

УДК 577:581.6

ГЕНЕТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ МОХУ *CERATODON PURPUREUS* ЗА ДОПОМОГОЮ НОВИХ ПОЛІКАТІОННИХ НОСІЇВ ДНК

Н.С. ФІНЮК¹, А.Є. ЧАПЛЯ², Н.Є. МІТІНА³, Н.М. БОЙКО¹, О.В. ЛОБАЧЕВСЬКА²,
О.С. М'ЯГКОТА³, А.І. ЄМЕЦЬ⁴, Я.Б. БЛЮМ⁴, О.С. ЗАІЧЕНКО³, Р.С. СТОЙКА¹

¹ Інститут біології клітини НАН України, Львів

² Інститут екології Карпат НАН України, Львів

³ Національний університет «Львівська політехніка»

⁴ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

*Масштаби використання генної інженерії з метою покращення біологічних властивостей різноманітних організмів постійно зростають. Для доставки генетичного матеріалу в клітини-мішені застосовують як вірусні, так і невірусні носії. Серед останніх найбільш перспективними вважають полімерні матеріали природного і синтетичного походження. Такі полімери проявили високу ефективність у доставці ДНК в клітини тварин, проте рослинні клітини виявилися малочутливими до їхньої дії. Нами описано метод генетичної трансформації протопластів моху *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid., що базується на використанні нових поверхнево-активних полімерних носіїв контрольованої довжини та заряду, які містять ланцюги диметиламіноетилметакрилату. Цей метод дозволяє одержати більше транз'єнтних і стабільних трансформантів моху із розрахунку на мікрограм ДНК порівняно з відомим протоколом із використанням поліетиленгліколю. Він є більш простим і зручним у використанні, а також дешевшим, ніж метод «генної гармати». Розглядаються перспективи подальшого вдосконалення структури і функціональних характеристик нових носіїв для доставки генетичного матеріалу в клітини рослин.*

Ключові слова: генетична трансформація протопластів, полікатіонні носії ДНК, мох *Ceratodon purpureus*.

Вступ. Створення трансгенних рослин вже перетворилось на рутинну технологію, яка охоплює можливості доставки чужинних генів як з

експериментальною метою, так і для поліпшення генетичних характеристик багатьох сільськогосподарських культур і продукції біологічно активних речовин [1]. Чужинні гени переносять до тих чи інших видів рослин, щоб надати їм нові властивості, такі як, наприклад, покращені харчові характеристики, стійкість до патогенів та толерантність до полютантів, регуляція метаболізму і т.п. На сьогодні можливо перенести гени не лише від еволюційно віддалених видів рослин, а й навіть від вірусів, бактерій, грибів і навіть тварин.

Генетична трансформація передбачає проникнення чужинного генетичного матеріалу через рослинну клітинну стінку, що досягається за допомогою різних біологічних та фізичних методів. Відповідно, найбільш широко застосовуваною технологією доставки чужинних генів з метою експресії рекомбінантних білків стала генетична трансформація з використанням агробактерій (*Agrobacterium tumefaciens* та *A. rhizogenes*) [2]. Однак дуже часто складні патентні обмеження, пов'язані з можливостями використання *Agrobacterium* як засобу для генетичної інженерії, та загальні вимоги до отримання трансгенних рослин створюють обставини, які звужують можливості застосування цієї технології для прискорення наукових та прикладних розробок з використанням багатьох видів рослин. У зв'язку з цими обставинами продовжують ефективно розроблятися інші методи доставки генетичного матеріалу до рослинних клітин.

© Н.С. ФІНЮК, А.Є. ЧАПЛЯ, Н.Є. МІТІНА,
Н.М. БОЙКО, О.В. ЛОБАЧЕВСЬКА, О.С. М'ЯГКОТА,
А.І. ЄМЕЦЬ, Я.Б. БЛЮМ, О.С. ЗАІЧЕНКО,
Р.С. СТОЙКА, 2014

Зокрема, роботи останніх років у цьому напрямку продемонстрували, що вірусні векторні системи можуть ефективно застосовуватись для успішної транз'єнтно́ї експресії чужинних білків у трансфекованих рослинах, а також те, що інші види бактерій, а не лише агробактерії, можуть бути використані для отримання трансгенних рослин [3]. Водночас широкого застосування набули різні фізичні методи генетичної трансформації рослин, серед яких особливо слід відзначити електропорацію, бомбардування клітин наночастинками (біобалістика), вакуумну інфільтрацію, а також трансформацію з використанням ультразвуку, шоківих хвиль або вусів (whiskers) карбиду кремнію, мікро- і макроін'єкції, лазерну мікрохвильову обробку [4]. В останні роки також зростають масштаби використання з цією ж метою наночастинок [5] і нанотрубок [6].

Разом з тим для перенесення ДНК екзогенного походження (рекомбінантних плазмід) в клітини також можна використовувати нанорозмірні полімерні системи [7, 8] та їхні гібридні форми [9, 10], зокрема у цьому відношенні добре зарекомендували себе поверхнево-активні поліамфолітні носії гребенеподібної будови [11]. Відомо, що асоціація ДНК у комплекс із цими носіями та її вивільнення з них не спричиняють змін у структурі нуклеїнової кислоти, більше того, досліджувані полімерні носії захищають ДНК від її розщеплення нуклеазами [12]. Слід зазначити, що ці полімерні носії здатні також ефективно доставляти ДНК у тваринні клітини [13]. В той же час на рослинних об'єктах їхні властивості поки що не охарактеризовані. Встановлено, що полімерні носії гребенеподібної структури ефективно переносять ДНК у дріжджові клітини [14].

Оскільки в попередніх дослідженнях полімерні носії гребенеподібної будови не продемонстрували високої ефективності при використанні для генетичної трансформації рослин, у даній роботі запропоновано використати для доставки плазмідної ДНК в ці клітини нові лінійні полікатіонні полімери, які містять ланцюги диметиламіноетилметакрилату (ДМАЕМ) різної довжини у молекулах моно- та диблочної будови. Для вивчення можливостей застосування таких носіїв при трансформації рослин нашу увагу привернули мохи, які є ши-

роко вживаними модельними об'єктами серед наземних рослин для досліджень у галузі молекулярної та клітинної біології з огляду на їх еволюційне положення, просту анатомічну будову і зручність культивування *in vitro* [15–18]. Відомо також, що у життєвому циклі мохів домінує гаплоїдна гаметофітна генерація, що робить їх зручним об'єктом для дослідження [19]. Крім того, у цих рослин спостерігають високий рівень гомологічної рекомбінації [20]. На сьогодні для трансформації мохів широко застосовуються різні методи генетичної трансформації: за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ) [21, 22], агробактеріальної [23, 24] та біобалістичної [25] трансформації. Саме через те молекулярно-генетичні маніпуляції із гаплоїдною протоневою мохою створюють хороші можливості для розв'язання як фундаментальних [24], так і прикладних [26] проблем генетичної інженерії. Але в цілому ефективність цих процедур залишається нижчою, ніж у дріжджів, хоча рівні трансформації мохів кращі, ніж у вищих рослин [27].

Метою даної роботи була спроба розробити умови доставки екзогенної ДНК за допомогою полікатіонних носіїв до клітин моху *Ceratodon purpureus* та оцінити ефективність такого методу трансформації на рослинному об'єкті.

Матеріали і методи. Мох *C. purpureus* був зібраний на території сірчаного відвалу № 1 Язівського сірчаного родовища, підпорядкованого ДГХП «Сірка» (Львівська область, Україна). Культуру моху отримували пророщуванням його спор в лабораторних умовах. Для вирощування моху і селекції трансформантів використовували культуральні середовища, рекомендовані для моху *P. patens* [28, 29].

Для трансформації моху *C. purpureus* використовували нові поверхнево-активні полікатіонні носії лінійної моно- та диблочної будови, синтезовані на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська політехніка» [11]. Вони являють собою лінійні олігомери ДМАЕМ із гідрофобним кінцевим дитретбутил-арилпероксидним фрагментом, а також отримані на його основі диблок-кополімери, будова яких представлена на рис. 1. Тут порівняно структуру гребенеподібного носія БГ-2m з бічними ланцюгами поліетиленгліколю та носіїв із ланцюгами поліДМАЕМ. Характе-

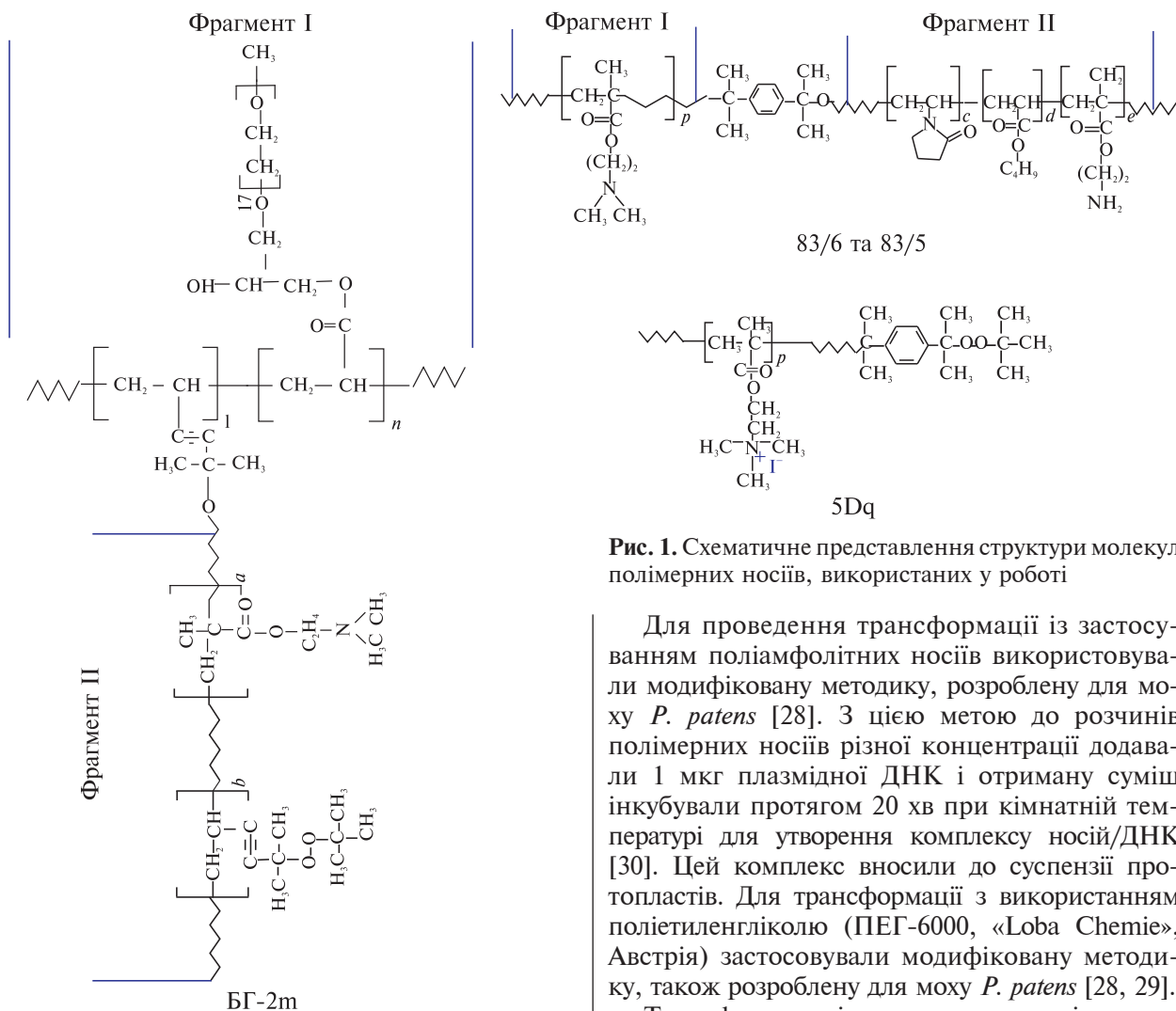


Рис. 1. Схематичне представлення структури молекул полімерних носіїв, використаних у роботі

ристика і властивості досліджених полімерних носіїв наведені у таблиці.

Із функцій розподілу за розміром міцелярних структур, які утворюються у водному розчині досліджених полімерних носіїв, видно (рис. 2), що діаметр частинок полімерів БГ-2m, 83/5 і 83/6 знаходиться у діапазоні 40–80 нм, тоді як діаметр частинок полімера 5Dq (поліДМАЕМ) – у діапазоні 2–5 нм.

Для трансформації моху *C. purpureus* використовували плазмідну ДНК pSF3, яка містить ген стійкості до гігроміцину Б та химерний ген білка пероксисомного сигналу першого типу (*pts1*), злитого з геном *gfp*. Конструкцію отримано в Інституті біології клітини НАН України.

Для проведення трансформації із застосуванням поліамфолітних носіїв використовували модифіковану методику, розроблену для моху *P. patens* [28]. З цією метою до розчинів полімерних носіїв різної концентрації додавали 1 мкг плазмідної ДНК і отриману суміш інкубували протягом 20 хв при кімнатній температурі для утворення комплексу носій/ДНК [30]. Цей комплекс вносили до суспензії протопластів. Для трансформації з використанням поліетиленгліколю (ПЕГ-6000, «Loba Chemie», Австрія) застосовували модифіковану методику, також розроблену для моху *P. patens* [28, 29].

Трансформовані протопласти висівали на чашки Петрі із середовищем PRMB, що містило глюкозу (0,5 %) [28], а через 14 днів їх переносили на селективне середовище з гігроміцином (50 мкг/мл). Після 14–20 днів культивування (період, протягом якого гинуть клітини із короткотривалою експресією гетерологічного гена) регенеранти субкультивували на середовищах без антибіотика і з антибіотиком (кожен раз по 14 днів) по чергово для підтвердження отримання стабільних трансформантів [31].

Для перевірки наявності або відсутності перенесеного гена інтересу в отриманих трансформантах проводили ПЛР-аналіз. ДНК із трансгенних рослин виділяли після 45 днів культивування за описаною методикою [28]. Для

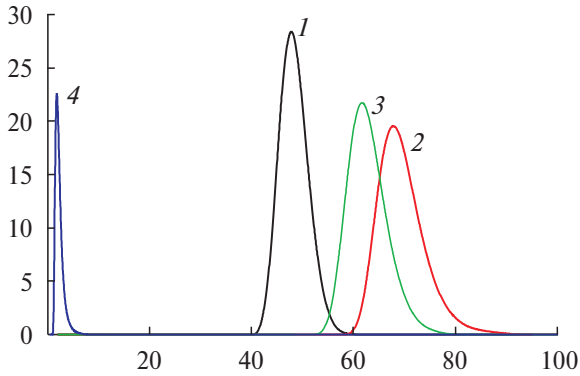


Рис. 2. Розподілення за розміром міцелярних структур, що утворюються у водному розчині носіїв БГ-2м (1), 83/5 (2), 83/6 (3) і 5Dq (4). по горизонталі – діаметр частинок, нм; по вертикалі – умовні одиниці інтенсивності поглинання відповідного носія

виявлення трансгенезу химерного гена *gfp-ptsI* використовували праймери VN10 (форвардний) і VN11 (реверсний) («Genomed», Польща):

VN10 AAGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAG
VN11 AAAGCGGCCGCTGCAGATCTGAGTAC-
TTGT

ПЛР-аналіз здійснювали за наступних умов: 1 цикл при 94 °С протягом 5 хв; 30 циклів при 94 °С – 30 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 80 с; 1 цикл при 72 °С – 1 хв. Продукти ПЛР аналізували за допомогою електрофорезу в 1%-ному гелі агарози [31].

Результати досліджень та їх обговорення. Ефективність використаних нами носіїв щодо забезпечення генетичної трансформації моху *S. purpureus* була різною, якщо брати до уваги

відживлення протопластів і формування ниток протонеми моху. Для трансфекції були використані різні полімерні носії – 83/5, 83/6, 5Dq і БГ-2м:

83/5	11 клонів
83/6	12 клонів
5Dq	1 клон
БГ-2м	1 клон
ПЕГ 6000	Клони не отримані
Контроль (без носія)	Клони не отримані

Утворення комплексу полікатионного носія з плазмідною ДНК відбувалося за присутності 0,3%-ного розчину відповідного полімера. За такої концентрації лише два полімери – 83/5 та 83/6 – дозволили забезпечити швидке відживлення та активний ріст протонеми. У той же час за дії полімерів 5Dq і БГ-2м значна кількість протопластів не виживала, а ріст ниток протонеми був сповільненим.

Слід зазначити, що використані у роботі полімерні носії є розчинними у широкому діапазоні рН і здатні утворювати міжмолекулярні комплекси сольового типу між позитивно зарядженими групами ланцюгів поліДМАЕМу і негативно зарядженими фосфатними групами нуклеотидів у молекулі ДНК. Наявність гідрофобних фрагментів у структурі полімерного носія не лише забезпечує його поверхневу активність, але й сприяє взаємодії комплексу носій/ДНК із плазматичною мембраною реципієнтних клітин. Можливо, відмінності у цих властивостях пояснюють різну ефективність використаних носіїв, і не виключено токсичну дію деяких з них на протопласти моху. Для

Порівняльна характеристика будови молекул використаних полімерних носіїв

Позначення	Вміст функціональних фрагментів у полімерному носії, %								ξ-потенціал, мВ *	Розмір міцелярних структур, D _n , нм
	Фрагмент I (скелет)			Фрагмент II (прищеплені ланцюги)						
	<i>l</i>	<i>n</i>	<i>p</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>		
БГ-2м	0,1	5,0	–	90,0	4,9	–	–	–	>50	48,0
83/6	–	–	20,0	–	–	64,8	11,4	3,8	3,3	62,0
83/5	–	–	15,0	–	–	68,8	12,2	4,0	4,3	68,0
5Dq *	–	–	94,0	–	–	–	–	–	45,0	5,0

* До складу полімерного носія входить фрагмент ізопропіл(трет-бутилперокси)метилетилбензену (ІПБМБ), [ІПБМБ] = 6,00 %.

трансформації моху *C. purpureus* використовували модифіковану методику [28], у якій плазмідну ДНК комплектували з ПЕГ або вказаними носіями (БГ-2m, 5Dq, 83/5 і 83/6). Застосування класичного методу трансформації за допомогою ПЕГ не дало змоги отримати трансформанти моху, тоді як доставка ДНК полімерними носіями забезпечила отримання одного трансформанту за дії БГ-2m та 5Dq, 11 та 12 трансформантів – за дії 83/5 і 83/6 відповідно (рис. 3, див. вклейку в кінці номера). Клони, які пройшли один селективний відбір на середовищі з гігromіцином Б, вважали трансформованими транз'єнтно.

Хоча *C. purpureus* є одним з визнаних модельних видів мохів, який було використано у ряді молекулярно-генетичних досліджень [32], слід зазначити, що ефективність у маркуванні його генів виявилася значно нижчою порівняно до моху *P. patens* [33], становлячи 20,8 % у *P. patens* і лише 1,05 % у *C. purpureus*. Цим, на нашу думку, можна пояснити незначну кількість отриманих транз'єнтних і стабільних трансформантів *C. purpureus*.

Оскільки для одержання достовірних результатів необхідно було отримати значну кількість стабільно трансформованих рослин, селекцію стабільних трансформантів на селективному середовищі, що містило 50 мкг/мл гігromіцину Б, проводили двічі після 6-денного культивування на середовищі для відживлення протопластів (рис. 4, див. вклейку в кінці номера). Результати стабільної трансформації були співставними з результатами транз'єнтної трансформації.

Із протонеми кожної трансгенної рослини було виділено ДНК для наступного ПЛР-аналізу з метою підтвердження інтеграції репортерного гена *gfp* у геном рослини. В результаті електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР нами виявлено смугу ДНК, що відповідає за розмірами вказаному гену (рис. 5).

Співставлення результатів аналізу структурних особливостей використаних полімерних носіїв плазмідної ДНК з даними, одержаними в нашій роботі, щодо їхньої здатності забезпечувати доставку цієї ДНК у геном моху *C. purpureus* показало, що найбільш дієвими виявилися полімери 83/5 і 83/6 (11 і 12 трансформованих клонів відповідно). На відміну від

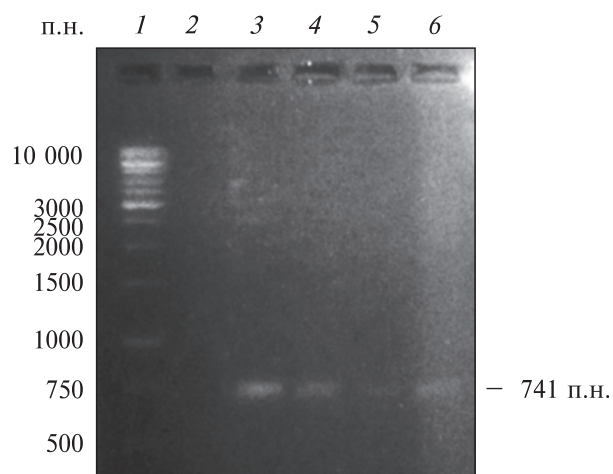


Рис. 5. Електрофореграма за результатами ПЛР-аналізу трансформантів моху *Ceratodon purpureus*: 1 – ДНК-маркери; 2 – контроль (без ПЛР); 3, 4, 5, 6 – доставка ДНК носіями 83/5, 83/6, D5q і БГ-2m відповідно

інших використаних полімерів молекули цих носіїв є диблок-кополімерами, які, крім ланцюга поліДМАЕМ, мають у своєму складі водорозчинний гнучкий блок, що містить ланки вініл-піролідону та мономера із первинною аміногрупою. Можна припустити, що утворення поліплексу відбувається в результаті електростатичної взаємодії ДНК з блоком поліДМАЕМ, який після цього набуває гідрофобних властивостей та утворює ядро нанорозмірної міцелоподібної структури.

Ця структура стабілізується водорозчинним блоком із ланок N-вінілпіролідону та аміоетилметакрилату із первинною аміногрупою. Важливою особливістю міцелоподібних структур, утворюваних цими диблок-кополімерами, є суттєво менший у порівнянні із носіями БГ-2m та 5Dq їхній дзета-потенціал (таблиця). Утворення поліплексу в результаті взаємодії носія з ДНК у дослідженому діапазоні їх співвідношення істотно не впливає на розмір міцелоподібних структур і їхній дзета-потенціал. Якщо міцелоподібна структура, утворена носієм 83/5, має розмір 68 нм і дзета-потенціал, рівний 4,3 мВ, то розмір і потенціал відповідних поліплексів з ДНК дорівнює 62 нм і 4,4 мВ відповідно.

На підставі наявних даних поки що складно стверджувати, яка саме із перерахованих

структурних особливостей молекули полімерів 83/5 і 83/6 відіграє найбільшу роль у забезпеченні високої ефективності доставки ними ДНК у клітини мохів порівняно з такою доставкою за участі інших використаних полімерів – 5Dq і БГ-2m. Можливо, такою перевагою для полімерів 83/5 і 83/6 є наявність у них вільної аміногрупи, що сприяє кращому зв'язуванню молекули ДНК, яка транспортується в клітини.

В цілому отримані результати стосовно ефективної доставки плазмідної ДНК у геном моху *C. purpureus* за допомогою новостворених полімерних носіїв із ланцюгами поліДМАЕМ, позначених 83/5 і 83/6, дозволяють стверджувати, що цей мох виявився зручним модельним рослинним організмом, з використанням якого вперше продемонстровано можливість такого методу генетичної трансформації для мохів. Запропонований метод генетичної трансформації протопластів моху *C. purpureus* дозволяє отримати більше транзйентних і стабільних трансформантів моху порівняно з результатами при застосуванні протоколу трансформації, котрий базується на використанні поліетиленгліколю. Слід зазначити, що отримані дотепер результати свідчать про дуже низьку ефективність трансформації цератодону у порівнянні з фіскомітрелюю [33]. Таким чином, можна очікувати, що розробка нами ефективного методу трансформації *C. purpureus* сприятиме розширенню використання цього виду моху як модельного об'єкта [18]. У свою чергу порівняльний аналіз взаємовідносин між структурою і функцією застосованих в нашій роботі полімерних носіїв на основі поліДМАЕМ і такого полімерного носія, як ПЕГ, може дозволити краще оцінити перспективи подальшого вдосконалення структури і функціональних характеристик нових полімерних носіїв, які пропонуватимуться для забезпечення більш ефективної доставки генетичного матеріалу в рослинні клітини.

Роботу виконано за фінансової підтримки гранту цільової комплексної програми фундаментальних досліджень Національної академії наук України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» згідно з договором № 46, а також гранту, наданому Н.С. Фінюк Західно-Українським біомедичним дослідницьким центром (2013–2014 рр.).

GENETIC TRANSFORMATION OF THE MOSS *CERATODON PURPUREUS* BY NOVEL POLYCATIONIC CARRIERS OF DNA

N.S. Finiuk, A.Y. Chaplya, N.Y. Mitina, N.M. Boiko, O.V. Lobachevska, O.S. Miahkota, A.I. Yemets, Ya.B. Blume, O.S. Zaichenko, R.S. Stoika

Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine, Lviv
Institute of Ecology of the Carpathians, Lviv
Lviv National Polytechnic University
Institute of Food Biotechnology and Genomics, Kyiv

E-mail: stoika@cellbiol.lviv.ua

There is a big progress in application of genetic engineering for improving the biological properties of different organisms. Viral and non-viral carriers are used for delivery of genetic material into target cells. Nanoscale polymeric materials of natural and synthetic origin are the most promising gene delivery agents. These polymers have demonstrated high efficiency of DNA delivery into the mammalian cells, although they were not very effective in plant cells. Here, the procedure for genetic transformation of *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. moss protoplasts is described. Method is based on the application of novel surface-active polymeric carriers of the polyDMAEM structure and controlled length and charge. It allows obtaining more transient and stable moss transformants per microgram of plasmid DNA when compared with known protocol based on using polyethyleneglycol. It is easier, more convenient, and cheaper than the «gene gun» method. Perspectives for further improvement of structure and functional characteristics of novel polymeric carriers are considered for delivery of genetic material into plant cells.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ МХА *CERATODON PURPUREUS* С ПОМОЩЬЮ НОВЫХ ПОЛИКАТИОННЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДНК

Н.С. Фінюк, А.Є. Чапля, Н.Є. Мітіна, Н.М. Бойко, О.В. Лобачевская, О.С. Мягкота, А.И. Емец, Я.Б. Блюм, А.С. Заиченко, Р.С. Стойка

Масштабы использования генной инженерии с целью улучшения биологических свойств различных организмов постоянно растут. Для доставки генетического материала в клетки-мишени применяют как вирусные, так и невирусные носители. Среди последних наиболее перспективными считаются наноразмерные полимерные материалы природного и синтетического происхождения. Такие полимеры проявили высокую эффективность в доставке ДНК в клетки животных, однако растительные клетки оказались малочувствительными к их действию. Описанный нами метод генетической трансформации протопластов мха *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. основан на использовании новых поверхностно-активных полимерных носителей контролируемой длины и за-

ряда, що містять ланцюги поліДМАЕМ. Цей метод дозволяє отримати більше транзиторних і стабільних трансформантів моху з розрахунку на мікрограм плазмидної ДНК порівняно з відомим протоколом, який базується на використанні поліетиленгліколя. Метод є простим, більш зручним і дешевим, ніж метод «генної пушки». Розглядаються перспективи подальшого вдосконалення структури і функціональних характеристик нових носіїв для доставки генетичного матеріалу в клітини рослин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Hefferon K.L. Transgenic plants and biotechnology // Encyclopedia of Life Sciences Support Systems. – UNESCO, Eolss Publishers, Oxford, UK, 2007. <http://www.eolss.net>.
2. Barampuram S., Zhang Z.J. Recent advances in plant transformation // Meth. Mol. Biol. – 2011. – 701. – P. 1–35.
3. Chung S.-M., Vaidya M., Tzfira T. Agrobacterium is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria // Trends Plant Sci. – 2006. – 11, № 1. – P. 1–4.
4. Rivera A.L., Gymez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. Physical methods for genetic plant transformation // Phys. Life Rev. – 2012. – 9, № 3. – P. 308–345.
5. Fu Y.-Q., Li L.-H., Wang P.-W. et al. Delivering DNA into plant cell by gene carriers of ZnS nanoparticles // Chem. Res. Chinese Univ. – 2012. – 28, № 4. – P. 672–676.
6. Бурлака О.М., Пірко Я.В., Ємець А.І., Блюм Я.Б. Генетична трансформація рослин за допомогою вуглецевих нанотрубок як новий напрямок у нанобіотехнології // Наноструктурне матеріалознавство. – 2011. – № 2. – С. 84–101.
7. Jäger M., Schubert S., Ochrimenko S. et al. Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application // Chem. Soc. Rev. – 2012. – 41. – P. 4755–4767.
8. Kasyanenko N.A., Lysyakova L.A., Dribinskii B.A. et al. DNA-polymer complexes for gene therapy // Polymer Sci., Ser. C. – 2012. – 54, № 1. – P. 57–68.
9. Foillard S., Zuber G., Doris E. Polyethylenimine-carbon nanotube nanohybrids for siRNA-mediated gene silencing at cellular level // Nanoscale Res. Lett. – 2011. – 3. – P. 1461–1464.
10. Zhang S., Zhao Y., Zhao B., Wang B. Hybrids of nonviral vectors for gene delivery // Bioconjug. Chem. – 2010. – 21, № 6. – P. 1003–1009.
11. Zaichenko A., Mitina N., Shevchuk O. et al. Development of novel linear, block and branched oligoelectrolytes and functionally targeting nanoparticles // Pure Appl. Chem. – 2008. – 80, № 11. – P. 2309–2326.
12. Фінюк Н.С., Вітак Т.Я., Мітіна Н.Є. та ін. Утворення поліплексів новими поверхнево-активними гребенеподібними поліамфолітами і плазмідною ДНК // Біотехнологія. – 2012. – 5, № 6. – С. 66–72.
13. Ficen S.Z., Guler Z., Mitina N. et al. Biophysical study of novel oligoelectrolyte based non-viral gene delivery systems to mammalian cells // J. Gene Med. – 2013. – 15, № 5. – P. 193–204.
14. Filyak Ye., Finiuk N., Mitina N. et al. A novel method for genetic transformation of yeast cells using oligoelectrolyte polymeric nanoscale carriers // BioTechniques. – 2013. – 54, № 1. – P. 35–43.
15. Cuming A.C. Mosses as model organisms for development, cellular, and molecular biology // Bryophyte Biology / Ed. B. Goffinet, A.J. Shaw. – Cambridge : Univ. Press, 2008. – P. 199–236.
16. Cove D., Bezanilla M., Harries P., Quatrano R. Mosses as a model system for the study of metabolism and development // Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. – 57. – P. 497–520.
17. Frank W., Decker E.L., Reski R. Molecular tools to study *Physcomitrella patens* // Plant Biol. – 2005. – 7. – P. 220–227.
18. Demkiv O.T., Blume Ya.B., Chaban Ch.I., Khorkavtsiv Ya.D. The growth movements of moss protonemata and arrangement of microtubules // Cell Biol. Int. – 1997. – 21, № 12. – P. 860–861.
19. Rensing S.A., Beike A.K., Land D. Evolutionary importance of generative polyploidy for genome evolution of haploid-dominant land plants // Plant Genome Diversity. Vol. 2. Physical structure, behaviour and evolution of plant genomes. – Wien : Springer-Verlag, 2013. – P. 295–304.
20. Cove D.J., Quatrano R.S. Agravitropic mutants of the moss *Ceratodon purpureus* do not complement mutants having a reversed gravitropic response // Plant Cell Environ. – 2006. – 57. – P. 1379–1387.
21. Kamisugi Y., Cuming A.C., Cove D.J. Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens* // Nucl. Acids Res. – 2005. – 33, № 19. – e173.
22. Liu Y.C., Vidali L. Efficient polyethylene glycol (PEG) mediated transformation of the moss *Physcomitrella patens* // J. Vis. Exp. – 2011. – 50. doi: 10.3791/2560.
23. Schaefer D., Zryd J.P., Knight C.D., Cove D.J. Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens* // Mol. Gen. Genet. – 1991. – 226. – P. 418–424.
24. Cho S.H., Quatrano R.S., Shin J.S. Transgenesis of *Physcomitrella patens* // Transgenic Plant J. – 2007. – 1, № 1. – P. 99–103.
25. Cove D.J., Perroud P.F., Charron A.J. et al. Transformation of moss *Physcomitrella patens* gametophytes using a biolistic projectile delivery system // Cold

- Spring Harb. Protoc. – 2009. – № 2. doi: 10.1101/pdb.em0115.
26. *Rosales-Mendoza S., Orellana-Escobedo L., Romero-Maldonado A. et al.* The potential of *Physcomitrella patens* as a platform for the production of plant-based vaccines // *Exp. Rev. Vaccines*. – 2014. – **13**, № 2. – P. 203–212.
27. *Jing L., Wenjing Q., Dan S., Zhengquan H.* Genetic transformation of moss plant // *Afr. J. Biotechnol.* – 2013. – **12**, № 3. – P. 227–232.
28. *Cove D.J., Perroud P.-F., Charron A.J. et al.* The moss *Physcomitrella patens*. A novel model system for plant development and genomic studies // *Emerging Model Organisms, a Laboratory Manual*. Vol. 1. – New York : Cold Spring Harbor, 2009. – P. 69–104.
29. *Knight C.D., Cove D.J., Cuming A.C., Quatrano R.S.* Moss gene technology // *Molecular Plant Biology* / Eds P.M. Gilmartin, C. Bowler. – Oxford : Univ. Press, 2002. – **2**. – P. 285–301.
30. *Zou W., Liu C., Chen Z., Zhang N.* Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA // *Nanoscale Res. Lett.* – 2009. – **4**, № 9. – P. 982–992.
31. *Zeidler M., Hartmann E., Hughes J.* Transgene expression in the moss *Ceratodon purpureus* // *J. Plant Physiol.* – 1999. – **154**, № 5/6. – P. 641–650.
32. *McDaniel S.F., Neubig K.M., Payton A.C. et al.* Recent gene-capture on the UV sex chromosomes of the moss *Ceratodon purpureus* // *Evolution*. – 2013. – **67**, № 10. – P. 2811–2822.
33. *Trouiller B., Charlot F., Choinard S. et al.* Comparison of gene targeting efficiencies in two mosses suggests that it is a conserved feature of Bryophyte transformation // *Biotechnol. Lett.* – 2007. – **29**, № 10. – P. 1591–1598.

Надійшла 28.02.14