), August, 22–27. Abstracts book. – 2010. – P. 286.

Krens F.A., Schaart J.G., van der Burgh A.M., Tinnenbroek-Capel I.E., Groenwold R., Kodde L.P., Broggin G.A., Gessler C., Schouten H.J. Cisgenic apple trees: development, characterization, and performance // *Front Plant Sci*. – 2015. – 6:286. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00286>

Kuhlemeier C., Strittmatter G., Ward K., Chua N.H. The Pea *rbcS-3A* promoter mediates light responsiveness but not organ specificity // *Plant Cell*. – 1989. – Vol. 1(4). – P. 471–478. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.4.471>

Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons // *Annu Rev Genet*. – 1999. – Vol. 33. – P. 479–532. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.33.1.479>

Kunkel T., Niu Q.-W., Chan Y.-S., Chua N.-H. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation // *Nat. Biotechnol*. – 1999. – Vol. 17. – P. 916–919. <https://doi.org/10.1038/12914>

Kunze I., Ebneith M., Heim U., Geiger M., Sonnewald U., Herbers K. 2-Deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation. *Mol. Breed*. – 2001. – Vol. 7. – P. 221–227. <https://doi.org/10.1023/A:1011307508252>

Kurokawa N., Hirai T., Takayama M., Hiwasa-Tanase K., Ezura H. An E8 promoter-HSP terminator cassette promotes the high-level accumulation of recombinant protein predominantly in transgenic tomato fruits: a case study of miraculin // *Plant Cell Rep*. – 2013. – Vol. 32. – P. 529–536. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1384-7>

Lam E., Benfey P., Chua N.-H. Characterization of A factor binding site on the 35S promoter of cauliflower mosaic virus. In *Plant Gene Transfer: UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series*, C. Lamb and R. Beachy, eds New York: Academic Press. – 1989.

Lam E.J., Chua N.H. ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters // *Plant Cell* 1989. – Vol. 1(12). – P. 1147–1156. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.12.1147>

Lawton M.A., Tierney M.A., Nakamura I., Anderson E., Komeda Y., Dube P., Hoffman N., Fraley R.T., Beachy R.N. Expression of a soybean  $\beta$ -conglycinin gene under the control of the Cauliflower Mosaic Virus 35S and 19S promoters in transformed petunia tissues // *Plant Mol Biol.* – 1987. – Vol. 9315. <https://doi.org/10.1007/BF00014906>

Lazo G.R., Stein P.A., Ludwig R. A DNA transformation-competent arabidopsis genomic library in *Agrobacterium* // *Biotechnology (NY)*. – 1991. – Vol. 9. – P. 963–967. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-963>

Lebedev V.G., Taran S.A., Shmatchenko V.V., Dolgov S.V. Pear transformation with the gene for supersweet protein thaumatin II // *Acta Hort.* – 2002. – Vol. 596. – P. 199–202. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.596.27>

Leisner S., Gelvin S. Structure of the octopine synthase upstream activator sequence // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1988. – Vol. 85. – P. 2553–2557. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.2553>.

Lescot M., Dehais P., Thijs G., Marchal K., Moreau Y., Peer Y.V., Rouze P., Rombauts S. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – Vol. 30(1). – P. 325–327. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.325>

Li J., Yuan J., Li M. Characterization of putative cis-regulatory elements in genes preferentially expressed in *Arabidopsis* male meiocytes // *BioMed research international*. – 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/708364>

Li Y., Hagen G., Guilfoyle T. An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradients during tropisms // *Plant Cell*. – 1991. – Vol. 3. – P. 1167–1175. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.11.1167>

Lincoln J.E., Cordes S., Read E., Fischer R.L. Regulation of gene expression by ethylene during *Lycopersicon esculentum* (tomato) fruit development // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1987. – Vol. 84. – P. 2793–2797. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.9.2793>

Lincoln J.E., Fischer R.L. Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression // *Mol Gen Genet.* – 1988. – Vol. 212. – P. 71–75. <https://doi.org/10.1007/BF00322446>

Livak K., Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{\Delta\Delta C_T}$  method // *Methods.* – 2001. – Vol. 25(4). – P. 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Llorens C., Futami R., Covelli L., Domínguez-Escriba L., Viu J.M., Tamarit D., Aguilar-Rodriguez J., Vicente-Ripolles M., Fuster G., Bernet G.P., Maumus F., Fuentes A.M., Sempere J.M., Latorre A., Moya A. The Gypsy Database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0 // *Nucleic Acids Res.* – 2011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1061>

Lou X., Yao Q., Zhang Z., Peng R., Xiong A., Wang H. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants // *Clin Vaccine Immunol.* – 2007. – Vol. 14(4). – P. 464–469. <https://doi.org/10.1128/CVI.00321-06>

Lyznik L.A., Rao K.V., Hodges T.K. Flp-mediated recombination of FRT sites in the maize genome // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – Vol. 24. – P. 3784–3789. <https://doi.org/10.1093/nar/24.19.3784>

Ma B., Chen J., Zheng H., Fang T., Ogutu C., Li S., Han Y., Wu B. Comparative assessment of sugar and malic acid composition in cultivated and wild apples // *Food Chemistry.* – 2015. – Vol. 172. – P. 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.032>

Ma B.G., Duan X.Y., Niu J.X., Ma C., Hao Q.N., Zhang L.X., Zhang H.P. Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible Cre/loxP recombination system with self-excision of selectable marker // *Biotechnol Lett.* – 2008. – Vol. 31(1). – P. 163–169. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9843-x>

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / Cold Spring Harbor, New York. – 1982.

Manzara T., Carrasco P., Gruissem W. Developmental and organ-specific changes in promoter DNA-protein interactions in the tomato *rbcS* gene family // *Plant Cell.* – 1991. – Vol. 3(12). – P. 1305–1316. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.12.1305>.

McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1950. – V. 36. – P. 344–355

McCormick S., Niedermeyer J.G., Fry J.E., Barnason A., Horsch R., Fraley R. Leaf disc transformation of cultivated tomato (*L. esculentum*) using *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Cell Reports. – 1986. – Vol. 5. – P. 81–84. <https://doi.org/10.1007/BF00269239>

Meisel L., Fonseca B., Gonzalez S., Baezayates R., Cambiazo V., Campos R., Gonzalez M., Orellana A., Retamales J., Silva H. A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses // Biol Res. – 2005. – Vol. 38. – P. 83–88. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602005000100010>

Meyer G., Kloppstech K. A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear DNA // Eur J Biochem. – 1984. – Vol. 138(1) – P. 201–207. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb07900.x>

Meyer P.W., Saedler H. Homology-dependent gene silencing in plants // Annual review of plant physiology and plant molecular biology. – 1996. – Vol. 47. – P. 23–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.47.1.23>

Montgomery J.M., Pollard V., Deikman J., Fischer R.L. Positive and negative regulatory regions control the spatial distribution of polygalacturonase transcription in tomato fruit pericarp // Plant Cell. – 1993. – Vol. 5(9). – P. 1049–1062. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.9.1049>

Moore I., Galweiler L., Grosskopf D., Schell J., Palme K. A transcription activation system for regulated gene expression in transgenic plants // Proc Natl Acad Sci USA. – 1998. – Vol. 95. – P. 376–381. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.376>

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497 <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nairn M., Dukan E., Zehavi U., Yaron L. The water-sweet aftertaste of neohesperidin dihydrochalcone and thaumatin as a method for determining their sweet persistence // Chem Senses. – 1986. – Vol. 11. – P. 361–370



<https://doi.org/10.1093/chemse/11.3.361>

Negrotto D., Jolley M., Beer S., Wenck A., Hansen G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation // *Plant Cell Rep.* – 2000. – Vol. 19. – P. 798–803. <https://doi.org/10.1007/s002999900187>

Neumann P., Pozarkova D., Macas J. Highly abundant pea LTR retrotransposon Ogre is constitutively transcribed and partially spliced // *Plant Mol Biol.* – 2003. – Vol. 53. – P. 399–410. <https://doi.org/10.1023/B:PLAN.00000006945.77043.ce>

Nicholass F.J., Smith C.S., Schuch W.W., Bird C.R., Grierson D. High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions // *Plant Mol Biol.* – 1995. – Vol. 28. – P. 423–435. <https://doi.org/10.1007/BF00020391>

Nikoleli G., Nikolelis D. Low calorie nonnutritive sweeteners. – 2012. – P. 79–118. <https://doi.org/10.1201/b12065-5>

Noren H., Svensson P., Stegmark R., Funk C., Adamska I., Andersson B. Expression of the early light-induced protein but not the PsbS protein is influenced by low temperature and depends on the developmental stage of the plant in field-grown pea cultivars // *Plant Cell Environ.* – 2003. – 26(2). – P. 245–253. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00954.x>

O'Brien-Nabors. Alternative sweeteners: an overview, in: L. O'Brien Nabors (ed.), *alternative sweeteners* / Marcel Dekker, New York. – 2011. – P. 1–10.

Odell J.T., Nagy F., Chua N. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter // *Nature.* – 1985. – Vol. 313. – P. 810–812. <https://doi.org/10.1038/313810a0>

Odell J-T., Knowlton L., Mauvais C. Properties of an isolated transcription stimulating sequence derived from the cauliflower mosaic virus 35S promoter // *Plant Mol. Biol.* – 1988. – Vol. 10. – P. 263–273. <https://doi.org/10.1007/BF00027403>

Oeller P., Min-Wong L., Taylor L., Pike D., Theologis A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA // *Science.* – 1991. – Vol. 54. – P. 437–439. <https://doi.org/10.1126/science.1925603>

Okkels F., Ward J., Joersbo M. Synthesis of cytokinin glucuronides for the selection of transgenic plant cells // *Phytochemistry*. – 1997. – Vol. 46. – P. 801–804. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(97\)00373-7](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(97)00373-7)

On-Lee T., Turgeon R., Wu R. Expression of a foreign gene linked to either a plant-virus or a *Drosophila* promoter, after electroporation of protoplasts of rice, wheat, and sorghum // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1986. – Vol. 83. – P. 6815–6819. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.18.6815>

Onouchi H., Nishihama R., Kudo M., Machida Y., Machida C. Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana* // *Mol Gen Genet*. – 1995. – Vol. 247. – P. 653–660. <https://doi.org/10.1007/BF00290396>

Outchkourov N., Peters J., de Jong J., Rademakers W., Jongsma M. The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants // *Planta*. – 2003. – Vol. 216. – P. 1003–1012. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0953-8>

Pandey R., Gupta A., Chowdhary A., Pal R.K., Rajam M.V. Over-expression of mouse ornithine decarboxylase gene under the control of fruit-specific promoter enhances fruit quality in tomato // *Plant Mol Biol*. – 2014. – Vol. 87(3). – P. 249–260. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0273-y>

Park H., Denbow C.J., Cramer C.L. Structure and nucleotide sequence of tomato HMG2 encoding 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase // *Plant Mol Biol*. – 1992. – Vol. 20. – P. 327–331. <https://doi.org/10.1007/BF00014502>

Parkinson R., Owen N., Dale P. The expression of transgenes in plants: a review of gene promoters in current use. John Innes Centre, Norwich. Review prepared as a Special Investigation Project (N 2661) for the Ministry of Agriculture / Fisheries and Food, Food Science Divisions. – 1995. – London.

Paz R.C., Kozaczek M.E., Rosli H.G., Andino N.D., Sanchez-Puerta M.V. Diversity, distribution and dynamics of full-length Copia and Gypsy LTR retroelements in *Solanum lycopersicum* // *Genetica*. – 2017. – Vol. 145. – P. 417–430. <https://doi.org/10.1007/s10709-017-9977-7>

Perini P., Pasquali G., Margis-Pinheiro M., De O., Revers, L. Reference genes for transcriptional analysis of flowering and fruit ripening stages in apple (*Malus × domestica* Borkh.) // Molecular Breeding. – 2014. – Vol. 34. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0078-3>

Picton S., Barton S., Bouzayen M., Hamilton A., Grierson D. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene // The Plant J. – 1993. – Vol. 3. – P. 469–481. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00167.x>

Popowich E.A., Firsov A.P., Mitiouchkina T.Y., Filipenya V.L., Dolgov S.V., Reshetnikov V.N. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Hyacinthus orientalis* with thaumatin II gene to control fungal diseases // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2007. – Vol. 90. – P. 237–244. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9254-z>

Quorin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de prunus // Acta Hortic. – 1977. – Vol. 78. – P. 437–442. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1977.78.54>

Rajam M.V., Chandola N., Saiprasad Goud P., Singh D., Kashyap V., Choudhary M.L., Sihachakr D. Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants // Biol Plant. – 2007. – Vol. 51. – P. 135–141. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0026-8>

Ramirez Y.J., Tasciotti E., Gutierrez-Ortega A., Torres A.J., Flores M.T., Giacca M., Lim M.A. Fruit-specific expression of the human immunodeficiency virus type 1 tat gene in tomato plants and its immunogenic potential in mice // Clin Vaccine Immunol. – 2007. – Vol. 14(6). – P. 685–692. <https://doi.org/10.1128/CVI.00028-07>

Reese M.G. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome // Comput Chem. – 2001. – Vol. 26(1). – P. 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0097-8485\(01\)00099-7](https://doi.org/10.1016/S0097-8485(01)00099-7)

Righetti L., Djennane S., Berthelot P., Cournol N., Wilmot K., Loridon E., Vergne E., Chevreau E. Elimination of the *nptII* marker gene in transgenic apple and pear with a chemically inducible R/Rs recombinase // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2014. – Vol. 117. – P. 335–348. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0443-2>

Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. D1 In: Plant Molecular Biology Manual, Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A., eds / Kluwer Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. 1994. – Vol. 10. – P. 1–8. [https://doi.org/1007/978-94-011-0511-8\\_12](https://doi.org/1007/978-94-011-0511-8_12)

Rottman W., Peter G., Oeller P., Keller J., Shen N., Nagy B., Taylor L., Campbell A., Theologis A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence // J Mol Biol. – 1991. – Vol. 222. – P. 937–961. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90587-v](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90587-v)

Sagor G.H.M., Berberich T., Tanaka S., Nishiyama M., Kanayama Y., Kojima S., Kusano T. A novel strategy to produce sweeter tomato fruits with high sugar contents by fruit-specific expression of a single *bZIP* transcription factor gene // Plant Biotechnol J. – 2015. – Vol. 14(4). – P. 1116–1126. <https://doi.org/10.1111/pbi.12480>

Salter M., Paine J., Riddell K., Jepson I., Greenland A., Caddick M., Tomsett A. Characterization of the ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants // Plant J. – 1998. – Vol. 16. – P. 127–132. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00281.x>

Sanger M., Daubert S., Goodman R.M. Characteristics of a strong promoter from figwort mosaic virus: comparison with the analogous 35S promoter from cauliflower mosaic virus and the regulated mannopine synthase promoter // Plant Mol Biol. – 1990. – Vol. 14(433). <https://doi.org/10.1007/BF00028779>

Santino C., Stanford G., Conner T. Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes // Plant Mol Biol. – 1997. – Vol. 33. – P. 405–416. <https://doi.org/10.1023/A:1005738910743>

Schaart J.G., Krens F.A., Pelgrom K.T.B., Mendes O., Rouwendal G.J.A. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene // Plant Biotechnol J. – 2004. – Vol. 2. – P. 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2004.00067.x>

Schaart J.G., Tinnenbroek I.E.M., Krens F. Isolation and characterization of strong gene regulatory sequences from apple, *Malus × domestica* // Tree Genet Genomes. – 2011. – Vol. 7. – P. 135–142. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0320-z>

Schestibratov K.A., Dolgov S.V. Transgenic strawberry plants expressing a thaumatin II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea* // *Sci Hortic.* – 2005. – Vol. 106. – P. 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.03.016>

Schlaman H.R.M., Hooykaas P.J.J. Effectiveness of the bacterial gene *codA* encoding cytosine deaminase as a negative selectable marker in *Agrobacterium*-mediated plant transformation // *Plant J.* – 1997. – Vol. 11. – P. 1377–1385. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061377.x>

Scientific Opinion on the safety of the extension of use of thaumatin (E 957) // *EFSA J.* – 2015. – Vol. 13(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4290>

Scutt C.P., Zubko E., Meyer P. Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants // *Biochimie.* – 2002. – V.84(11). – P. 1119–1126. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)00021-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)00021-4)

Sharma N., Russell S.D., Bhalla P.L., Singh M.B. Putative cis-regulatory elements in genes highly expressed in rice sperm cells // *BMC Research Notes.* – 2011. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-319>

Sheehy R., Pearson J., Brady C., Hiatt W. Molecular characterization of tomato fruit polygalacturonase // *Mol Gen Genet.* 1987. – Vol. 208. – P. 30–36. <https://doi.org/10.1007/BF00330418>

Sidorova T., Mikhailov R., Pushin A., Miroshnichenko D., Dolgov S. A non-antibiotic selection strategy uses the phosphomannose-isomerase (PMI) gene and green fluorescent protein (GFP) gene for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Prunus domestica* L. leaf explants // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2017. – Vol. 128. – P. 197–209. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1100-8>

Sidorova T., Miroshnichenko D., Dolgov S., Tjukavin G. Transgenic carrot expressing thaumatin II gene has enhanced resistance against *Fusarium avenaceum* // *Acta Hortic.* – 2013. – Vol. 974. – P. 123–130. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2013.974.14>

Sitrit Y., Bennett A. Regulation of tomato fruit polygalacturonase mRNA accumulation by ethylene: a reexamination // *Plant Physiol.* – 1998. – Vol. 116. – P. 1145–1150. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.1145>

Sommer S., Siebert M., Bechtold A., Heide L. Specific induction of secondary

product formation in transgenic plant cell cultures using an inducible promoter // *Plant Cell Rep.* – 1998. – Vol. 17. – P. 891–896. <https://doi.org/10.1007/s002990050504>

Stein J., Hansen G. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cell // *Plant Physiol.* – 1999. – Vol. 121. – P. 1–9. <https://doi.org/10.1104/pp.121.1.71>

Sugita K., Kasahara T., Matsunaga E., Ebinuma H. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency // *Plant J.* – 2000. – Vol. 22. – P. 461–469. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00745.x>

Sugita K., Matsunaga E., Ebinuma H. Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing // *Plant Cell Rep.* – 1999. – Vol. 18. – P. 941–947. <https://doi.org/10.1007/s002990050688>

Suoniemi A., Narvanto A., Schulman A.H. The BARE-1 retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays // *Plant Mol Biol.* – 1996. – Vol. 31. – P. 295–306. <https://doi.org/10.1007/BF00021791>

Szwacka M., Burza W., Zawirska-Wojtasiak R., Goslinski M., Twardowska A., Gajc-Wolska J., Kosieradzka I., Kielkiewicz M. Genetically modified crops expressing 35S-thaumatococcus ii transgene: sensory properties and food safety aspects // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2012. – Vol. 11. – P. 174v186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00178.x>.

Szwacka M., Morawski M., Burza W. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cucumber transformation with thaumatin II cDNA // *J Appl Genet.* – 1996. – Vol. 37A. – P. 126–129.

Taha R.S., Ismail I.B., Zainal Z., Abdullah S.N. The stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase promoter (Des) from oil palm confers fruit-specific GUS expression in transgenic tomato // *J Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 169(13). – P. 1290–1300. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.001>

Tam S.C., Causse M.B., Garchery C., Burck H., Mhiri C., Grandbastien M. The distribution of copia-type retrotransposons and the evolutionary history of tomato and related wild species // *J Evol Biol.* – 2007. – Vol. 20(3). – P. 1056–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01293.x>

Theologis A., Oeller P.W., Wong L.M., Rottmann W.H., Gantz D.M. Use of a tomato mutant constructed with reverse genetics to study fruit ripening, a complex developmental process // *Dev Genet.* – 1993. – Vol. 14. – P. 282–295. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020140406>

Thomas C.M., Jones J. Molecular analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration in tomato reveals a role for left border sequence homology in most integration events // *Mol Genet Genomics.* – 2007. – Vol. 278. – P. 411–420. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0259-4>

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 <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03227-x>

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. <https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01703-6>

van der Wel H., Loeve K. Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth // *Eur J Biochem.* – 1972. – Vol. 31. – P. 221–215. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb02522.x>

Van Haaren M.J., Houck C.M. Strong negative and positive regulatory elements contribute to the high-level fruit-specific expression of the tomato 2A11 gene // *Plant Mol Biol.* – 1991. – Vol. 17. – P. 615–630. <https://doi.org/10.1007/BF00037048>

Vanblaere T., Szankowski I., Schaart J., Schouten H., Flachowsky H., Broggin G.A., Gessler C. The development of a cisgenic apple plant // *J Biotechnol.* – 2011. – Vol. 154(4). – P. 304–311 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.05.013>

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes // *Genome Biology.* – 2002. – Vol. 3(7). <https://doi.org/research0034.1-research0034.11>

Vigers A., Wiedemann S.K., Roberts W., Legrand M., Selitrennikoff C., Fritig B. Thaumatin-like proteins are antifungal // *Plant Sci.* – 1992. – Vol. 83. – P. 155–161. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90074-V](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90074-V)

Vitha S., Benes K., Michalova M., Ondrej M. Quantitative  $\beta$ -glucuronidase assay in transgenic plants // *Biologia Plantarum.* – 1993. – Vol. 35. – P. 151–155. <https://doi.org/10.1007/BF02921141>

Wang A., Evans R., Altendorf P., Hanten J., Doyle M., Rosichan J. A mannose selection system for production of fertile transgenic maize plants from protoplasts // *Plant Cell Rep.* – 2000. – Vol. 19. – P. 654–660. <https://doi.org/10.1007/s002999900181>

Wang Y., Yau Y.A., Perkins-Balding D., Thomson J.G. Recombinase technology: applications and possibilities // *Plant Cell Rep.* – 2011. – V.30. – P. 267–285. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0938-1>

Weiner H., McMichael R., Huber S. Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase *in vivo* // *Plant Physiol.* – 1992. – Vol. 99. – P. 1435–1442. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1435>

Werr W., Lorz H. Transient gene expression in a Gramineae cell line // *Molecular and General Genetics MGG.* – 1986. – Vol. 202. – P. 471–475. <https://doi.org/10.1007/BF00333279>

Wierstra I., Kloppstech K. Differential effects of methyl jasmonate on the expression of the early light-inducible proteins and other light-regulated genes in barley // *Plant Physiol.* – 2000. – Vol. 124(2). – P. 833–844. <https://doi.org/10.1104/pp.124.2.833>

Williams S., Friedrich L., Dincher S., Carozzi N., Kessmann H., Ward E., Ryals J. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expression in transgenic plants // *Biotechnology.* – 1992. – Vol. 10. – P. 540–543. <https://doi.org/10.1038/nbt0592-540>

Witty M. Preprothaumatin II is processed to biological activity in *Solanum tuberosum* // *Biotechnol Lett.* – 1990. – Vol. 12. – P. 131–136. <https://doi.org/10.1007/BF01022429>

Wright M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Reed J., Kramer C., Chang Y.,



Novitzky R., Wang H., Artin-Moore L. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker // *Plant Cell Rep.* – 2001. – Vol. 20. – P. 429–436. <https://doi.org/10.1007/s002990100318>

Xu R., Goldman S., Coupe S., Deikman J. Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative cis elements // *Plant Molecular Biology.* – 1996. – Vol. 31. – P. 1117–1127. <https://doi.org/10.1007/bf00040829>

Yanisch-Perron C.R., Vieira J.J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors // *Gene.* – 1985. – Vol. 33. – P. 103–119. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90120-9)

Yau Y.Y., Stewart C.N. Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants // *BMC Biotechnol.* – 2013. – Vol. 13(36). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-36>

Zeng Q., Chen X., Wood A.J. Two early light-inducible protein (ELIP) cDNAs from the resurrection plant *Tortula ruralis* are differentially expressed in response to desiccation, rehydration, salinity, and high light // *J Exp Bot.* – 2002. – Vol. 53(371). – P. 1197–1205. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.371.1197>

Zhang Y., Li H., Ouyang B., Lu Y., Ye Z. Chemical-induced autoexcision of selectable markers in elite tomato plants transformed with a gene conferring resistance to lepidopteran insects // *Biotechnol Lett.* – 2006. – Vol. 28(16). – P. 1247–1253. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9081-z>

Zhang Y., Liu H., Li B., Zhang J-T., Li Y., Zhang H. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the Cre/loxP DNA excision system // *Transgenic Res.* – 2009. – Vol. 18(4). – P. 607–619. <https://doi.org/10.1007/s11248-009-9251-6>

Zhao L., Lu L., Zhang L., Wang A., Wang N., Liang Z., Lu X., Tang K. Molecular evolution of the E8 promoter in tomato and some of its relative wild species // *J. Biosci.* – 2009. – Vol. 34. – P. 71–83. <https://doi.org/10.1007/s12038-009-0010-x>

Zuo J., Chua N. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes // *Curr Opin Biotechnol.* – 2000. – Vol. 11. – P. 146–151. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00073-2](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00073-2)