

Н.А. МАТВЕЕВА, М.Ю. ВАСИЛЕНКО,
А.М. ШАХОВСКИЙ, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
03143, Киев-143, ул. Акад. Заболотного, 148
E-mail: joyna56@gmail.com

**АГРОБАКТЕРИАЛЬНАЯ
ТРАНСФОРМАЦИЯ САЛАТА
(*LACTUCA SATIVA* L.)
КОНСТРУКЦИЯМИ, НЕСУЩИМИ
ГЕНЫ БАКТЕРИАЛЬНЫХ АНТИГЕНОВ
ИЗ *Mycobacterium tuberculosis***



Методом трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens* были получены трансформированные растения *Lactuca sativa* с генами, кодирующими синтез туберкулезных антигенов. Исходным материалом являлись семядольные листья салата сортов Ералаш, Рубиновое кружево и Снежинка. Векторные конструкции содержали селективный ген неомицинфосфотрансферазы II *nptII* и целевые гены *ESAT6*, *Ag85B* (-TMD), *ESAT6:Ag85B* (-TMD). ПЦР-анализ геномной ДНК показал наличие как селективных, так и целевых генов во всех анализированных растениях. В то же время ПЦР-анализ обратных транскриптов выявил, что возможно как наличие, так и отсутствие транскрипции гена *ESAT6* при стабильной транскрипции гена *nptII*.

© Н.А. МАТВЕЕВА, М.Ю. ВАСИЛЕНКО, А.М. ШАХОВСКИЙ,
Н.В. КУЧУК, 2009

Введение. В последнее десятилетие наблюдался значительный прогресс как в разработке способов, так и возможных путей практического применения генетической трансформации растений. Научный и практический интерес представляет использование достижений генетической инженерии в медицине и ветеринарии. Помимо возможности использования трансгенных растений в качестве фабрики для синтеза бактериальных антигенов, растения, не подвергаемые термообработке, могут стать естественным готовым продуктом для профилактики и лечения заболеваний [1, 2]. Разработаны подходы, позволяющие инициировать в растениях синтез бактериальных антигенов для их использования в качестве вакцин [3]. Работы в этом направлении были начаты еще в 1990 г., однако до настоящего времени практическое использование так называемых биовакцин отсутствует. Это связано как с трудностями технического характера, не позволяющими получать достаточное количество продукта, так и с неизученными последствиями применения таких вакцин (аллергические реакции и т.д.) [4]. Тем не менее разработки в этом направлении продолжают. Так, показана возможность высокого уровня экспрессии в хлоропластах растений антигена TetC, определяющего устойчивость к столбнячной инфекции [5].

Интерес представляет и создание растений, продуцирующих белки – индукторы иммунной защиты от туберкулеза. Это заболевание, вызываемое *Mycobacterium tuberculosis*, несмотря на разработанные схемы химиотерапевтического лечения и вакцинацию, до сих пор представляет большую угрозу не только для жизни населения, но и приводит к убыткам в животноводстве. Вакцина БЦЖ (*Bacille Calmette-Guérin*), созданная в 20-х годах прошлого века, не является полноценной защитой взрослых от туберкулеза легких. Альтернативой могут быть новые вакцины на основе антигенов *ESAT6* и *Ag85* [6–8]. Внимание исследователей привлекает возможность создания вакцины, содержащей одновременно два антигена, например, *Ag85B* и *MPT64* [9]. Основой для получения таких вакцин могут стать трансформированные растения [10].

Широко распространенным методом трансформации растений является использование *Agrobacterium tumefaciens*, основанное на природной способности почвенной бактерии пе-

реносить в растительный геном собственные гены. Это объясняется его простотой и эффективным применением так называемого метода «листовых дисков» для широкого спектра видов класса двудольных [11]. Именно этот метод был использован нами для трансформации растений салата *Lactuca sativa* L. трех сортов с целью создания растений с антитуберкулезными генами.

Материалы и методы. Исходным материалом были семена салата *L. sativa* сортов Снежинка, Рубиновое кружево и Ералаш. Семена стерилизовали последовательно в 70%-ном этаноле (1 мин) и 25%-ном растворе «Белизна» (10 мин), после чего промывали в дистиллированной воде (60 мин). Проращивали семена на агаризованной среде MS [12] при 16-часовом световом фотопериоде и температуре 24 °С. Для трансформации использовали семядольные листья 7-дневных проростков.

При создании векторных конструкций для агробактериальной трансформации был использован бинарный вектор, содержащий ген *nptII* с регуляторными последовательностями NOS промотора и терминатора. В участок Т-ДНК под контролем 35S промотора и OCS терминатора клонированы структурные последовательности гена *ESAT6* (плазмида pCB063) и объединенной последовательности *ESAT6:Ag85(-TMD)* (плазмида pCB064), кодирующие синтез туберкулезных антигенов (рис. 1). Эти гены были любезно предоставлены проф. Ю.Л. Дороховым (Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, МГУ им. М.В. Ломоносова).

Конструкцию pCB064 использовали для трансформации салата сортов Снежинка, Рубиновое кружево, Ералаш, конструкцию pCB063 – сорта Ералаш.

Для трансформации использовали *A. tumefaciens* (штамм GV3101) с векторными конструкциями pCB063, pCB064. Бактерии выращивали на среде LB [13] с антибиотиками (100 мг/л карбенициллина, 50 мг/л рифампицина, 25 мг/л гентамицина) 48 ч при температуре 27 °С. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием (3000 об/мин, 10 мин), осадок ресуспендировали в растворе 10 мМ MgSO₄. Семядольные листья с предварительно сделанными насечками инкубировали в бактериальной суспензии 30 мин, промокали фильтровальной бумагой и культивировали на агаризованной среде MS в течение 2 сут. Затем экспланты переносили на среду S1 с добавлением антибиотиков канамицина (25 мг/л) и цефотаксима (500 мг/л).

Для регенерации растений семядольные листья культивировали на средах S1 (модифицированная среда MS с добавлением 0,5 мг/л α-нафтилуксусной кислоты, 3 мг/л кинетина, 300 мг/л гидролизата казеина, 1 г/л 2-морфолино-этансульфоновой кислоты, 30 г/л сахарозы), S3 (модифицированная среда MS с 0,05 мг/л α-нафтилуксусной кислоты, 0,5 мг/л кинетина, 100 мг/л гидролизата казеина, 1 г/л 2-морфолино-этансульфоновой кислоты, 30 г/л сахарозы). Образовавшиеся побеги укореняли на среде S4 (модифицированная среда MS с 1 г/л 2-морфолино-этансульфоновой кислоты, 1 мг/л индолилмасляной кислоты, 20 г/л сахарозы).

Геномную ДНК выделяли из зеленых листьев стерильных растений СТАВ-методом [14]. Суммарную РНК выделяли по методике [15]. Материалом служили свежесрезанные зеленые листья стерильных и тепличных растений. Концентрацию РНК измеряли спектрофотометрически. Чистоту препаратов РНК также контролировали спектрофотометрически, из-

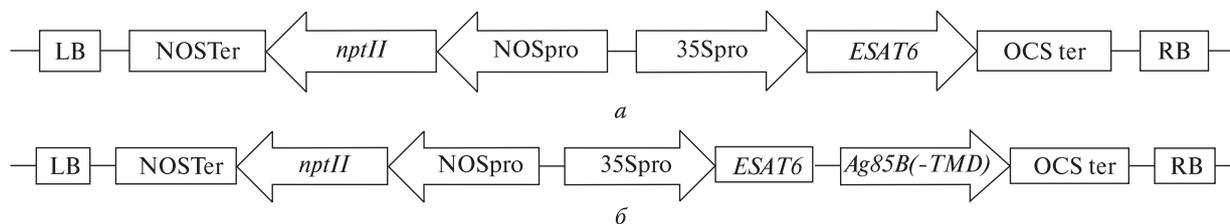


Рис. 1. Схемы плазмидных векторов: *a* – pCB063, *б* – pCB064; LB, RB – левая и правая границы Т-ДНК; *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы II (NOS промотор и терминатор); *ESAT6* и *ESAT6:Ag85B (-TMD)* – целевые гены, кодирующие синтез туберкулезных антигенов (35S промотор и OCS терминатор)

Праймеры, использованные для подтверждения присутствия генов *nptII*, *ESAT6*, *Ag85B (-ТМД)* и *ESAT6:Ag85B (-ТМД)*

Ген	Праймеры	Размер амплифицированного фрагмента, п.н.
<i>nptII</i>	5'-cctgaatgaactccaggacgaggca-3' 5'-gctctagatccagagctcccgtcagaag-3'	622
<i>ESAT6</i>	5'-ctgaccatggcagagcagcagtggaatttcgc-3' 5'-gagaattctgcgaacatcccagtgctcg-3'	299
<i>Ag85B(-ТМД)</i>	5'-tctacagcgactggtacagc-3' 5'-tcaggttgctgctacgaacg-3'	484
<i>ESAT6:Ag85B(-ТМД)</i>	5'agcagtcctgaccaagctc-3' 5'-tcaggttgctgctacgaacg-3'	1033

Примечание. Условия амплификации: первичная денатурация – 94 °С, 3 мин, затем 30 циклов амплификации (94 °С, 30 с – 62 °С, 30 с – 72 °С, 30 с), окончательная полимеризация – 72 °С, 3 мин.

меряя параметры $A_{260} : A_{280}$ и $A_{260} : A_{230}$, где A_{230} , A_{260} , A_{280} – оптическая плотность при длине волны 230, 260, 280 нм соответственно. Полученные препараты РНК имели удовлетворительные спектрофотометрические характеристики ($A_{260} : A_{280}$ 1,9–2,0 и $A_{260} : A_{230}$ 2,3–2,5), что указывало на отсутствие примесей полифенолов, полисахаридов и ДНК [16].

Предварительно обработанные ДНКазой I, свободной от РНКазы, препараты суммарной РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК (обратных транскриптов). Синтез осуществляли с помощью набора реактивов «Fermentas» (Литва) по инструкции фирмы-изготовителя. При этом для каждой пробы РНК проводили две параллельные реакции – в присутствии и в отсутствие (отрицательный контроль) обратной транскриптазы.

ПЦР-амплификацию геномной ДНК и синтезированных обратных транскриптов осуществляли на амплификаторе Mastercycler personal 5332 (Eppendorf) с термостатированной крышкой в пробирках с ультратонкими стенками. Реакционная смесь состояла из однократного ПЦР-буфера с сульфатом аммония, 0,2 мкМ соответствующих праймеров, 200 мкМ каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,5 ед. Таq-полимеразы, 10–50 нг ДНК-пробы. Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл. При этом использовали праймеры, специфичные к кодирующей части генов *nptII*, *ESAT6*, *Ag85B(-ТМД)*, *ESAT6:Ag85B(-ТМД)* (таблица).

Результаты исследований и их обсуждение.

Вакцины, созданные на основе бактерий, давно применяются для предупреждения многих заболеваний, в том числе и туберкулеза. Однако они имеют целый ряд недостатков, которых лишены вакцины на основе рекомбинантных белков. Такие вакцины являются синтетическими молекулами с антигенами (целевыми белками), стимулирующими образование Т- и В-лимфоцитов.

Трансгенные растения, в клетках которых экспрессируются антигены, могут быть недорогим источником целевых белков-антигенов, а растения, не подвергаемые термообработке – готовым профилактическим средством. В качестве такого растения для возможного использования в качестве профилактики туберкулеза нами был выбран салат *L. sativa*. Это растение отличается быстрым приростом зеленой биомассы и не требует термообработки перед употреблением в пищу.

Метод трансформации с помощью *A. tumefaciens* широко используется в генетической инженерии растений. Что касается такого растения, как салат, то этим методом, например, были получены трансгенные растения салата, устойчивые к гербицидам [17, 18]. Агробактериальная трансформация была также использована с целью получения растений салата с улучшенными свойствами [19], устойчивыми к повреждению тлей [20], для получения съедобных вакцин против вируса гепатита В [21].

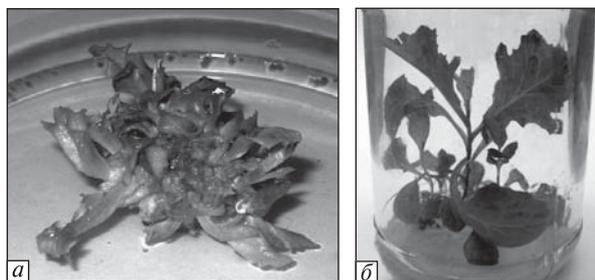


Рис. 2. Прямая регенерация трансгенных растений салата сорта Ералаш на селективной среде с 25 мг/л канамицина: *a* – регенерация растений из проксимальной части семядольного листка; *б* – трансгенное растение на селективной среде

Залогом успешной трансформации растений является высокий регенерационный потенциал исходного материала. В связи с этим нами был оптимизирован протокол регенерации растений из семядольных листьев салата сортов Ералаш, Рубиновое кружево и Снежинка. В качестве эксплантов использовали семядольные листья 7–14-дневных проростков, на которых делали надрезы. Экспланты культивировали в течение 2–3 нед на среде S1, содержащей фитогормоны кинетин и НУК. Высоким регенерационным потенциалом обладали проксимальные части семядольных листьев. При их культивировании на среде S1 наблюдалась прямая регенерация растений, причем коли-

чество растений составляло 10–15 на эксплант размером 5 × 3 мм. Время, необходимое для инициации регенерации растений разных сортов, варьировало от 7–8 дней (Ералаш, Рубиновое кружево) до 2 нед (Снежинка). При более длительном (до 3 нед) росте эксплантов из дистальной и средней части котиледонов на этой среде формировалась каллусная ткань с последующей регенерацией растений. Таким образом, прямая регенерация на среде S1 существенно сокращала время культивирования эксплантов. Сформированные растения размером от 5 мм переносили на среду S3 с последующим укоренением на среде S4.

Эффективность регенерации растений сортов Снежинка, Рубиновое кружево и Ералаш была различна и составляла соответственно 60, 86, 95 % (эффективность регенерации выражали отношением количества эксплантов, на которых образовались побеги, к общему числу эксплантов). Высокая эффективность прямой регенерации растений салата из проксимальных частей семядольных листьев стала предпосылкой успешной работы по получению трансгенных растений.

Наличие в векторных конструкциях селективного гена *nptII* дало возможность проводить отбор трансформантов по признаку роста зеленых растений на среде, содержащей 25 мг/л канамицина. При высокой регенерационной

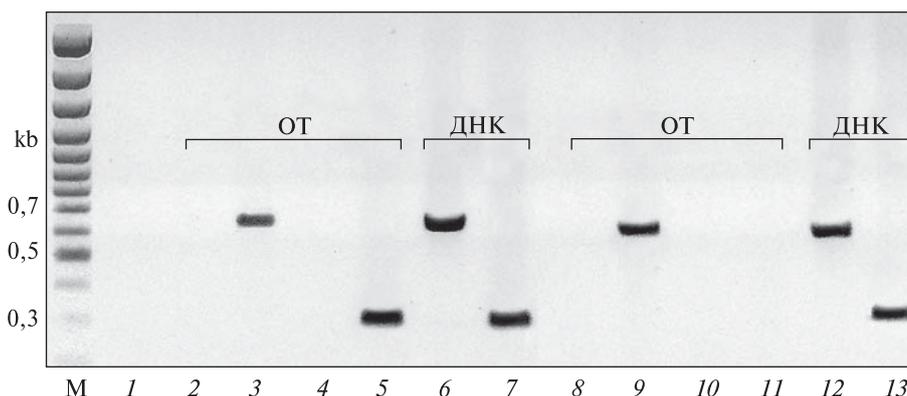


Рис. 3. ПЦР-анализ обратных транскриптов (ОТ) и геномной ДНК салата *L. sativa*, трансформированных плазмидой pCB064: М – маркер; 1 – геномная ДНК нетрансформированного растения; 2–7 – сорт Рубиновое кружево, 8–13 – сорт Снежинка. Геномная ДНК трансгенных растений содержит как ген *nptII* (линии 6, 12), так и ген *ESAT6* (7, 13). Селективный ген *nptII* ожидаемо транскрибируется во всех случаях (линии 3, 9), в то время как транскрипты гена *ESAT6* детектируются для сорта Рубиновое кружево (линия 5) и не обнаружены для сорта Снежинка (линия 11). Линии 2, 4, 8, 10 – отрицательный контроль (параллельный синтез обратных транскриптов в отсутствие ревертазы)

способности эксплантов сорта Ералаш эффективность трансформации (отношение количества эксплантов с зелеными на селективной среде побегами к общему количеству эксплантов) составила 62 % (pCB063) и 44 % (pCB064). Для сортов Рубиновое кружево и Снежинка (pCB064) эти показатели составили соответственно 32 и 18 %. Полученные растения укоренялись на среде с канамицином и сохраняли зеленую окраску листьев при длительном (более 6 мес) культивировании на среде с антибиотиком. На селективной среде было получено более 100 зеленых растений трех сортов (рис. 2).

ПЦР-анализ тотальной ДНК растений сорта Ералаш показал присутствие генов *nptII* и *ESAT6* после трансформации конструкцией pCB063, а также генов *nptII*, *ESAT6*, *Ag85B* (-ТМД) и объединенной последовательности *ESAT6:Ag85B* (-ТМД) после трансформации конструкцией pCB064 (данные не приведены). Для растений сорта Рубиновое кружево (кроме одного) и для всех анализированных растений сорта Снежинка (pCB064) также показано присутствие как селективного гена *nptII*, так и *ESAT6*, *Ag85B* (-ТМД), *ESAT6:Ag85B* (-ТМД). Результаты ПЦР-анализа тотальной ДНК на присутствие генов *nptII* и *ESAT6* в растениях сортов Рубиновое кружево и Снежинка представлены на рис. 3 (линии 6, 7, 12, 13).

Интересными оказались результаты ПЦР-анализа обратных транскриптов. Как и следовало ожидать, транскрипция гена *nptII* (присутствие мРНК) осуществлялась во всех анализированных растениях (рис. 3, линии 3, 9). В то же время ген *ESAT6* транскрибировался не во всех случаях. Так, для некоторых растений сорта Снежинка (pCB064) мы столкнулись с явлением молчания генов. Обратные транскрипты гена *ESAT6* не детектировались (линия 11), хотя в геномной ДНК ген *ESAT6* присутствовал (линия 13). В то же время для всех анализированных растений сортов Ералаш и Рубиновое кружево, а также части растений сорта Снежинка детектировались как гены *nptII* и *ESAT6* (линии 6, 7, 12, 13), так и обратные транскрипты (линии 3 и 5).

В некоторых случаях мы столкнулись с отсутствием экспрессии при наличии трансгена в растениях. Это явление, называемое «молчанием генов», встречается при ядерной транс-

формации и является одним из ее недостатков. Такое явление может возникнуть в случае присутствия гомологичной переносимому гену последовательности ДНК в растительном геноме, при встраивании большого числа копий гена на геном, метилировании перенесенной последовательности ДНК, образовании ДНК-дуплекса повторяющихся генов [22, 23]. Тем не менее в ряде полученных после трансформации растений целевые гены транскрибировались, что позволяет считать возможным применение метода агробактериальной трансформации для получения растений салата с генами секреторных белков-антигенов *ESAT6* и *Ag85B*.

Таким образом, нами был оптимизирован протокол прямой регенерации растений из семядольных листьев салата. На основании полученных результатов в качестве объекта были выбраны сорта салата Ералаш, Рубиновое кружево, Снежинка, характеризующиеся наибольшим регенерационным потенциалом. В результате агробактериальной трансформации конструкциями pCB063 и pCB064 с селективным геном *nptII* и целевыми генами белков-антигенов *ESAT6* и *Ag85B* получены трансгенные растения трех сортов салата. ПЦР-анализ геномной ДНК обнаружил наличие как селективных, так и целевых генов во всех анализированных растениях. В то же время ПЦР-анализ обратных транскриптов показал, что возможно как наличие, так и отсутствие транскрипции гена *ESAT6* при стабильной транскрипции гена *nptII*.

*N.A. Matvieieva, M.Y. Vasylenko,
A.M. Shahovsky, N.V. Kuchuk*

AGROBACTERIUM-MEDIATED
TRANSFORMATION OF LETTUCE (*LACTUCA
SATIVA* L.) WITH GENES
OF BACTERIAL ANTIGENES FROM
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Transgenic plants of lettuce *Lactuca sativa* L. cv. Eralash, Sniezinka, Rubinovoje kruzevo with genes coding synthesis of tuberculosis antigens have been obtained by Agrobacterium-mediated transformation. Cotyledons of *in vitro* seedlings were used as the initial material for transformation with plasmids pCB063 (genes *ESAT6*, *nptII*) and pCB064 (genes *ESAT6:Ag85B* (-TMD), *nptII*). PCR-analysis has shown the presence both selective and target genes in all plants analyzed. At the same time, the RT-PCR has

shown that both the presence and the absence of a transcription of gene *ESAT6* at a stable transcription of a gene *nptII* is possible.

Н.А. Матвеева, М.Ю. Василенко,
А.М. Шаховский, М.В. Кучук

АГРОБАКТЕРІАЛЬНА ТРАНСФОРМАЦІЯ
САЛАТУ (*LACTUCA SATIVA L.*) КОНСТРУКЦІЯМИ,
ЩО МАЮТЬ ГЕНИ БАКТЕРІАЛЬНИХ
АНТИГЕНІВ З *Mycobacterium tuberculosis*

Методом трансформації за допомогою *Agrobacterium tumefaciens* отримано трансформовані рослини *Lactuca sativa* з генами, що кодуєть синтез туберкульозних антигенів. Вихідним матеріалом були сім'ядольні листки салату сортів Єралаш, Рубінове мереживо та Сніжинка. Векторні конструкції мали селективний ген неоміцинфосфотрансферази II *nptII* та цільові гени *ESAT6*, *Ag85B(-TMD)*, *ESAT6:Ag85B(-TMD)*. ПЛР-аналіз геномної ДНК виявив наявність як селективних, так і цільових генів у всіх проаналізованих рослинах. В той же час ПЛР-аналіз зворотних транскриптів показав, що можливі як присутність, так і відсутність транскрипції гена *ESAT6* при стабільній транскрипції гена *nptII*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Mason H.S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C.J. Edible plant vaccines: application for prophylactic and therapeutic molecular medicine // *Trend Mol. Med.* – 2002. – **8**, № 7. – P. 324–329.
- Walmsley A.M., Arntzen C.J. Plant delivery of edible vaccines // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – **11**. – P. 126–129.
- Rice J., Ainley W.M., Shewen P. Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health // *Anim. Res. Revs.* – 2005. – **6**. – P. 199–209.
- Kirk D.D., McIntosh K., Walmsley A.M., Peterson R.K.D. Risk analysis for plant-made vaccines // *Transgen. Res.* – 2005. – **14**, № 4. – P. 449–462.
- Tregoning J., Maliga P., Dougan G., Nixon P.J. New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC // *Phytochemistry.* – 2004. – **65**, № 8. – P. 989–994.
- Brodin P., Rosenkrands I., Andersen P., Cole S.T., Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? // *Trends Microbiol.* – 2004. – **12**, № 11. – P. 500–508.
- Dietrich J., Weldingh K., Andersen P. Prospects for a novel vaccine against tuberculosis // *Veterinary Microbiol.* – 2006. – **112**, № 2–4. – P. 163–169.
- Orme I.M. Current progress in tuberculosis vaccine development // *Vaccine.* – 2005. – **23**, № 17/18. – P. 2105–2108.
- Tian X., Cai H., Zhu Y.X. Protection of mice with a divalent tuberculosis DNA vaccine encoding antigens Ag85B and MPT64 // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). – 2004. – **36**, № 4. – P. 269–276.
- Dorokhov Y.L., Sheveleva A.A., Frolova O.Y. et al. Super-expression of tuberculosis antigens in plant leaves // *Tuberculosis.* – 2007. – **87**, № 3. – P. 218–224.
- Horsch R.B., Fry J., Hoffman N. et al. A simple and general method for transferring genes into plants // *Science.* – 1985. – **227**. – P. 1229–1231.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Phys. Plant.* – 1962. – **15**. – P. 473–497.
- Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
- Дрейкер Дж., Скотт Р. Выделение нуклеиновых кислот из клеток растений // *Генная инженерия растений.* – М.: Мир, 1991. – С. 241–245.
- Logemann J., Schell J., Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues // *Anal. Biochem.* – 1987. – **163**. – P. 16–20.
- Rapley R., Heptinstall J. UV spectrophotometric analysis of ribonucleic acids // *Methods in molecular biology* / Eds R. Rapley, D. Manning. – Totowa : Humans Press Inc., 1998. – Vol. 86. – P. 65–68.
- McCabe M.S., Schepers F. Arend A. et al. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a petE promoter-bar gene compared with a CaMV 35S-bar gene // *Theor. and Appl. Genet.* – 1999. – **99**, № 3/4. – P. 587–592.
- Nagata R.T., Dusky J.A., Ferl R.J., Torres A.C., Cantliffe D.J. Evaluation of glyphosate resistance in transgenic lettuce // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 2000. – **125**, № 6. – P. 669–672.
- Goto F., Yoshihara T., Saiki H. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin // *Theor. and Appl. Genet.* – 2000. – **100**, № 5. – P. 658–664.
- Ahmed M.B., Akhter M.S., Hossain M. et al. An efficient *Agrobacterium*-mediated genetic transformation method of lettuce (*Lactuca sativa L.*) with an aphidicidal gene, *pta* (Pinella ternana agglutinin) // *Middle-east J. Sci. Res.* – 2007. – **2**, № 2. – P. 155–160.
- Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M. et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus // *FASEB J.* – 1999. – **13**, № 13. – P. 1796–1799.
- Assaad F., Tucker K.L., Signer E.R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in Arabidopsis // *Plant. Mol. Biol.* – 1993. – **22**. – P. 1067–1085.
- Matzke M.A., Matzke A.J.M. How and why do plants inactivate homologous (trans) genes? // *Plant Physiol.* – 1995. – **107**. – P. 679–685.

Поступила 02.04.08