

УДК 577.21:582.926.2

Н.Л. ЩЕРБАК, В.Б. БЕЛОКУРОВА,
И.О. ГЕЦКО, И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ lox-САЙТОВ Cre-lox СИСТЕМЫ РЕКОМБИНАЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ БЕСПРОМОТОРНОГО bar ГЕНА В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ



Показано, что при размещении lox-сайта в генетических конструкциях в непосредственной близости от правой границы T-ДНК (RB — lox — bar —) происходит стабильная экспрессия следующего за lox-сайтом беспромоторного bar гена. Генетические конструкции, которые были использованы в работе, содержали также ген неомицинофосфотрансферазы II (npt II) под контролем pos промотора. Трансформированные растения *Nicotiana tabacum* и *N. africana* были отобраны по способности расти на среде, содержащей канамицин, а затем протестированы на селективной среде, содержащей фосфинотрицин. У 80 % трансгенных растений, отобранных по устойчивости к канамицину, экспрессия bar гена происходила на таком же уровне, как и у растений, трансформированных конструкциями, в которых bar ген находится под сильным конститутивным промотором. При использовании конструкции без lox-сайта, в которой беспромоторный bar ген находится возле правой границы T-ДНК (RB — bar —), либо конструкций, в которых lox-сайт и беспромоторный bar ген расположены в середине конструкции (— lox — bar —), частота PPT-устойчивых растений составила не более 4,5 %. Анализ с помощью ПЦР не выявил возможных tandemных повторов или рекомбинации, в результате которых беспромоторный bar ген мог оказаться под контролем промотора, находящегося в плазмиде. При встраивании pos-терминатора в вектор между lox-сайтом и правым бордером частота PPT-устойчивых трансгенных растений не изменилась.

© Н.Л. ЩЕРБАК, В.Б. БЕЛОКУРОВА, И.О. ГЕЦКО,
И.К. КОМАРНИЦКИЙ, Н.В. КУЧУК, 2006

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2006. № 1

Введение. В результате интенсивного развития методов молекулярной биологии, а также возможности секвенирования генов и определения их функций постоянно растет количество генов, вовлеченных в эксперименты по биотехнологии. Стандартный подход подразумевает интродукцию гена, представляющего интерес как независимой транскрипционной единицы с использованием вектора, в котором трансген находится под контролем специфических для растений промоторов и последовательностей, являющихся терминаторами транскрипции. В тех случаях, когда необходима конститутивная экспрессия перенесенных генов, количество промоторов, которые могут быть использованы в экспериментах по генетической трансформации, весьма ограничено. Наиболее часто в генетических конструкциях для трансформации ядерного генома используются промотор гена 35S белка из генома вируса мозаики цветной капусты, а также pos промотор гена нопаинсинтазы [1]. Однако при создании полигенных векторов возникает проблема дублирования этих активно используемых промоторов, что крайне нежелательно, поскольку необходимо свести к минимуму риск «молчания» генов в результате наличия повторов [2, 3]. В трансгенных растениях это приводит к низкому уровню либо отсутствию экспрессии трансгенов. Кроме того, «молчание» генов может возникнуть также в результате метилирования промоторов, что является механизмом защиты растений от вирусных инфекций [4]. Это особенно проблематично в тех случаях, когда при конструировании векторов используется большое количество последовательностей, содержащихся в растительных патогенах. Так, в публикации Al-Kaff et al. [5] сообщалось о молчании в трансгенных растениях bar гена, находящегося под контролем 35S-промотора при инфицировании этих растений вирусом мозаики цветной капусты. Одним из способов разрешения проблемы «молчания» генов может быть разработка новых подходов, позволяющих использовать экспрессию беспромоторных генов в трансгенных растениях. Примером такой технологии может быть использование векторов, содержащих последовательности IRES (internal ribosome entry site), благодаря которым происходит полицистронная экспрессия трансгенов [6].

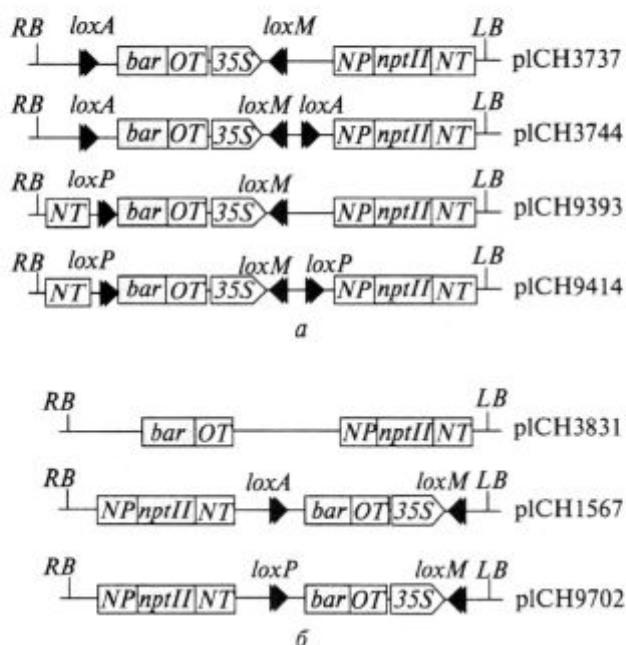


Рис. 1. Схема плазмидных векторов: *a* — векторы, которые содержат беспромоторный *bar* ген и *lox*-сайт возле правого бордера; при трансформации этими плазмидами среди трансгенных растений, отобранных по устойчивости к канамицину, 80 % были устойчивы и к фосфинотрицину; *б* — векторы, которые содержат беспромоторный *bar* ген, использованы в качестве контроля; растения, трансформированные этими плазмидами, не имеют устойчивости к фосфинотрицину; *NT* — *pos* терминатор; *OT* — *ocs* терминатор; *NP* — *pos* промотор; *35S* — промотор вируса мозаики цветной капусты

В нашей работе экспрессия беспромоторного *bar* гена происходила при размещении *lox*-сайта *Cre-lox* системы рекомбинации бактериофага P1 вблизи правого бордера Т-ДНК. Согласно публикациям генетические конструкции, содержащие последовательности сайт-специфической системы рекомбинации бактериофага P1 *Cre-lox*, успешно используются для перестройки генетического материала трансформированных растений [7–9]. В ряде работ были предприняты попытки производить сайт-специфическую интеграцию Т-ДНК в *lox*-сайт, предварительно встроенный в геном растения [10, 11]. По мнению авторов, использование такой системы позволяет с помощью агробактериальной трансформации производить сайт-специфическое встраивание Т-ДНК, содержащей один *lox*-сайт либо два прямо ориентированных *lox*-сайта, в геном растения. Однако мы не встречали работ, в которых изуча-

лась промоторная активность *lox*-сайтов, находящихся в генетическом векторе, либо их влияние на процесс встраивания Т-ДНК при отсутствии *Cre*-рекомбиназы, а также *lox*-сайтов в геноме растения. Как сообщалось ранее, при трансформации растений *N. africana* плазмидами, содержащими *lox*-сайт и *bar* ген без промотора возле правого бордера, были получены РРТ-устойчивые растения [12]. Целью настоящей работы было изучить влияние *lox*-сайта, расположенного в непосредственной близости от правой границы Т-ДНК, на экспрессию следующего за *lox*-сайтом беспромоторного *bar* гена.

Материалы и методы. Плазмиды и бактериальный штамм. Для трансформации использовали плазмиды pICH3744, pICH3737, pICH9393, pICH9414, pICH3831, pICH1567, pICH9702 (рис. 1). Векторные конструкции были любезно предоставлены компанией Icon Genetics GmbH (г. Халле, Германия). Плазмида pICH3831 содержит кодирующую последовательность гена устойчивости к фосфинотрицину (*bar* гена) без промотора и независимый 35S промотор возле правого бордера (RB — *bar* — 35S—), а также ген неомифосфотрансферазы II (*nptII*) под контролем *pos* промотора. Плазмиды pICH3744, pICH3737, pICH9393, pICH9414 содержат *bar* ген без промотора и независимый 35S промотор между двумя инвертированными *lox*-сайтами и имеют общую схему: RB—*lox*—*bar*—35S—*lox*—. При этом плазмиды pICH9393 и pICH9414 отличаются наличием *pos* терминатора возле правого бордера перед сайтом *loxP*. Плазмиды pICH3744, pICH9414 содержат дополнительный *loxA* (*loxP*) сайт, находящийся в прямой ориентации по отношению к другому *loxA* (*loxP*) сайту. Плазмиды pICH1567 и pICH9702 содержат *lox*-сайт и беспромоторный *bar* ген в середине конструкции (— *lox* — *bar* — 35S — *lox* —).

Ночную культуру *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101) наращивали в 20 мл жидкой среды LB [13], дополненной 50 мг/л карбенициллина и 100 мг/л рифампицина, в течение 48 ч при 24 °С в темноте. Агробактериальную суспензию (5 мл) осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 4000 об/мин. Осадок ресуспендировали в 20 мл жидкой среды MS [14], содержащей 0,2 мМ ацетосирингон.

Полученную суспензию инкубировали 2—3 ч в тех же условиях и затем проводили сокультивацию растительных эксплантов с агробактерией.

Агробактериальная трансформация. Для агробактериальной трансформации *N. africana* использовали корни асептических растений. Методика трансформации корней *N. africana* описана ранее [12].

Анализ с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Интеграцию чужеродных генов в растительный геном определяли с помощью ПЦР. Согласно методике, предложенной Cheung et al. [15], проводили выделение ДНК из листьев растений, укоренившихся на селективной среде. Для реакции использовали 40 нг ДНК из каждого образца, 0,5 мкМ каждого из праймеров, 0,8 мкМ трифосфатов, 1 ед. Taq ДНК-полимеразы, 1 X ПЦР реакционного буфера, содержащего 50 мМ KCl, 10 мМ Tris-HCl (рН 9 при 25 °С), 0,1 % Triton X-100 и 0,2 мкМ MgCl₂. Общий объем смеси составил 20 мкл. Для амплификации гена *nptII* использовали праймеры 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3' и 5'-CAAGCTCTTCAGCAATATCACG-3', амплифицирующие фрагмент величиной 640 пн. Для амплификации *bar* гена использовали праймеры 5'-CCGTACCGAGCCGCAGGAA C-3' и 5'-CAGATCTCGGTGACGGGCAGGA C-3', амплифицирующие фрагмент величиной 445 пн. Изолированная ДНК из нетрансформированных растений (отрицательный контроль) и плазмидный вектор pICH3737 (положительный контроль) были амплифицированы с теми же праймерами и при тех же условиях. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик ИМ02» («ДНК-технология», Москва). Использовали следующие профили: 94 °С, 1 мин; 55 °С, 1 мин; 72 °С, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °С, 8 мин для *nptII* гена; 94 °С, 1 мин; 65 °С, 72 °С, 1 мин; 33 цикла; в заключение 72 °С, 8 мин для *bar* гена. После этого продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в Tris-фосфатной буферной системе.

Статистическая обработка результатов. Для установления достоверности различий в количестве РРТ-устойчивых трансформированных растений, полученных при трансформации растений различными плазмидами, были про-

ведены статистические сравнения согласно [16]. В тех случаях, когда мы сравнивали приблизительно равное количество трансформантов, ошибку разности между количеством РРТ-устойчивых трансформированных растений вычисляли по формуле для равновеликих выборок (когда численность одной группы отличается от численности другой менее чем на 25 %)

$$S_{\text{фр}} = \sqrt{\frac{m_1 (n_1 - m_1)}{n_1} + \frac{m_2 (n_2 - m_2)}{n_2}},$$

где n_1 и n_2 — число трансформантов для каждой из двух сравниваемых плазмид; m_1 и m_2 — число РРТ-устойчивых трансформированных растений для каждой из двух сравниваемых плазмид.

Поскольку в нашей работе было получено почти в два раза больше растений *N. africana*, трансформированных плазмидой pICH3737, чем растений, трансформированных другими плазмидами, то для сравнения результатов этой группы с другими группами была использована формула для неравновеликих выборок

$$S_{\text{фр}} = \sqrt{\frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2} \left(1 - \frac{m_1 + m_2}{n_1 + n_2}\right) \frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2}}.$$

Затем вычисляли величину $t_{\text{ф}}$ по формуле

$$t_{\text{ф}} = \frac{m_1 - m_2}{S_{\text{фр}}}.$$

Величину $t_{\text{ф}}$, которая имеет распределение Стьюдента, сравнивали с ее критической точкой $t_{\text{кр}}$ для 5%-ного уровня значимости и числа степеней свободы $k = n_1 + n_2 - 2$. При $t_{\text{ф}}$ и $t_{\text{кр}}$ нулевая гипотеза должна быть отвергнута и разность между выборочными долями признана статистически достоверной.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате экспериментов по агробактериальной трансформации растений *N. africana* и *N. tabacum* были получены растения, которые укоренились на безгормональной среде MS, дополненной 50 или 100 мг/л канамицина. Укоренившиеся растения были проанализированы с помощью ПЦР, которая подтвердила наличие *bar* и *nptII* гена в геномах растений (рис. 2 и 3). В каждом варианте опыта было отобрано приблизительно по 30 трансформантов *N. africana* и *N. tabacum*, которые были протес-

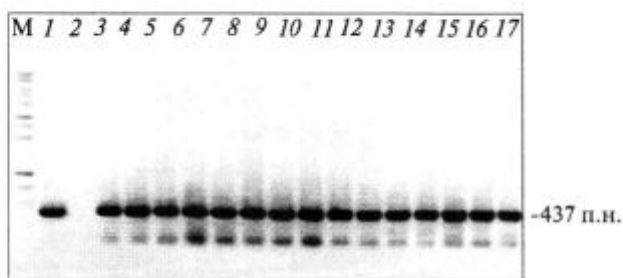


Рис. 2. Результаты ПЦР анализа totalной ДНК трансгенных растений *N. africana* с использованием праймеров для *bar* гена: М — маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); 1 — положительный контроль для *bar* гена, плазмидный вектор рICН3737; 2 — отрицательный контроль, ДНК нетрансформированных растений *N. africana*; 3—17 — ДНК растений-регенерантов *N. africana*, устойчивых к канамицину

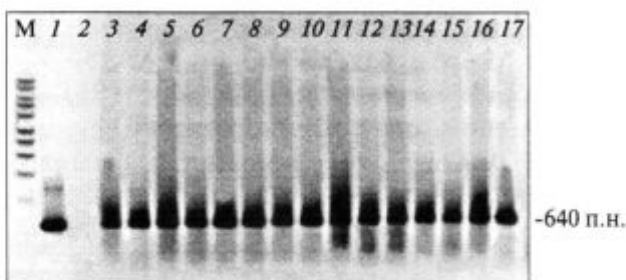


Рис. 3. Результаты ПЦР анализа totalной ДНК трансгенных растений *N. africana* с использованием праймеров для *nptII* гена: М — маркер 1 kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL); 1 — положительный контроль для *nptII* гена, плазмидный вектор рICН3737; 2 — отрицательный контроль, ДНК нетрансформированного растения *N. africana*; 3—17 — ДНК растений-регенерантов *N. africana*, устойчивых к канамицину

тированы на селективной среде, содержащей 5 мг/л фосфинотрицина. Общие результаты представлены на рис. 4. При использовании в экспериментах по трансформации конструкций, содержащих *lox*-сайт возле правого бордера, число растений, в которых происходила экспрессия беспромоторного *bar* гена, составило от 71,8 до 88,4 % общего числа трансформантов. При использовании плазмиды рICН3831, которая также содержит беспромоторный *bar* ген возле правого бордера, но не содержит *lox*-сайта, в экспериментах с *N. africana* РРТ-устойчивых трансгенных растений получено не было, а в экспериментах с *N. tabacum* было получено одно устойчивое растение, что составило 4,5 % общего числа ана-

лизируемых трансформантов. Некоторые трансформанты при использовании любой плазмиды сохраняли зеленую окраску листьев, но характеризовались замедленными темпами роста и не укоренялись на селективной среде. Такие трансформанты были отнесены к группе относительно устойчивых. Сравнивая количество РРТ-устойчивых растений в каждом эксперименте (рис. 5), можно сделать вывод, что посттерминатор, расположенный перед *lox*-сайтом в конструкциях рICН9393 и рICН9414, не повлиял на экспрессию *bar* гена в трансгенных растениях. Процент устойчивых растений в экспериментах с этими плазмидами был даже более высоким, чем в экспериментах с плазмидами рICН3737 и рICН3744. Однако при сравнении результатов этих экспериментов статистическими методами было показано, что на 5%-ном уровне значимости разница между числом РРТ-устойчивых растений, трансформированных плазмидами рICН3737 и рICН9393, а также рICН3744 и рICН 9414, не является статистически достоверной. В то же время можно отметить, что количество РРТ-устойчивых растений было большим при использовании для трансформации плазмид, содержащих дополнительный *lox*-сайт (рICН3744 и рICН9414). Но статистически достоверной является только разница в количестве полученных РРТ-устойчивых трансформированных растений *N. africana* при использовании плазмид рICН9393 и рICН9414.

Очевидной и статистически достоверной является разница между количеством РРТ-устойчивых растений при использовании плазмид, которые в нашем эксперименте послужили контролем (рис. 1, б), при сравнении их с любой другой из конструкций, соответствующих схеме RB—*lox*—*bar*— (рис. 1, а). Напомним, что рICН3831 не содержит *lox*-сайтов, и количество полученных РРТ-устойчивых растений среди этих трансформантов составило всего 4,5 %, а с плазмидами рICН1567, рICН9702, содержащими *lox*-сайт и беспромоторный *bar* ген в середине конструкции, устойчивых растений не было получено вовсе.

Анализируя эти данные, нам кажется логичным предположить, что размещение *lox*-сайта в непосредственной близости от правого бордера T-DNA приводит к стабильной конститу-

тивной экспрессии следующего за ним беспромоторного *bar* гена. Фосфинотрицин является жестким селективным агентом, следовательно, рост и укоренение растений на селективной среде возможны только при высоком уровне экспрессии этого гена. Полученные трансгенные растения устойчивы к селективной концентрации фосфинотрицина и при пересадке в грунт, что подтверждает стабильность и высокий уровень экспрессии. Влияние *lox*-сайта на экспрессию *bar* гена нам кажется очевидным, поскольку такая частота PPT-устойчивых растений не может быть результатом случайного транскрипционного слияния *bar* гена с каким-либо промотором в геноме растения. Результат наших экспериментов существенно отличается от известных нам опубликованных результатов по изучению случайного транскрипционного слияния. В некоторых таких работах частота растений, у которых была задетектирована экспрессия беспромоторного репортерного гена, была достаточно высокой. Так, в работах Koncz et al. [17] в растениях *Arabidopsis thaliana* и *N. tabacum* экспрессию репортерного гена *aph (3)II* наблюдали у 25 % трансформантов. Topping et al. [18] опубликовали результаты трансформации растений разных видов плазмидой, содержащей возле правого бордера ген β-глюкуронидазы без промотора. Частота трансформированных растений, у которых наблюдали экспрессию этого гена в листьях, составила 22 % у табака, 28 % у арабидопсиса и 23 % у картофеля. Еще более высокой экспрессия была в корнях и цветках растений. Но в этой работе были проанализированы все растения, проявившие даже слабые признаки экспрессии репортерного гена в любом из органов растения, и не обсуждается количество трансформантов, у которых экспрессия гена происходит во всем растении. В тех работах, где была поставлена цель поиска конститутивного промотора и учитывались трансформанты с высоким уровнем экспрессии беспромоторного гена, эта цифра была несравнимо меньше. У Foster et al. [19] среди растений табака, трансформированных конструкцией, которая содержит беспромоторный *uidA* ген, только у одной линии из 1000 была задетектирована активность экспрессии *uidA* гена на таком же уровне, как у гена под 35S промотором.

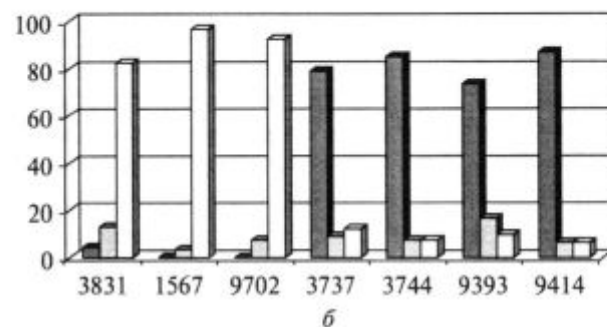
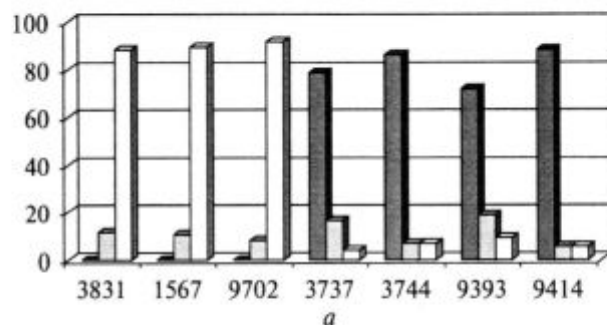


Рис. 4. Результат трансформации растений *N. africana* (а) и *N. tabacum* (б) различными конструкциями, содержащими беспромоторный *bar* ген: по вертикали — число трансформированных растений с определенной степенью устойчивости от общего числа полученных трансформантов, %; по горизонтали — номера плазмид; ■ — растения, устойчивые к PPT; ■ — растения с промежуточной степенью устойчивости; □ — растения, не устойчивые к PPT

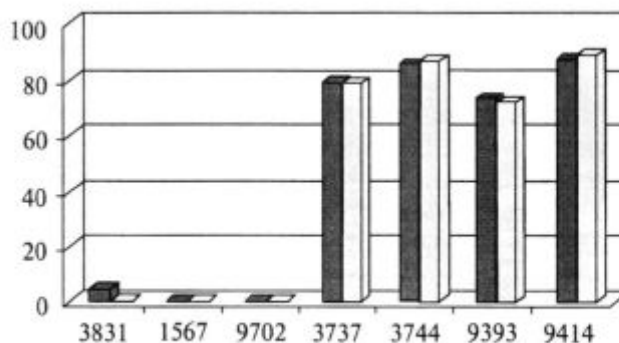


Рис. 5. Количество PPT-устойчивых растений, полученных при агробактериальной трансформации растений *N. africana* и *N. tabacum* конструкциями, содержащими беспромоторный *bar* ген: по вертикали — число PPT-устойчивых растений от общего числа полученных трансформантов, %; по горизонтали — номера плазмид; ■ — *N. tabacum*; ■ — *N. africana*

В работе Ryu et al. [20] в аналогичных условиях экспрессию наблюдали у 4,8 % трансформантов риса. Alvarado et al. [21] наблюдали у арабидопсиса экспрессию беспромоторного *luc* гена у 3,7 % трансформантов. В нашей работе при использовании контрольной конструкции без *lox*-сайта (pICH3831) эта цифра составила 4,5 %.

Тот факт, что при селекции на PPT устойчивыми оказались не все трансгенные растения, а 80 % из них, мы считаем вполне закономерным и обычным при проведении селекции в присутствии сначала одного, а затем другого селективного агента. При такой последовательной селекции часть растений не является устойчивой ко второму селективному агенту даже при наличии конститутивного промотора, контролирующего этот селективный ген. Результаты вполне согласуются с данными, полученными в экспериментах по трансформации растений *N. africana* плазмидами pICH401 и pICH411 [22]. Эти плазмиды также содержали два селективных гена (*nptII* и *bar*), но оба находились под контролем промотора. Изначально селекцию трансформированных растений проводили на канамицине и только затем на среде с фосфинотрицином. При этом около 20 % растений гибли, так как не были устойчивы к фосфинотрицину.

Наличие в конструкции независимого 35S промотора и дополнительного *lox*-сайта создает необходимость исключить факт рекомбинации, при которой *bar* ген попадал бы под контроль 35S промотора в самой плазмиде. Был проведен ПЦР анализ PPT-устойчивых трансформированных растений с целью выявления положения *bar* гена в растительном геноме по отношению к 35S промотору. Праймеры были подобраны так, что при расположении *bar* гена под контролем 35S промотора мы наблюдали бы амплификацию ПЦР фрагмента. ПЦР анализ не обнаружил возможных тандемных повторов или перестроек, в результате которых беспромоторный *bar* ген попадал под контроль 35S промотора, находящегося в плазмиде (данные не приведены). Кроме того, такая рекомбинация не представляется нам возможной, так как ни одна плазида не содержит Cre рекомбиназы, а плазмиды pICH3737 и pICH9393 содержат *lox*-сайты, которые не рекомбинируют между собой.

Полученные данные, на наш взгляд, подтверждают наличие влияния *lox*-сайта, расположенного между правым бордером T-ДНК и стартовым кодоном беспромоторного *bar* гена, на экспрессию этого гена в трансгенных растениях.

SUMMARY. We demonstrate that localization of *lox* site between the right border of T-DNA and promoterless *bar* gene (RB—*lox*—*bar*—) led to its highly efficient expression in transgenic plants of *Nicotiana tabacum* and *N. africana*. Plasmid vectors used in gene integration experiments contained neomycin phosphotransferase II (*npt II*) gene under nos promoter as well. Transgenic plants were selected according to their capacity to grow on the medium with kanamycin and then they were tested on the selective medium containing phosphinothricin. 80 % of transgenic plants expressed *bar* gene at the level similar to that in plants transformed with the *bar* gene under widely used constitutive promoter. Transformation of plants with the plasmid vector containing only promoterless *bar* gene near T-DNA right border (RB—*bar*—) and with the vector containing *lox* site and promoterless *bar* gene in the middle of the construction (—*lox*—*bar*—) led to obtaining no more than 4,5 % of transgenic plants resistant to phosphinothricin. PCR analyses confirmed both the absence of tandem repeats and of plasmid recombination resulting in transference of *bar* gene under promoter in plasmid vector. Nos-terminator situated between the *lox* site and the right border of T-DNA did not decrease *bar* gene expression.

РЕЗЮМЕ. Показано, що локалізація *lox*-сайту в генетичних конструкціях безпосередньо біля правого бордеру T-ДНК (RB—*lox*—*bar*—) зумовлює стабільну експресію наступного за *lox*-сайтом беспромоторного *bar* гена. Використані в роботі генетичні конструкції містять також ген неоміцинофосфотрансферази II (*npt II*) під контролем nos промотора. Трансформовані рослини *Nicotiana tabacum* и *N. africana* були відібрані за здатністю рости на середовищі, що містить канамицин, а потім перевірені на селективному середовищі, що містить фосфінотрицин. У 80 % трансгенних рослин, відібраних за стійкістю до канамицину, експресія *bar* гена проходила на такому ж рівні, як у рослин, трансформованих конструкціями, в яких *bar* ген експресується завдяки сильному конститутивному промотору. При використанні конструкції без *lox*-сайту, в якій беспромоторний *bar* ген розміщений біля правого бордеру T-ДНК (RB—*bar*—), або конструкцій, в яких *lox*-сайт та беспромоторний *bar* ген знаходяться в середині конструкції (—*lox*—*bar*—), частота PPT-стійких рослин склала не більше 4,5 %. Аналіз за допомогою ПЛР не виявив можливих тандемних повторів або рекомбінацій, в результаті яких беспромоторний *bar* ген міг потрапити під контроль промотору, що

міститься в плазміді. При розміщенні у векторі постермінатора між lox-сайтом та правим бордером частота РРТ-стійких трансгенних рослин не змінилась.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кучук Н.В. Генетическая инженерия высших растений. — Киев : Наук. думка, 1997. — 151 с.
2. Selker E.U. Gene silencing: repeats that count // Cell. — 1999. — 97. — P. 157—160.
3. Muskens M.W.M., Vissers A.P.A., Mol J.N.M., Kooter J.M. Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing // Plant Mol. Biol. — 2000. — 43. — P. 243—260.
4. Matzke M.A., Mette M.F., Matzke A.J.M. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates // Plant Mol. Biol. — 2000. — 43. — P. 401—415.
5. Al-Kaff N.S., Kreike M.M., Covey S.N., Pitcher R., Page A.M., Dale P.J. Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene // Nat. Biotechnol. — 2000. — 18. — P. 995—999.
6. Gleba Yu., Klimyuk V., Benning G., Eliby S. Processes and vectors for producing of transgenic plants. WO 02/46440 A2.
7. Dale E.C., Ow D.W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1991. — 88. — P. 10558—10562.
8. Gleave A.P., Mitra D.S., Mudge S., Morris B.A.M. Selectable marker-free transgenic plant without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene // Plant Mol. Biol. — 1999. — 40. — P. 223—235.
9. Corneille S., Lutz K., Svab Z., Maliga P. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the cre-lox site-specific recombination system // Plant J. — 2001. — 27. — P. 171—178.
10. Albert H., Dale E.C., Lee E., Ow D.W. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites planed in the plant genome // Plant J. — 1995. — 7. — P. 649—659.
11. Vergunst C.A., Hooykaas P.J.J. Cre/lox-mediated site-specific integration of Agrobacterium T-DNA in *Arabidopsis thaliana* by transient expression of cre // Plant Mol. Biol. — 1998. — 38. — P. 393—406.
12. Шербак Н.Л., Белокурова В.Б., Комарницкий И.К., Кучук Н.В. Генетическая трансформация растений *Nicotina africana* Мерхт. плазмидами, содержащими сайты рекомбинации lox // Цитология и генетика. — 2004. — 38, № 4. — С. 3—8.
13. Маниатис Т., Фрич Е.Ф., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984. — 521 с.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15. — P. 473—497.
15. Cheung W.Y., Hubert N., Landry B.S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses // PCR Meths Appl. — 1993. — 3. — P. 69—70.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия : Учеб. пособие для биол. спец. вузов. — М.: Высш. школа, 1980. — 293 с.
17. Koncz C., Martin N., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Korber H., Redei G.P., Schell J. High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — 86. — P. 8467—8471.
18. Topping J.F., Lindsey K. Insertional mutagenesis and promoter trapping in plants for the isolation of genes and the study of development // Transgenic Res. — 1995. — 4. — P. 291—305.
19. Foster E., Hattori J., Labbe H., Ouellet T., Fobert P.R., James L.E., Iyer V.N., Miki B.L. A tobacco constitutive promoter, *tCUP*, revealed by T-DNA tagging // Plant Mol. Biol. — 1999. — 41. — P. 45—55.
20. Ryu C.H., You J.H., Kang H.G., Hur J., Kim Y.H. Generation of T-DNA tagging lines with a bidirectional gene trap vector and the establishment of an insertion-site database // Plant Mol. Biol. — 2004. — 54. — P. 489—502.
21. Alvarado M.C., Zsigmond L.M., Kovacs I., Cseplo A., Koncz C., Szabados L.M. Gene trapping with firefly luciferase in Arabidopsis. Tagging of stress-responsive genes // Plant. Physiol. — 2004. — 134. — P. 18—27.
22. Shcherbak N.L., Belokurova V.B., Komarnitsky I.K., Kuchuk N.V. Mobility of the maize suppressor-mutator transposable element in transgenic plants of *Nicotiana africana* // Plant genome : IV Int. conf. — Odesa, 2003. — P. 36.

Поступила 01.09.05