

*На правах рукописи*

**Пермякова Наталья Владиславовна**

**ВСТРАИВАНИЕ ВЕКТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В  
ГЕНОМ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА (*NICOTIANA  
TABACUM L.*) И МОРКОВИ (*DAUCUS CAROTA L.*)**

Генетика – 03.00.15

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск

2008

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
Дейнеко Елена Викторовна  
Институт цитологии и генетики  
СО РАН, г. Новосибирск

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Омельянчук Леонид Владимирович

доктор биологических наук  
Игнатов Александр Николаевич

**Ведущее учреждение:** Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова, г. Москва

Защита состоится 14.05.2008 г. на утреннем заседании Диссертационного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук (Д-003.011.01) при Институте цитологии и генетики Сибирского отделения РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 10. Факс: (383) 333-12-78; e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии и генетики Сибирского отделения РАН.

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2008 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
доктор биологических наук

А.Д. Груздев

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Развитие и совершенствование методов генетической инженерии, а также разработка методов переноса генетического материала в растительную клетку и методов восстановления в условиях *in vitro* из отдельных клеток полноценных трансформантов, позволило модифицировать геномы многих видов растений. Технология создания трансгенных растений основана на переносе генов из различных гетерологичных систем (вирусов, микроорганизмов, животных, человека), поэтому трансгенные растения можно рассматривать как яркий пример преодоления физических, эволюционных и генетических барьеров, изолирующих геномы различных организмов (Miki, McHugh, 2004). Недостатком метода агробактериальной трансформации являются случайные ошибки при процессинге Т-ДНК, в результате которых в растительный геном могут быть интегрированы фрагменты векторной ДНК (ДНК, лежащей за пределами концевых повторов) (Ramanathan, Veluthambi, 1995, van der Graaff *et al.*, 1996, Wenck *et al.*, 1997, De Buck *et al.*, 2000).

К настоящему времени накоплены экспериментальные данные о встраивании векторной ДНК не только в геном двудольных трансгенных растений. При агробактериальной трансформации фрагменты векторной ДНК обнаруживались и в геноме однодольных растений, а также в геномах грибов и дрожжей (Olhoft *et al.*, 2004, Lange *et al.*, 2006, Kim *et al.*, 2003, Michielse *et al.*, 2004, Bundock *et al.*, 2002).

С коммерческой точки зрения перенос векторных последовательностей в геномную ДНК трансгенных растений представляется крайне нежелательным. Содержащиеся в плазмидной ДНК повторы, палиндромы, А-Т-богатые участки, *ori* репликации, содержащиеся в векторной ДНК, способны провоцировать перестройки трансгена (Muller *et al.*, 1999, Linden *et al.*, 1996). Множественные повторы, С-Г богатые прокариотические участки могут метилироваться и вызывать метилирование трансгена, нарушая тем самым его экспрессию (Meza *et al.*, 2002, Matzke *et al.*, 1996, Iglesias *et al.*, 1997, Jakowitsch *et al.*, 1999). Мультимеризованные комплексы, состоящие из нескольких копий Т-ДНК разделенных фрагментами векторной и растительной ДНК, мейотически нестабильны, что может привести к эксцизии трансгена (Srivastava *et al.*, 1996). Присутствие векторных последовательностей затрудняет исследование прилежащих к Т-ДНК участков растительной ДНК и выявление растительных генов, функция которых была нарушена в результате встройки чужеродной инсерции. С точки зрения биобезопасности трансгенные растения не должны содержать генов устойчивости к антибиотикам и других «посторонних» фрагментов ДНК, которые могут быть перенесены вместе с векторной ДНК. В то же время, перенос векторных последовательностей, по-видимому, является частью механизма агробактериальной трансформации, что необходимо принимать во внимание при получении трансгенных растений.

На основе изучения феномена встраивания векторных последовательностей разработаны рекомендации для создания различных генетических конструкций, позволяющих избежать встраивания как фрагментов вектора, так и маркерных генов (Sugita *et al.*, 2000, Hanson *et al.*, 1999, Podevin *et al.*, 2006, Vain *et al.*, 2003, Coutu *et al.*, 2007, Kondrak *et al.*, 2006, Conner *et al.*, 2007).

Понимание феномена встраивания векторных фрагментов в геном трансгенных растений может внести существенный вклад в решение фундаментальных задач. В ряде работ авторами выявлены новые детали механизма процессинга Т-ДНК и взаимодействия белков, участвующих в процессинге (Ramanathan Veluthambi, 1995, Wenck et al., 1997, Yin, Wang 2000, De Buck et al., 2000, McCormac et al., 2001, Michielse et al., 2004, Podevin et al., 2006). Однако, несмотря на очевидный прогресс данного научного направления, остается еще много неясных вопросов. Поэтому изучение феномена встраивания векторных последовательностей в геном трансгенных растений, исследование механизмов встраивания таких фрагментов, а также изучение спектра факторов, влияющих на частоту встраивания векторных фрагментов у различных видов трансгенных растений, представляется чрезвычайно актуальным.

**Цель и задачи настоящего исследования.** Целью настоящего исследования являлось изучение частоты и особенностей встраивания векторных последовательностей у трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) и моркови (*Daucus carota* L.). Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести ПЦР-анализ на присутствие различных участков векторной последовательности мегаплазмиды *A.tumefaciens* у трансгенных растений табака и моркови.

2. Подтвердить наличие векторных последовательностей в геномных ДНК анализируемых трансгенных растений посредством секвенирования районов ДНК, прилежащих к Т-ДНК-инсерциям.

3. Установить количество копий Т-ДНК в исследуемых трансгенных растениях методом Саузерн блот гибридизации.

4. Установить характер взаиморасположения фрагментов векторной, растительной и Т-ДНК для отдельных растений, несущих несколько фрагментов векторной ДНК.

5. Проанализировать наследование векторных фрагментов в T<sub>1</sub>-поколении трансгенных растений.

**Научная новизна и практическая ценность.** Настоящая работа направлена на изучение особенностей встраивания векторных фрагментов в геном трансгенных растений табака и моркови, а также на выявление частотных характеристик исследуемого явления у двух видов растений и анализ сохранения фрагментов векторных ДНК среди потомков на примере трансгенных растений табака. Охарактеризована популяция независимо полученных трансформантов табака и моркови по наличию в геноме фрагментов векторных ДНК, установлено доленое соотношение групп растений с различными видами фрагментов. Установлено, что для трансгенных растений табака доля растений, в геноме которых были выявлены фрагменты векторных ДНК, составила 35.2%, а для трансгенных растений моркови – 34.9%. В сумме для трансгенных растений табака и моркови доля растений, в геноме которых выявлялись фрагменты векторных ДНК различной конфигурации, составила 35.1%.

Следует отметить, что отсутствие различий по частоте встраивания векторных фрагментов между различными видами трансгенных растений отмечено в литературе (Wenck *et al.*, 1997). Однако в работе Венк выявлялась

значительно более высокая частота встраивания векторной ДНК в геном трансгенных растений табака и арабидопсиса (60% и 62% соответственно). Более того, даже если рассматривать работы различных групп исследователей на одном виде трансгенных растений (*N. tabacum*), варибельность частот встраивания достаточно высокая, от 1,3% (Ramanathan, Veluthambi, 1995) до 75,0% (Kononov *et al.*, 1997). Эти данные свидетельствуют о существовании неизвестных пока факторов влияющих на частоту встраивания векторных фрагментов и безусловно требуют дальнейшего изучения.

Выявлен широкий спектр вариантов взаиморасположения векторных фрагментов в геноме анализируемых трансгенных растений, представленный 20 вариантами. Среди растений, содержащих в геномной ДНК векторные фрагменты различной длины, интегрированные независимо от Т-ДНК выявлено два растения (табак и морковь), несущих не только фрагмент вектора, интегрировавшийся в растительный геном независимо от Т-ДНК, но также и фрагмент вектора, прилежащий к левому концевому повтору Т-ДНК. Такие растения были выявлены впервые. Чрезвычайный интерес представляет механизм образования такого сочетания Т-ДНК и векторных фрагментов. В данном случае могло иметь место одновременно неправильное определение концевых повторов, а также и реорганизация (делеция) векторной ДНК в процессе ее транспорта и интеграции в растительный геном. Дальнейшее изучение данных растений представляет несомненный интерес для более детального понимания молекулярно-генетических механизмов встраивания векторной ДНК. Полученные результаты представляют большое значение для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований по изучению механизмов агробактериального инфицирования растений.

Установлено, что векторные последовательности не только могут быть перенесены в геном потомков первого поколения от самоопыления, но могут рекомбинировать и сегрегировать как обычные гены растений. Хотя ранее предполагалось, что мультимерные комплексы, состоящие из нескольких копий Т-ДНК перемежающихся векторной и растительной ДНК, мейотически нестабильны, и, соответственно, в последующих поколениях растений может произойти их эксцизия и потеря трансгена (Srivastava *et al.*, 1996).

Полученные результаты представляют большое значение при разработке и уточнении правил по биобезопасности использования генетически модифицированных организмов.

Данные, полученные в ходе исследования, используются при чтении лекций в курсе «Генетическая инженерия растений» в Томском государственном университете.

#### **Положения выносимые на защиту.**

1. В геномную ДНК трансгенных растений табака и моркови, полученных методом агробактериального переноса, могут быть встроены нежелательные последовательности векторной ДНК, лежащей за пределами концевых векторных повторов Т-ДНК. Векторные последовательности могут быть различной длины и по разному ориентированы относительно Т-ДНК.

2. Векторные последовательности, встроившиеся в геном трансгенных растений, становятся резидентной частью генома и могут быть выявлены среди потомства.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы были представлены на следующих конференциях: в виде устного доклада на международной научной конференций «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология», Минск, 24-26 ноября 2004, где доклад был удостоен диплома «За высокопрофессиональный доклад»; на Дальневосточной молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, 16-23 сентября 2005 г., МЭС ТИБОХ; на школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной генетики» при Международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 40-летию Института общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН Москва, 28 июня - 2 июля 2006 г.; в виде устного доклада на международной конференции «Достижения и проблемы генетики, селекции и биотехнологии», посвященной 40-летию основания Украинского общества генетиков и селекционеров и 120-летию со дня рождения Н. И. Вавилова, Алушта, 24-27 сентября 2007 года. Материалы диссертационной работы были представлены в виде устных докладов на отчетных сессиях ИЦиГ СО РАН в 2004, 2007 г.г.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 2 в российских рецензируемых журналах. Одна работа находится в печати.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (117 наименований). Работа изложена на 98 страницах, включает 14 рисунков и 8 таблиц в тексте диссертационной работы.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исходным материалом служили трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. и моркови *Daucus carota* L., полученные в лаборатории ранее. Для получения трансгенных растений табака использовали линию SR1 (семена любезно предоставлены доктором Р. Менделем, Институт генетики и растительных ресурсов (IPR), Гатерслебен, Германия). Для получения трансгенных растений моркови использовали семена моркови сорта «Нантская» (семена любезно предоставлены Шмыковой Н.А., ВНИИСОК РАСХН, Москва). Трансформанты табака получали стандартным методом агробактериальной трансформации листовых дисков по стандартной методике (Дрейпер и др., 1991) с использованием штамма *A. tumefaciens* C58C1 Rif<sup>R</sup> (PGV 2260) (Deblaere *et al.*, 1987). Трансформанты моркови получали методом агробактериальной трансформации каллусов (Yakushenko *et al.*, 2006), с использованием штаммов *A. tumefaciens* C58C1 (Deblaere *et al.*, 1987), GV2260 (McBride, Summerfelt, 1990), AGL-1 (Lazo, *et al.*, 1991), LBA4404 (Ноекма *et al.*, 1983), штаммы получены из Центра Биоинженерии РАН (Москва). Для трансформации табака были использованы различные типы генетических конструкций, сконструированных в секторе геномной инженерии растений ИЦиГ СО РАН М.В. Пилюгиным и к.б.н. А.В. Кочетовым (1991-1995 гг.). Для трансформации моркови была использована

генетическая конструкция, сконструированная в лаборатории А.А. Турчиновичем с соавторами (патент РФ №2302460).

Выделение геномной ДНК из листьев табака проводилось с помощью ЦТАБ-буфера (Rogers, Bendich, 1985; с модификациями).

Гибридизацию *EcoRI* и *HindIII*-гидролизатов ДНК трансгенных растений проводили по методу Саузерна с модификациями (Дрейпер и сотр., 1991).

Для установления частоты встраивания векторных последовательностей в геном трансгенных растений проводились ПЦР с различными праймерами. Праймеры на фрагмент векторной ДНК, прилежащий к правому концевому повтору Т-ДНК: BD1 5'-acgtgaaacccaacatacc-3' и BD2 5'-atgtgcatgccaaggacag-3'. Праймеры на фрагмент векторной ДНК, прилежащий к левому концевому повтору Т-ДНК: BD3 5'-gatacaggcagccatacgtc-3' и BD4 5'-tagcgccactcagcttctcag-3'. Праймеры на фрагмент векторной ДНК, находящийся в середине векторной последовательности, ближе к левому концевому повтору: BD5 5'-gcaatgaagtcggtccc-3' и BD6 5'-gccgacaagtggatgac-3'. Праймеры на фрагмент векторной ДНК, находящийся в середине векторной последовательности, ближе к правому концевому повтору Т-ДНК: BD7 5'-cgccatgaagtccgtgaatg -3' и BD8 5'-agttatgccgtcccgtgaat -3'. Праймеры на фрагмент векторной ДНК, находящийся в середине векторной последовательности, ближе к левому концевому повтору Т-ДНК: BD9 5'-ctgacgccgttgatacac-3' и BD10 5'-taatggcggaactcactcg-3', размер фрагмента: 419 пн.

Для подтверждения трансгенного статуса, а также наличия в исследуемых образцах геномной ДНК соответствующих растений табака и моркови, одновременно в реакциях амплификации участвовали следующие типы праймеров - на ген *nptII*: npt1 5'-cgacgttgactgaagcg-3' и npt2 5'-aagcacgaggaagcggtcag-3'; на хозяйский ген *NtGA2* табака: NtGA1 5'-acagttgcccttgcttatcg-3' и NtGA2 5' - ttcaacacgaacggaacagac-3'; на хозяйский ген экстенсина моркови: car1 5'- acctctctctcaccactac- 3' и car2 5'- taagttggcctccatcagtgtc- 3'.

Для того чтобы исключить присутствие в анализируемых образцах почвенной бактерии *A. tumefaciens*, дополнительно проводился ПЦР с праймерами на фрагмент ДНК *A. tumefaciens*: A<sub>1</sub> 5'-catgctcggccggctgaca-3', A<sub>2</sub> 5'-tgccgacggtcgttgcctc-3'.

Клонирование и секвенирование фрагментов векторной ДНК проводилось модифицированным методом «инвертированной» ПЦР (Ochman, 1990). Праймеры, использованные для секвенирования: BD1.1 5'-taacgcgcaagtttcagcg-3', BD3.1 5'-tggcgtaatagcgaagaggc-3', pbi1 5'-gacctgcagtctcatattcacttcaatcc-3', pbi2 5'-gatggatccataaattcccctcggtatcca-3', pbi3 5'-gacctgcagtcgttccccgccttcagt-3', pbi4 5'-gatggatccttaattctccgctcatgac-3', pbi5 5'-gacggatccactacgtgaaccatcac-3', pbi6 5'-cacggatccgtctatcagggcgatgg-3', pbi7 5'-gacggatccaacgtccgcaatgtgttattaag-3', pbi8 5'-cacaagcttgcctcactggtga-3'.

Нуклеотидные последовательности клонированных фрагментов ДНК определяли с использованием «ABI PRISM Big Dye Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit» (Amersham, UK) в межинститутском центре секвенирования (ИХБиФМ СО РАН). Полученные с помощью секвенирования последовательности ДНК были проанализированы методом BLAST по базе

данных GenBank. О степени сходства (различия) состава нуклеотидных последовательностей фрагментов, прилежащих к одному и тому же краевому повтору, для растения 16.83 судили на основании выравнивания, построенного при помощи программы ClustalW.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Анализ частоты встраивания векторных фрагментов в геном трансгенных растений

На рисунках 1 и 2 представлены электрофореграммы разделения продуктов амплификации геномной ДНК трансгенных растений табака. На рисунке 1 представлена электрофореграмма разделения продуктов амплификации геномной ДНК трансгенных растений табака с праймерами BD1/2, BD3/4 и BD5/6 (электрофореграммы разделения продуктов амплификации геномной ДНК моркови, выглядят аналогично, за исключением фрагмента именно геномной ДНК моркови). В каждой реакции амплификации участвовало одновременно три пары праймеров. Фрагменты геномной ДНК, обозначенные на дорожках буквой “а”, соответствуют гену *NtGA2*, что подтверждает наличие в образцах геномной ДНК из растений табака. Продукты амплификации, обозначенные на дорожках буквой “б”, соответствуют маркерному гену *nptII*, что свидетельствует о трансгенном статусе анализируемых растений. Продукты амплификации, обозначенные буквами “в”, “г”, “д”, соответствуют фрагментам векторной ДНК: “в” – фрагменту BD1/2, “г” – фрагменту BD5/6, “д” – фрагменту BD3/4.

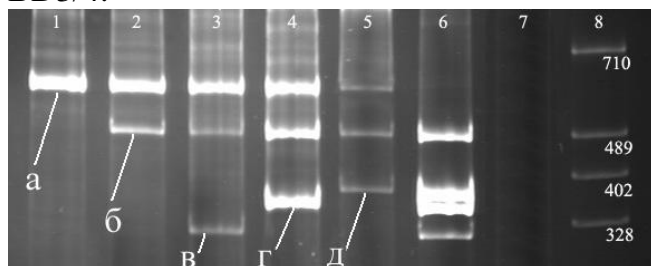


Рис. 1. Взаиморасположение фрагментов, получаемых в результате ПЦР реакции и их последующего разделения методом электрофореза в 6% акриламидном геле. Обозначения: а - фрагмент гена *NtGA2* из генома табака; б - фрагмент гена *nptII*;

в - векторный фрагмент BD1/2; г - векторный фрагмент BD5/6; д - векторный фрагмент BD3/4. Дорожки: 1 - ДНК нетрансгенного растения табака линии SRI; 2 - ДНК трансгенного растения Res 36; 3 - 5 - ДНК трансгенного растения 16.22; 6 - ДНК плазмиды pVi121; 7 - отрицательный контроль, без матрицы; 8 - маркер pBluescript/*mspI*, указана длина каждого фрагмента.

На рисунке 2 представлена электрофореграмма разделения продуктов амплификации геномной ДНК трансгенных растений табака с праймерами BD7/8 и BD9/10. Фрагмент геномной ДНК, обозначенный на дорожке буквой «а», соответствует гену *NtGA* из генома табака. Продукты амплификации, обозначенные на дорожке буквой «в», соответствуют маркерному гену *nptII*. Продукты амплификации, обозначенные буквами «б» и «г», соответствуют фрагментам векторной ДНК («б» - фрагменту BD7/8, «г» - фрагменту BD9/10).



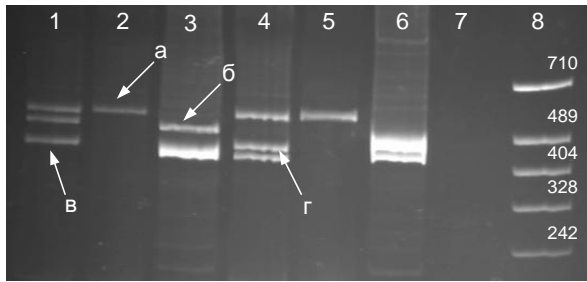


Рис. 2. Взаиморасположение фрагментов, получаемых в результате ПЦР реакции и их последующего разделения методом электрофореза в 6% акриламидном геле. Обозначения: а - фрагмент гена *NtGA* из генома табака; б - векторный фрагмент BD7/8; в - фрагмент гена *npIII*;

г - векторный фрагмент BD9/10. На дорожках 1-3 продукты амплификации с праймерами на векторный фрагмент BD7/8: 1 - ДНК трансгенного растения табака Res79; 2 - ДНК нетрансгенного растения табака, линии SRI; 3 - положительный контроль, ДНК плазмиды pBi121. На дорожках 4-6 продукты амплификации ПЦР с праймерами на векторный фрагмент BD9/10: 4 - ДНК трансгенного растения табака Res60; 5 - ДНК нетрансгенного растения табака; 6 - положительный контроль, ДНК плазмиды pBi121; 7 - отрицательный контроль, без матрицы; 8 - маркер pBlueskript/*mspI*, указана длина каждого фрагмента.

При тестировании анализируемых образцов с праймерами на фрагмент ДНК почвенной бактерии *A.tumefaciens* ни в одном растении не было выявлено последовательностей агробактерии, что подтверждало отсутствие агробактерии в межклетниках исследуемых растений.

Для растений моркови 33/2 и 106, а также для растения табака 16.83 встраивание векторных последовательностей было подтверждено с помощью секвенирования. Выравнивание методом BLAST последовательностей ДНК, прилегающих к левому краевому повтору, секвенированных из растений 16.83 и 106, с базой данных GenBank показало гомологию 99% с участком плазмиды pBi121. Выравнивание для растения табака 16.83 представлено на рисунке 3.

16.83	7	GGATATATTTGGCGGGTAA-CCTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAGAAATAATCGGATATTTA	65
pBi121	8696	GGATATATTTGGCGGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAGAAATAATCGGATATTTA	8755
16.83	66	AAAGGGCGTGAAAAGGTTTATCCGTTTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACACAGGGTT	125
pBi121	8756	AAAGGGCGTGAAAAGGTTTATCCGTTTCGTCCATTTGTATGTGCATGCCAACACAGGGTT	8815
16.83	126	CCCCAGATCTGGCGCCGGCCAGCGAGACGAGCAAGATTGGCCGCGCCGCCGAAACGATCCG	185
pBi121	8816	CCCCAGATCTGGCGCCGGCCAGCGAGACGAGCAAGATTGGCCGCGCCGCCGAAACGATCCG	8875
16.83	186	ACAGCGCGCCSAGCACAGGTGCGCAGGCAAAATTGCACCAACGCATACAGCGCCAGCAGAA	245
pBi121	8876	ACAGCGCGCCSAGCACAGGTGCGCAGGCAAAATTGCACCAACGCATACAGCGCCAGCAGAA	8935

Рис. 3. Выравнивание последовательностей плазмиды pBi121 и последовательности, взятой из трансгенного растения табака 16.83.

Общее число проанализированных трансгенных растений составило 114, из которых 71 были представлены трансгенными растениями табака и 43 - трансгенными растениями моркови.

Все трансгенные растения табака были трансформированы с использованием штамма агробактерии pGV2260. Для трансформации табака было использовано 4 типа векторов, созданных на основе плазмид pBi121 (pBi-

(Glu)2-R – линия 10, 20 растений; pBi-(Glu)2-D – линия 16, 21 растение; неизменная pBi121 - линия 121, 24 растения) и pBi101 (линия Res, 6 растений). Векторные фрагменты различной длины были выявлены у 25 (35,2%) трансгенных растений табака.

Среди 71 трансгенного растения табака 13 несли различные инсерционные мутации. С использованием критерия  $\chi^2$  была проверена гипотеза о существовании корреляции между встраиванием векторных фрагментов и возникновением инсерционных мутаций. Достоверных различий между группами трансгенных растений табака, содержащих и не содержащих инсерционные мутации, выявлено не было ( $\chi^2 = 0,074$ ). Следовательно, возникновение инсерционных мутаций в нашем случае не зависело от частоты встраивания векторных фрагментов в геном трансгенных растений.

Растения моркови были трансформированы с использованием различных штаммов агробактерии – 7 растений со штаммом AGLO, 11 растений со штаммом pGV2260, 25 растений со штаммом LBA 4404. Все растения моркови были трансформированы с использованием вектора pBi101, содержащим целевой ген интерлейкина 18 человека. Векторные фрагменты различной длины были выявлены у 15 (34,9%) трансгенных растений моркови.

Вся последовательность использованной для трансгенеза растений плазмиды pBi121 составляет 14758 пн. Плазида pBi101 отличается от плазмиды pBi121 организацией района T-ДНК, векторные участки у обеих плазмид имеют одинаковое происхождение и не отличаются между собой. Общая длина векторной (не-T-ДНК) последовательности составляет 8600 пн. Правый и левый краевые повторы T-ДНК в плазмиде pBi121 находятся на позициях 2454-2478 пн и 8621-8646 пн соответственно. За пределами краевых повторов T-ДНК находятся 8 генов (размером от 272 пн до 1482 пн) и 2 *ori* репликации. Следовательно, даже самые малые фрагменты векторной ДНК могут нести плазмидный ген.

Достоверные различия с использованием критерия  $\chi^2$  между группами трансгенных растений табака и моркови по частоте встречаемости фрагментов векторной ДНК не выявлялись ( $\chi^2 = 0,001$ ), что послужило основанием объединения в таблицах 1 и 2 результатов по двум выборкам. В таблицах 1 и 2 приведены данные распределения векторных последовательностей у 114 независимо полученных трансгенных растений табака и моркови с праймерами BD1/2, BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10. Всего было выявлено 20 типов фрагментов векторной ДНК. Векторные последовательности были обнаружены у 41 из 114 проанализированных растений, что составило 35,1%.

В таблице 1 представлены данные, отражающие особенности встраивания фрагментов плазмидной ДНК, прилежащих к правому и левому краевым повторам T-ДНК.

По результатам исследования было выявлено 6 растений, несущих все исследуемые фрагменты вектора, что составило 5,2% от общего числа растений.

Всего было выявлено 13 растений, несущих участок вектора, прилежащий к левой границе T-ДНК, что составило 11,4% от общего числа проанализированных растений. Среди них было выявлено 6 растений (5,2%), содержащих фрагмент векторной ДНК длиной от 3200 пн до 5200 пн (BD3/4,

BD5/6). Четыре растения (3,5%) содержали небольшой участок вектора длиной от 400 пн до 2900 пн (BD3/4). Два растения (1,8%) содержали протяженную векторную последовательность длиной от 7220 пн до 7930 пн (BD3/4, BD5/6, BD7/8, BD9/10). Одно растение (0,9%) содержало участок вектора длиной от 5820 пн до 6800 пн (BD3/4, BD5/6, BD7/8). Растений, несущих участок вектора, прилежащий к правой границе Т-ДНК, было выявлено 5, что составило 4,5% от общего числа проанализированных. Среди них было выявлено 3 (2,6%) растения, несущих короткий фрагмент вектора, длиной от 600 пн до 1380 пн (BD1/2). Выявлено одно растение (0,9%), несущее фрагмент вектора средней длины от 1780 пн до 2790 пн (BD1/2, BD9/10) и одно растение (0,9%), несущее фрагмент вектора длиной от 5700 пн до 8150 пн (BD1/2, BD9/10, BD7/8, BD5/6).

Таблица 1. Сводная таблица. Распределение векторных последовательностей, прилежащих к границам Т-ДНК в геномах трансгенных растений табака и моркови



Доля трансгенных растений, несущих различные фрагменты векторной ДНК, %	Фрагменты ДНК, выявленные с использованием следующих пар праймеров:					Расположение векторных последовательностей относительно Т-ДНК
	BD 3/4	BD 5/6	BD 7/8	BD 9/10	BD 1/2	
5,2% (6*)	+	+	+	+	+	
1,8% (2)	+	+	+	+		Векторная последовательность, прилежащая к левой границе Т-ДНК 
0,9% (1)	+	+	+			
5,2% (6)	+	+				
3,5% (4)	+					
Всего 11,4% (13) растений						
0,9% (1)		+	+	+	+	Векторная последовательность, прилежащая к правой границе Т-ДНК 
0,9% (1)				+	+	
2,6% (3)					+	
Всего 4,4% (5) растений						
0,9% (1)	+	+	+		+	Векторные последовательности прилежащие как к левой, так и к правой границе Т-ДНК 
0,9% (1)	+	+			+	
2,6% (3)	+	+		+	+	
1,8% (2)	+		+	+	+	
0,9% (1)	+			+	+	
Всего 7,0% (8) растений						
Всего 28,1% (32) из 114 проанализированных растений						

\*- в скобках указано число растений, несущих тот или иной фрагмент.

Векторные последовательности, прилежащие как к правой, так и к левой границам Т-ДНК, были выявлены у 8 растений (7,0%) в 5 различных вариантах (табл. 3.2). У 3 растений (2,6%) размер фрагмента, прилежащего к левой границе Т-ДНК (BD3/4 и BD5/6), составил от 3200 пн до 5200 пн. и размер фрагмента, прилежащего к правой границе Т-ДНК (BD1/2, BD9/10) составил от 1780 пн до

2790 пн. Выявлено два растения (1,8%), несущих два фрагмента векторной последовательности, один из которых, размером от 400 пн до 2900 пн (BD3/4), обнаружен у левой границы Т-ДНК, и второй, размером от 3330 пн до 5350 пн (BD1/2, BD9/10, BD7/8) – у правой границы Т-ДНК. Также выявлено 1 растение (0,9%), несущее 2 фрагмента вектора, один из которых прилежит к левой границе Т-ДНК (BD3/4, BD5/6, BD7/8), длиной от 5820 пн до 6800 пн, а второй прилежит к правой границе Т-ДНК (BD1/2), длиной от 600 пн до 1380 пн. Еще 1 растение (0,9%) включало два других фрагмента векторной последовательности, один из которых, длиной от 3200 пн до 5200 пн (BD3/4, BD5/6), прилежит к левому краевому повтору, а второй длиной от 600 пн до 1380 пн (BD1/2), прилежит к правому краевому повтору. Выявлено 1 растение (0,9%), несущее следующие фрагменты векторной ДНК: фрагмент длиной от 400 пн до 2900 пн (BD3/4), прилежащий к левому краевому повтору, и фрагмент длиной от 1780 пн до 2790 пн (BD1/2, BD9/10), прилежащий к правому краевому повтору.

Таблица 2. Распределение векторных последовательностей, встроившихся в геном трансгенных растений табака и моркови, независимо от Т-ДНК

Доля трансгенных растений, несущих различные фрагменты векторной ДНК, %	Фрагменты ДНК, выявленные с использованием следующих пар праймеров:					Расположение векторных последовательностей относительно Т-ДНК
	BD3/4	BD5/6	BD7/8	BD9/10	BD1/2	
0,9% (1*)	+	+		+		<p>Векторные последовательности, прилежащие к левой границе Т-ДНК и фрагмент вектора, встроившийся</p> 
0,9% (1)	+			+		
Всего 1,8% (2) растений						
1,8% (2)		+				<p>Фрагменты вектора, встроившиеся независимо от Т-ДНК</p> 
0,9% (1)			+			
0,9% (1)			+	+		
0,9% (1)		+	+			
0,9% (1)		+	+	+		
Всего 5,2% (6) растений						
Всего 7,0% (8) из 114 исследованных растений						

\*- в скобках указано число растений несущих тот или иной фрагмент.

В таблице 2 представлены частоты встраивания фрагментов вектора независимо от Т-ДНК. По результатам нашего исследования было выявлено 8 растений, несущих фрагмент вектора, встроившийся независимо от Т-ДНК, что составило 7,0% от общего числа растений. Среди них было выявлено 2 растения (1,8%), содержащих кроме фрагмента векторной последовательности, прилежащего к левому краевому повтору, еще и последовательность вектора, встроившуюся независимо от Т-ДНК. Одно растение (0,9%) содержало конструкцию, состоящую из участка вектора, прилежащего к левому краевому повтору, длиной от 3200 пн до 5200 пн (BD3/4, BD5/6), и участка плазмидной последовательности, встроившегося независимо от Т-ДНК, длиной от 420 пн до 2200 пн (BD 9/10). Второе растение несло конструкцию, состоящую из фрагмента плазмидной ДНК, прилежащего к левому краевому повтору, длиной от 400 пн до

2900 пн (BD3/4) и участка векторной ДНК, встроившегося независимо, длиной от 420 пн до 2200 пн (BD9/10).

Растений, содержащих только один фрагмент векторной ДНК, встроившийся независимо от Т-ДНК, выявлено 6 (5,2%). Из них 2 (1,8) содержали участок векторной ДНК длиной от 330 пн до 4750 пн (BD5/6). Еще одно растение (0,9%) содержит большой участок векторной ДНК длиной от 4300 пн до 7500 пн (BD5/6, BD7/8, BD9/10). Также по одному растению (0,9%) содержали либо фрагмент векторной ДНК длиной от 560 пн до 3570 пн (BD7/8), либо фрагмент векторной ДНК длиной от 2500 пн до 4760 пн (BD7/8, BD9/10), либо фрагмент векторной ДНК длиной от 2930 пн до 6350 пн (BD5/6, BD7/8).

По данным литературы частота переноса векторных последовательностей в геном трансгенных растений сильно варьирует. У двудольных частоты встраивания векторных последовательностей варьируют весьма значительно от 1,3% у *Nicotiana tabacum* (Ramanathan Veluthambi, 1995) до 90,0% у *Fragaria ananassa* (Abdal-Aziz *et al.*, 2006). У однодольных растений процент переноса векторных последовательностей примерно одинаков и составляет по различным источникам около 30,0% (Martineae *et al.*, 1994, Yin, Wang, 2000, Fang *et al.*, 2001). Однако, у различных видов трансгенных растений, исследуемых в одном эксперименте, частота встречаемости векторных последовательностей от вида к виду обычно не различается (De Buck *et al.*, 2000, Wenck *et al.*, 1997). Это подтверждается и нашими исследованиями. Полученная нами частота встраивания векторных последовательностей достоверно не отличалась у двух видов исходных трансгенных растений. Данные свидетельствуют о том, что в каждом третьем случае (35,1%) в трансгенное растение может переноситься и встраиваться не только Т-ДНК, но и фрагменты плазмидной ДНК.

Присутствие в трансгенных растениях всех исследуемых векторных фрагментов (5,2%) может свидетельствовать о встраивании всей векторной последовательности целиком. Образование такого фрагмента могло произойти в результате ошибки узнавания либо левого, либо правого концевых повторов. Однако такая картина может сложиться и при наличии в одном растении нескольких Т-ДНК встроенок, содержащих усеченные фрагменты векторной последовательности, сочетание которых дает при ПЦР анализе все три исследуемые фрагмента. По данным литературы частота встраивания всей векторной последовательности варьирует от 38,6% (Kim *et al.*, 2003) до 6,8% (van der Graaff, 1996) и 8,0% (de Buck, 2000). В ряде работ (Miranda, 1992, McCormac *et al.*, 2001, Kuraya *et al.*, 2004) выдвигается предположение, что иногда синтез нити Т-ДНК не останавливается на левой границе Т-ДНК, а продолжается дальше, «проскакивая» левый концевой повтор, в результате чего синтезируется вся последовательность плазмиды. Более того, при «проскакивании» также и правого концевого повтора может снова начаться синтез Т-ДНК. В таком случае в геноме трансгенного растения будет выявлено две копии Т-ДНК, соединенных между собой векторной последовательностью (Wenck *et al.*, 1997).

Мы предполагаем, что большая часть этих фрагментов действительно образуется вследствие ошибки определения левого краевого повтора. В пользу этого предположения свидетельствует то, что из всех 41 (35,1%) обнаруженных нами растений, несущих векторные фрагменты, 23 (20,2%) несли векторные

фрагменты, прилежащие к левому концевому повтору и только 13 (11,4%) несли векторные фрагменты, прилежащие к правому концевому повтору. Более того, среди растений, содержащих векторную последовательность, прилежащую к левому концевому повтору, выше разнообразие схем встраивания (12 схем, таблицы 1 и 2), чем у растений, содержащих векторную последовательность, прилежащую к правому концевому повтору (8 схем, таблицы 1 и 2). Полученные результаты дают основание сделать вывод, что растения, несущие фрагменты вектора, прилежащие к левому концевому повтору, как и растения, несущие все пять векторных фрагментов, образуются в результате ошибок определения левого концевого повтора при процессинге Т-ДНК. Полученные нами данные согласуются с данными литературы о том, что осуществление точного надреза в области правого концевого повтора является важным этапом процессинга Т-ДНК (Tinland 1996, Meza *et al.*, 2002, Podevin *et al.*, 2006). По крайней мере, одно из трансгенных растений (Res 66), несущих все векторные фрагменты, несет только одну копию Т-ДНК, соответственно мы полагаем, что в данном случае произошло именно встраивание всей последовательности вектора, прилежащей к левому концевому повтору Т-ДНК.

Векторные последовательности могут переноситься не только вместе с Т-ДНК, но и независимо от нее (Ramanathan, Veluthambi, 1995, Kononov *et al.*, 1997, De Buck *et al.*, 2000, Yin, Wang, 2000). При исследованиях трансформантов риса было выявлено 4,9% растений, содержащих только фрагмент, происходящий из средней части вектора, и не содержащих при этом последовательностей вектора, прилежащих к границам Т-ДНК (Yin, Wang 2000). Предполагается, что такой фрагмент был перенесен и встроен независимо от Т-ДНК (Yin, Wang, 2000). В нашем исследовании таких фрагментов было выявлено в два раза больше, то есть 8, что составило 7,0%. Предполагаемый механизм образования подобных конструкций следующий: при процессинге Т-ДНК белок VirD2 после разрезания нити ДНК тесно связан не только с 5' концом Т-нити, но и с 5' концом не-Т-ДНК-овой части векторной последовательности. Таким образом, белок VirD2 может инициировать перенос векторной части плазмиды, также как и Т-ДНК (De Buck *et al.*, 2000). Можно предположить, что частота переноса векторных фрагментов, независимых от Т-ДНК, при агробактериальной трансформации может быть еще выше. Так как часть трансформированных растений может нести только фрагмент вектора и не нести Т-ДНК, то при селективном отборе эти растения будут элиминированы.

Высоким оказалось также и число растений, содержащих два фрагмента векторной последовательности. Таких растений было выявлено 10, причем 8 из них несли последовательности вектора, прилежащие как к правому, так и к левому крайним повторам. В данном случае возможно несколько вариантов расположения участков вектора, они могут как окружать одну копию Т-ДНК, так и прилежать к нескольким копиям Т-ДНК, встроившимся в геном растения независимо друг от друга. Среди растений, содержащих два различных фрагмента Т-ДНК, были выявлены как растения, содержащие 1 копию Т-ДНК (121,83 и 121,86), так и растения, содержащие 2 копии Т-ДНК (16,22 и 16,83). Таким образом, мы считаем, что могут иметь место все возможные способы

взаиморасположения векторных фрагментов относительно Т-ДНК, которые будут более подробно рассмотрены в следующем разделе.

## 2. Особенности встраивания векторных фрагментов в геном трансгенных растений

Часть выявленных нами растений, несущих несколько фрагментов векторной ДНК, была исследована более детально.

Растение 16.83, как и растение 16.22, несет два фрагмента векторной последовательности, которые прилежат как к левому, так и к правому концевым повторам, при исследовании методом Саузерн блот гибридизации у этих растений в геномной ДНК было выявлено две копии Т-ДНК (рис. 4, дорожки 16.83 и 16.22).

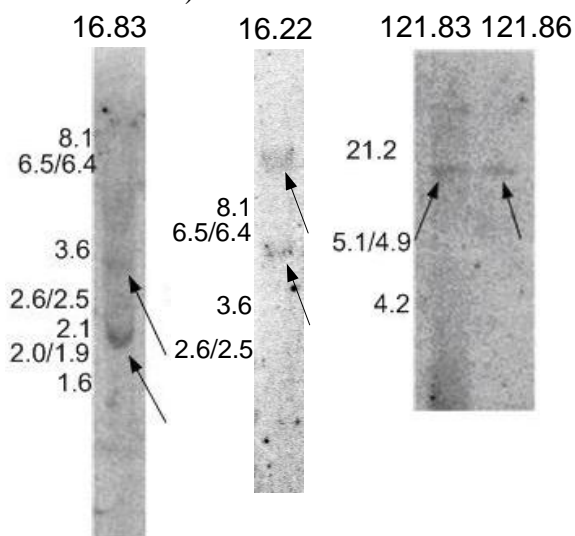


Рис. 4. Блот-гибридизация геномных ДНК трансгенных растений табака с  $^{32}\text{P}$ -меченым фрагментом гена *nptII*. Номера растений подписаны над дорожками. Стрелками указаны фрагменты Т-ДНК. Цифрами указаны длины фрагментов маркера (тпн), для дорожек с геномной ДНК растений 16.83 и 16.22 маркером являлась  $\lambda/\text{AvaII}$ , для дорожек с геномной ДНК растений 121.83 и 121.86 маркером являлась  $\lambda/\text{HindIII}/\text{EcoRI}$ .

Для растения 16.83 просеквенированы участки ДНК, прилежащие к концевым повторам Т-ДНК. При выравнивании 4 фрагментов ДНК, прилежащих к левому краевому повтору Т-ДНК, было выяснено, что они делятся на две группы (1, 2, 3 и 4). При поиске гомологичных последовательностей по базе данных, последовательности 1, 2 и 3 дают устойчивую гомологию с векторными последовательностями. Последовательность 4 не обнаруживает гомологии с векторными последовательностями, зато гомологична последовательностям из растительного генома. Последовательность ДНК растения 16.83, прилежащая к правому краевому повтору, показывает устойчивую гомологию с векторными последовательностями.

Исходя из этих данных, для растения 16.83 можно предположить три возможных варианта встраивания Т-ДНК, представленные на рис. 5. Первый вариант (рис. 5.1) - из имеющихся двух копий Т-ДНК одна несет два фрагмента вектора, один из которых прилежит к правому концевому повтору Т-ДНК, а второй к левому. Вторая копия Т-ДНК несет один векторный фрагмент, прилежащий к правому краевому повтору Т-ДНК. Второй вариант (рис. 5.2) - одна копия Т-ДНК несет векторную последовательность, прилежащую к левому краевому повтору, а вторая копия Т-ДНК несет последовательность вектора, прилежащую к правому краевому повтору Т-ДНК. Третий вариант (рис. 5.3) - одна копия Т-ДНК несет два векторных фрагмента, прилежащих как к левому, так и к правому краевым повторам, а вторая копия Т-ДНК не несет ни одного

векторного фрагмента. Для выявления конкретного варианта встраивания Т-ДНК и векторной ДНК необходимо секвенировать одну из встроек полностью.

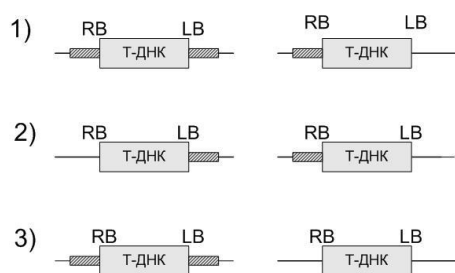


Рис. 5. Схема расположения векторных последовательностей относительно двух копий Т-ДНК для растения табака 16.83. RB, LB – правая и левая границы Т-ДНК, соответственно. Заштрихованы участки векторной последовательности.

Достаточно интересным представляется случай с растениями 121.83 и 121.86, которые также несут два фрагмента векторной ДНК, но при этом на Саузерн блоте у них регистрируется всего одна копия Т-ДНК (рис. 5, дорожки 121.83 и 121.86). Растение 121.83 несет фрагменты плазмидной последовательности, прилежащие как к левому, так и к правому повторам Т-ДНК, но не несет среднего фрагмента плазмидной ДНК. Наиболее вероятным в данном случае представляется вариант, когда при процессинге Т-ДНК-нити были неправильно определены как левый, так и правый концевые повторы, в результате получилась Т-ДНК, неправильно вырезанная с обеих сторон. Растение 121.86 также несет два фрагмента вектора, один длинный - от 3200 до 5200 пн, прилежащий к левому краевому повтору Т-ДНК, и один короткий - от 420 до 2200 пн, встроившийся независимо от Т-ДНК. В данном случае существуют два варианта – либо в процессе репарации участок векторной ДНК, соединяющий эти два фрагмента, был комплементарно заменен на растительную ДНК, или вовсе элиминирован, либо небольшой фрагмент интегрировался в Т-ДНК независимо от первого и от Т-ДНК, соответственно. Точную картину в данном случае можно установить при определении расстояния на генетической карте, разделяющего эти два векторных фрагмента.

Приведенные исследования показывают, что переносимые при агробактериальной трансформации в ядерный геном растений векторные фрагменты имеют сложную структуру. Показано, что обе границы одной Т-ДНК могут определяться и вырезаться неправильно, что приводит к образованию растений, несущих Т-ДНК с обеих сторон окруженную векторными последовательностями. Показано, что в одно и то же растение, кроме Т-ДНК, вырезанной с ошибкой, может встраиваться и последовательность вектора, независимая от Т-ДНК.

### 3. Анализ наследования векторных фрагментов

В таблице 3 представлены результаты анализа встречаемости фрагментов векторной ДНК у потомков первого поколения ( $T_1$ ) от самоопыления исходных трансгенных растений. У всех проанализированных растений  $T_1$  были обнаружены те же участки векторной ДНК, что и у родительских растений.

Отсутствие расщепления векторных фрагментов у потомков растения Res 66, несущего одну копию Т-ДНК (рис. 4) предоставляет дополнительные доказательства в пользу того, что в данном случае мы имеем дело со всей векторной последовательностью, встроившейся в геном трансгенного растения целиком.



Таблица 3. Распределение векторных фрагментов в геноме трансгенных растений табака и их потомков первого поколения от самоопыления

Трансгенные растения		Типы фрагментов векторной ДНК				
		BD3/4	BD5/6	BD7/8	BD9/10	BD1/2
Res60	T <sub>0</sub>	+	-	-	-	-
	T <sub>1</sub>	+	-	-	-	-
Res66	T <sub>0</sub>	+	+	+	+	+
	T <sub>1</sub> -1	+	+	+	+	+
	T <sub>1</sub> -2	+	+	+	+	+
Res79	T <sub>0</sub>	-	+	+	+	+
	T <sub>1</sub> -1	-	-	-	+	+
	T <sub>1</sub> -2	-	+	+	+	-
	T <sub>1</sub> -3	-	+	+	+	+
16.83	T <sub>0</sub>	+	-	-	-	+
	T <sub>1</sub> -1	+	-	-	-	+
	T <sub>1</sub> -2	+	-	-	-	+
	T <sub>1</sub> -3	+	-	-	-	+

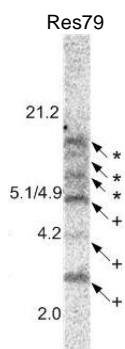


Рис. 6. Блот-гибридизация геномной ДНК трансгенного растения табака Res79 с <sup>32</sup>P-мечеными фрагментами гена *uidA* и гена *nptII*. Стрелками указаны копии Т-ДНК, \* помечены стрелки, указывающие на фрагменты геномной ДНК, гибридные с зондом на ген *uidA*, + помечены стрелки, указывающие на фрагменты геномной ДНК, гибридные с зондом на ген *nptII*. Цифрами указаны длины фрагментов маркера  $\lambda$ HindIII/EcoRI (кпн).

Наиболее интересным представляется случай с растением Res79, у которого по результатам Саузерн блот анализа было обнаружено три копии Т-ДНК (рис. 6). Из представленных в таблице 3 данных мы видим, что у исходного растения было представлено 4 фрагмента векторной ДНК, а среди его потомков, по-видимому в результате рекомбинации или сегрегации, произошло расщепление участков векторной последовательности. У одного потомка определяется два фрагмента, прилежащих к правому краевому повтору, а у другого - только три фрагмента, не прилежащие ни к одной из границ Т-ДНК. Анализ картины встраивания и рекомбинации векторных последовательностей в геном растения Res79 и его потомков затрудняется тем, что у него присутствует три копии Т-ДНК (рис. 7).

На основании имеющихся данных можно утверждать, что векторные последовательности не только стабильно переносятся в следующее поколение, но и рекомбинируют, как обычные растительные гены.

## ВЫВОДЫ

1. В геномной ДНК 114 независимо полученных методом агробактериального переноса трансгенных растений табака и моркови выявлены фрагменты, соответствующие векторным последовательностям

плазмид pBi121 и pBi101. Частота данного события для двух видов растений составила 35.1%

2. Доля растений, несущих в геноме фрагменты векторных ДНК, существенно не различалась между двумя анализируемыми видами и составила 35.2% для растений табака и 34.9% - для растений моркови (у которой эта частота оценена впервые).

3. Выявлен широкий спектр взаиморасположения векторных фрагментов в геноме анализируемых трансгенных растений табака и моркови, представленный 20 вариантами. Впервые установлено, что векторные фрагменты могут быть интегрированы в геном одного и того же трансгенного растения как сцеплено с Т-ДНК, так и независимо от нее.

4. На основании данных о составе нуклеотидов районов растительной ДНК, фланкирующих Т-ДНК-встройки, подтверждено их соответствие векторным последовательностям.

5. Доказано, что чужеродные векторные последовательности стабильно наследуются в первом поколении от самоопыления исходных трансгенных растений и способны сегрегировать и рекомбинировать, как обычные генетические маркеры.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. **Пухначева Н.В.**, Новоселя Т.В., Зоткевич Е.А., Дейнеко Е.В. Встраивание векторных последовательностей в геном трансгенных растений // Генетика. 2005. Т. 41. № 9. С. 1203-1209.
2. **Пермякова (Пухначева) Н.В.**, Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Особенности встраивания векторных последовательностей в геном трансгенных растений// Генетика. 2007. Т. 43. № 11. С. 1501-1510.
3. **Пухначева Н.В.**, Новоселя Т.В., Дейнеко Е.В. Интеграция краевых векторных последовательностей в геном трансгенных растений табака. Материалы международной научной конференций «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология», Минск, 24-26 ноября 2004 г., стр. 342.
4. **Пухначева Н.В.**, Филипенко Е.А., Дейнеко Е.В. Влияние первичной структуры геномной ДНК на встраивание Т-ДНК и встраивание векторных последовательностей у трансгенных растений табака. Материалы IX Дальневосточной молодежной школы-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, 16-23 сентября 2005 г., МЭС ТИБОХ, г. Владивосток, с. 60.
5. **Пухначева Н.В.**, Дейнеко Е.В. Встраивание векторных последовательностей в геном трансгенных растений табака и моркови. Материалы международной конференции «Генетика в России и в мире» посвященной 40-летию Института общей генетики им. Вавилова РАН, стр.162.
6. **Пермякова Н.В.**, Шумный В.К., Дейнеко Е.В. Агробактериальная трансформация растений: перенос фрагментов векторной ДНК в растительный геном (принята в печать). Генетика.