



ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *UIDA* ПОД КОНТРОЛЕМ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *AP3* И *RPT2A ARABIDOPSIS THALIANA* L. В ТРАНСГЕННОЙ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ *NICOTIANA TABACUM*

*Маренкова Т.В., Сидорчук Ю.В., Хайрулина Е.С., Кузнецов В.В., Дейнеко Е.В.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск 630090

*E-mail: marenkova@bionet.nsc.ru

Резюме

Исследованы особенности экспрессии репортерного гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *apetala3* (*ap3*) и *rpt2a Arabidopsis thaliana* L. в трансгенной каллусной культуре *Nicotiana tabacum*. Исходным материалом для получения каллусной культуры были ранее созданные моноинсерционные гомозиготные (T_2) трансгенные растения табака, полученные методом агробактериальной трансформации. Каллусные культуры получены из двух типов эксплантов (стебель, лист) и культивировались на трех культуральных средах, отличающихся между собой соотношением и количеством растительных гормонов ауксина (НУК) и цитокинина (кинетин). В исследованных каллусных линиях выявлена вариабельность как по ферментативной активности β -глюкуронидазы, так и по накоплению мРНК. Достоверно значимых различий в экспрессии гена *uidA* между разными средами для каждого типа экспланта и между типами экспланта выявлено не было, что позволяет предположить нечувствительность данных промоторов к изменениям в гормональном составе питательных сред. Уровень экспрессии гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *ap3* и *rpt2a A.thaliana* в каллусных линиях был ниже уровня экспрессии гена *uidA* под управлением 35S промотора ВМЦК в контрольной каллусной линии. Уровень накопления транскрипта репортерного гена *uidA* не коррелировал с уровнем ферментативной активности β -глюкуронидазы. Гистохимический анализ трансгенных каллусов выявил, что во всех линиях с различной частотой присутствуют различные варианты окраски (полностью окрашенные каллусы, мозаично окрашенные и совсем не окрашенные), что говорит об эпигенетических изменениях, связанных с потерей экспрессии репортерного гена в условиях *in vitro*. В целом результаты анализа показали, что промоторы генов *ap3* и *rpt2a A. thaliana* активны в каллусной культуре табака и могут быть эффективны в качестве регуляторных элементов в составе синтетических промоторов.

Ключевые слова: промотор гена *ap3 Arabidopsis thaliana*, промотор гена *rpt2a Arabidopsis thaliana*, каллус, экспрессия гена, *Nicotiana tabacum*

Цитирование: Маренкова Т.В., Сидорчук Ю.В., Хайрулина Е.С., Кузнецов В.В., Дейнеко Е.В. Экспрессия гена *uidA* под контролем тканеспецифичных промоторов генов *ap3* и *rpt2a Arabidopsis thaliana* L. в трансгенной клеточной культуре *Nicotiana tabacum* // *Biomics*. 2023. Т.15(4). С.253-262. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-22

© Авторы

EXPRESSION OF THE *UIDA* GENE UNDER THE CONTROL OF TISSUE-SPECIFIC PROMOTERS OF THE *AP3* AND *RPT2A* GENES OF *ARABIDOPSIS THALIANA* L. IN A TRANSGENIC CELL CULTURE OF *NICOTIANA TABACUM*

*Marenkova T.V., Sidorchuk Yu.V., Khairulina E.S., Kuznetsov V.V., Deineko E.V.

Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch
of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630090

*E-mail: marenkova@bionet.nsc.ru

Resume

The features of expression of the *uidA* reporter gene under the control of tissue-specific promoters of the *apetala3* (*ap3*) and *rpt2a* genes of *Arabidopsis thaliana* L. in the transgenic callus culture of *Nicotiana tabacum* were studied. The starting material for obtaining callus culture was previously created monoinsertion homozygous (T₂) transgenic tobacco plants obtained by agrobacterial transformation. Callus cultures were obtained from two types of explants (stem, leaf) and were cultivated on three cultural media that differed in the ratio and amount of plant hormones auxin (NAA) and cytokinin (kinetin). In the studied callus lines, variability was revealed both in the enzymatic activity of β-glucuronidase and in the accumulation of mRNA. No reliably significant differences in the expression of the *uidA* gene were detected between different media for each type of explant and between types of explant, which suggests the insensitivity of these promoters to changes in the hormonal composition of nutrient media. The level of expression of the *uidA* gene under the control of the tissue-specific promoters of the *ap3* and *rpt2a* genes of *A.thaliana* in callus lines was lower than the level of expression of the *uidA* gene under the control of the 35S CaMV promoter in the control callus line. The level of *uidA* reporter gene transcript accumulation did not correlate with the level of β-glucuronidase enzymatic activity. Histochemical analysis of transgenic calli revealed that in all lines, different color variants were present with different frequencies (fully colored calli, mosaic colored and not colored at all), which indicates epigenetic changes associated with the loss of reporter gene expression *in vitro*. In general, the results of the analysis showed that the promoters of the *ap3* and *rpt2a* genes of *A. thaliana* are active in tobacco callus culture and can be effective as regulatory elements in synthetic promoters.

Key words: *Arabidopsis thaliana ap3* gene promoter, *Arabidopsis thaliana rpt2a* gene promoter, callus, gene expression, *Nicotiana tabacum*

Citation: Marenkova T.V., Sidorchuk Yu.V., Khairulina E.S., Kuznetsov V.V., Deineko E.V. Expression of the *uidA* gene under the control of tissue-specific promoters of the *ap3* and *rpt2a* genes of *Arabidopsis*. *Biomics*. 2023. T.15(4). С. 253-262. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-22 (In Russian)

© **The Authors**

Введение

Культуры клеток высших растений являются уникальными природными зелеными лабораториями и используются для синтеза и производства разнообразных веществ, как природного, так и генно-модифицированного происхождения [Kowalczyk et al., 2022]. Революционное развитие генно-инженерных технологий позволяет переносить рекомбинантные гены, изменять и создавать новые метаболические пути синтеза необходимых для человека веществ в культуре клеток *in vitro*. Для успешного решения этой задачи необходимо совершенствовать системы экспрессии для увеличения выхода целевых рекомбинантных белков.

Система экспрессии включает в себя такие основные элементы как промотор, кодирующая последовательность гена и терминатор транскрипции. Промотор гена является одним из ведущих важных цис-регуляторных элементов для пространственного и временного контроля и обеспечения достаточно высокого уровня экспрессии генов в новом генетическом окружении. Промоторы могут быть клонированы из разных организмов (бактерии, растения) и согласно функции, регуляции разделяются на конститутивные, индуцибельные, тканеспецифичные и синтетические [Villao-Uzho et al., 2023]. 35S промотор ВМЦК является самым распространенным конститутивным промотором,

показавшим свою эффективность в течение последних нескольких десятилетий и активно используемый для создания генетически модифицированных растений. Тканеспецифические промоторы характеризуются экспрессией в определенных тканях и органах растения. Для определения функциональных характеристик промотора используют репортерные гены, экспрессию которых легко визуализировать *in vivo* или *in vitro*, таких как ген *uidA E.coli* (кодирует β -глюкуронидазу), ген *gfp* (кодирует зеленый флуоресцентный белок), ген *luc* (кодирует люциферазу) [Huttly et al., 2009], ген *ruby*, который превращает тирозин в ярко-красный беталаин, который виден невооруженным глазом без необходимости использования специального оборудования или химической обработки [He et al., 2020].

Ранее нами были исследованы особенности экспрессии репортерного гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *ap3* и *rpt2a Arabidopsis thaliana* L. в гомозиготных моноинсерционных трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* L. Ген *ap3* кодирует фактор транскрипции, регулирующий развитие лепестков и тычинок в цветочной меристеме [Hill et al., 1998]. Ген *rpt2a* кодирует АТФазу в составе 19S субъединицы 26S протеасомы *A. thaliana* и участвует в регуляции размера клеток, реакции на окислительный стресс и поддержания апикальных меристем побега и корня [Ueda et al., 2004; 2011]. Показано, что данные промоторы обеспечивали экспрессию репортерного гена в меристематических тканях трансгенных растений табака [Сидорчук и др. (Sidorchuk et al.), 2021]. Представляет интерес исследовать также функционирование промоторов генов *ap3* и *rpt2a* в клеточной культуре *in vitro*. Целью данной работы является выявление особенностей экспрессии гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *ap3* и *rpt2a A. thaliana* в трансгенной каллусной культуре *N. tabacum*.

Материалы и методы

Получение каллусной культуры *Nicotiana tabacum*. Исходным материалом для получения каллусной культуры табака являются ранее полученные моноинсерционные гомозиготные (T_2) трансгенные растения *N. tabacum* L. Данные растения трансформированы методом агробактериальной трансформации генетической конструкцией, содержащей репортерный ген *uidA* под управлением тканеспецифичного промотора гена *ap3* или гена *rpt2a Arabidopsis thaliana* L. [Сидорчук и др. (Sidorchuk et al.), 2021]. Были отобраны по три независимо полученных моноинсерционных линий с промотором

гена *ap3* (линии a2, a4, a5) и с промотором гена *rpt2a* (линии r3, r6, r8). В качестве контроля было взято гомозиготное (T_2) трансгенное растение табака 121.71-6, содержащее в геноме одну копию гена *uidA* под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК) [Новоселия и др. (Novoselia et al.), 2002]. Для введения в культуру *in vitro* трансгенные растения были выращены в стерильных условиях на культуральной среде Мурашига и Скуга (MS) с добавлением 30 г/л сахарозы и 7 г/л агар. Для получения первичной каллусной клеточной культуры в качестве экплантов использовали стебель и листья 7-9-недельных трансгенных растений. Среды MS для каллусообразования отличались концентрацией растительных гормонов, среда 1 содержала 1 мг/л НУК, 0,1 мг/л кинетин; среда 2 - 0,1 мг/л НУК, 0,25 мг/л кинетин; среда 3 - 2 мг/л НУК, 0,2 мг/л кинетин. Каллусные линии табака выращивали в факторостатной комнате без доступа света при температуре 23°C, пассирование каллусов производили 1 раз в 3 недели.

Определение активности β -глюкуронидазы.

Гистохимическое окрашивание каллусов для локализации активности β -глюкуронидазы проводилось с использованием окрашивающего раствора: 100 мМ фосфатный буфер (pH=7,0), 10 мМ EDTA, 0,1% Triton X100 и 1 мМ X-Gluc (Fermentas, Канада). Для лучшего проникновения реагентов каллусы в реакционной смеси помещали в вакуумную камеру генной пушки PSD-1000/He (Bio-Rad, США). Каллусы оставляли для окрашивания на 12 ч в термостате при температуре 37°C.

Количественное определение активности GUS в экстрактах каллуса табака проводили в соответствии со стандартной методикой [Зверева, Романов (Zvereva, Romanov), 2000]. Флуоресценцию измеряли на флуориметре Victor3 1420 (Perkin Elmer, США) при длине волны возбуждения 355 нм и длине волны испускания 455 нм. Общая концентрация растворимого белка в экстрактах была определена методом Брэдфорда с бычьим сывороточным альбумином в качестве стандартного вещества. Измерения проводили в 3-5 биологических повторностях. Для выявления различий между группами применяли непараметрический дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса (программный пакет Statistica 5.5). Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%.

Анализ экспрессии гена *uidA*. Суммарную РНК выделяли из каллусов с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия), РНК обрабатывали DNase I и 4 μ г РНК брали для синтеза кДНК, используя комплект реактивов «Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit». Анализ экспрессии репортерного гена *uidA* проводили при

помощи ПЦР в реальном времени на ДНК-термоциклере CFX96 (Bio-Rad, США). Каждый образец амплифицировали в трех аналитических повторностях. Программа амплификации: 95°C – 3 мин, 5 циклов без детекции: 95°C – 10 сек, 61°C – 20 сек, 72°C – 5 сек; 40 циклов с детекцией на стадии отжига (канал FAM): 95°C – 10 сек, 61°C – 20 сек, 72°C – 5 сек. Уровень экспрессии репортерного гена оценивали при помощи ПО «Bio-Rad CFX Manager 2.1» нормируя по экспрессии гена *gsp* табака, кодирующего глутаминсинтетазу. Последовательности праймеров и TaqMan-зондов на ген *uidA*: *uidA*_прямой – 5'-CTCCATGATTTCTTTAACTATGC-3', *uidA*_обратный – 5'-GCACAGTTCATAGAGATAACC-3', *uidA*_зонд — 5'-FAM-TACACCACGCCGAACACCTG-BHQ1-3'; на референсный ген *gsp*: *gsp*_прямой – 5'-TGGAAACTTTAGGGTCCCTACTAC-3', *gsp*_обратный – 5'-CAAGCCTTGTAGTGAGCATCTG-3', *gsp*_зонд — 5'-FAM-ATGACTTATCCGCTCCAGCACCAC-BHQ1-3'. Анализ экспрессии гена *uidA* проводили в 3-х биологических повторностях.

Результаты и обсуждение

Изучение активности новых растительных промоторов проводится исследователями эмпирически обычно на уровне целого растения, когда исследуется пространственный и временной паттерны экспрессии находящихся под их контролем репортерных генов [Santamaria et al., 2001; Zhao et al., 2023]. Также важно исследовать работу промотора в новых для него условиях культуры *in vitro*, поскольку для многих растений этап генетической трансформации включает этап введения в клеточные культуры и промотор должен быть активен в культуре тотипотентных, активно делящихся клеток на искусственных питательных средах. Трансгенные каллусы являются источником получения суспензионных клеточных культур, которые активно используются как фабрики для наработки ценных для человека вторичных метаболитов, рекомбинантных белков [Efferth, 2019]. Девятнадцать различных промоторных последовательностей были протестированы на растениях табака и на суспензионной клеточной культуре табака Bright Yellow-2 (BY2). Авторы показали, что только один промотор показал худшую эффективность экспрессии генов в клетках BY2, чем в трансгенных растениях, а восемь промоторов (включая тканеспецифичные промоторы) показали более высокую активность в клетках BY2, чем в листьях табака, вероятно, из-за различий в физиологических условиях, связанных с дифференцировкой клеток [Tian et al., 2022].

Для исследования характера экспрессии гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *ap3* и *rpt2a* *A. thaliana* в трансгенной каллусной

клеточной культуре *N. tabacum* были получены каллусные клеточные культуры из двух типов эксплантов: стебель и лист. Культивирование производили на трех культуральных средах, отличающихся между собой соотношением и количеством растительных гормонов: ауксины (НУК) и цитокинина (кинетин). Данные различные параметры культивирования трансгенного каллуса табака позволяют проследить возможное влияние как экспланта для клеточной культуры, так и различных концентраций растительных гормонов на функционирование меристематических промоторов в новых для них условиях *in vitro*.

На рис.1 представлены данные количественного флуориметрического анализа экспрессии гена *uidA* в каллусной клеточной культуре табака из стеблевого (А) и листового (Б) эксплантов на трех вариантах культуральной среды MS. Отмечается вариабельность экспрессии репортерного гена как между независимо полученными каллусными трансгенными линиями с промоторами генов *ap3* и *rpt2a*, так и для индивидуальной клеточной линии на разных концентрациях растительных гормонов.

Так для каллусов, полученных из стеблевого экспланта, минимальное значение активности фермента β-глюкуронидазы составило 0,3±0.10 мкМ 4-MU/мг белка/мин для линии а5 на среде под номером 3 и для линии а7 на первой среде. Максимальное значение активности фермента было отмечено для линии а2: 4,2±1,2 мкМ 4-MU/мг белка/мин на среде 3. Минимальное и максимальное значения отличаются в 14 раз. Для линий с промотором гена *rpt2a* минимальное (0,5±0,1) и максимальное значения (3,9±0,6) активности фермента отличались в 8 раз. Активность фермента в каллусных линиях, полученных из листовой пластинки, также варьировала примерно в 10 раз при сравнении максимального и минимального значений для обоих промоторов. Достоверно значимых различий в экспрессии гена *uidA* между разными средами для каждого типа экспланта (стебель или лист) и между типами экспланта выявлено не было (данные не приведены). Интересно отметить, что согласно ранее проведенным исследованиям, в трансгенных растениях табака, из которых были получены данные каллусные линии, активность фермента β-глюкуронидазы в среднем была в тех же пределах с вариабельностью между крайними значениями примерно в 8 раз [Сидорчук и др. (Sidorchuk et al.), 2021]. Следовательно, введение в культуру *in vitro* не изменило характер экспрессии гена *uidA* под управлением меристематических промоторов генов *ap3* и *rpt2a*, что позволяет предположить их нечувствительность к изменению гормонального фона и клеточной коммуникации.

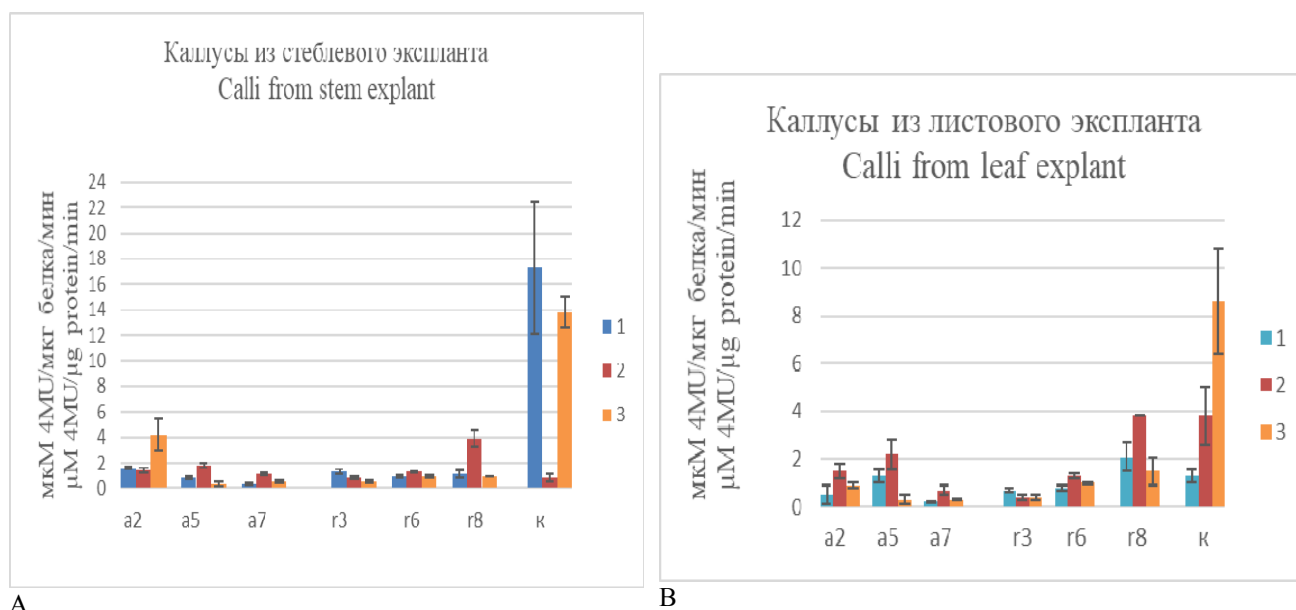


Рис. 1. Количественный флюориметрический анализ экспрессии гена *uidA* в каллусной клеточной культуре табака из стеблевого (А) и листового (В) эксплантов. Показана стандартная ошибка среднего. Обозначения: a2, a5, a7 – каллусные линии с промотором *ap3*; r3, r6, r8 – каллусные линии с промотором *rpt2a*; к – контроль, каллусы табака с геном *uidA* под управлением 35S промотора ВМЦК; 1 - среда MS, НУК 1 мг/л, кинетин 0,1 мг/л; 2 - среда MS, НУК 0,1 мг/л, кинетин 0,25 мг/л; 3 - среда MS, НУК 2 мг/л, кинетин 0,2 мг/л.

Fig. 1. Quantitative fluorimetric analysis of *uidA* gene expression in tobacco callus cell culture from stem (A) and leaf (B) explants. Standard error of the mean is shown.

Designations: a2, a5, a7 – callus lines with the *ap3* promoter; r3, r6, r8 – callus lines with the *rpt2a* promoter; k – control, tobacco calli with the *uidA* gene under the control of the 35S CaMV promoter; 1 - MS medium, NAA 1 mg/l, kinetin 0.1 mg/l; 2 - MS medium, NAA 0.1 mg/l, kinetin 0.25 mg/l; 3 - MS medium, NAA 2 mg/l, kinetin 0.2 mg/l.

В качестве контроля мы использовали каллусы табака с геном *uidA* под управлением конститутивного 35S промотора ВМЦК. Известно, что уровень экспрессии генов под контролем данного промотора может варьировать, так у трансгенных растений табака максимальный уровень экспрессии гена *uidA* наблюдался в листьях и корнях, а в трансгенных растениях *A. thaliana* и *Brassica napus* во всех частях растения [Malik et al., 2002]. Однако, несмотря на это, 35S промотор ВМЦК предлагается и используется многими исследователями в качестве референсного стандарта активности, силы промотора в экспериментах по оценке эффективности новых промоторов [Amack et al., 2020]. Уровень активности анализируемого фермента варьировал между разными вариантами культуральной среды для стеблевого экспланта в 59 раз (от минимального $0,8 \pm 0,3$ до максимального $17,3 \pm 5,2$), а для листового экспланта в 22 раза (от минимального $1,3 \pm 0,3$ до максимального $8,6 \pm 2,2$) для каллусов, полученных от одного и того же растения. Данная большая вариабельность возможно связана с чувствительностью 35S промотора ВМЦК к разному соотношению ауксинов и

цитокининов в питательной среде и типу экспланта. Сравнение двух групп каллусных клеточных линий с меристематическими промоторами генов *ap3* и *rpt2a* и конститутивного 35S промотора ВМЦК выявило статистически достоверные различия только между клеточными линиями из листового экспланта ($H(1; N=21) = 4,269, p = 0,0388$). Активность фермента β-глюкуронидазы в каллусной клеточной линии была выше при контроле транскрипции 35S промотором ВМЦК, но с достаточно большой вариабельностью. Клеточные линии из каллусов, полученных из стеблевого экспланта, не отличались достоверно между собой, что было связано с низким уровнем активности фермента на среде варианта 2 для 35S промотора, несмотря на высокие значения активности на других вариантах сред.

Таким образом, оба варианта меристематических промоторов обеспечивают экспрессию репортерного гена в условиях *in vitro* с индивидуальными вариациями, которые могут быть связаны с особенностями места интеграции, организации встройки при случайном встраивании генетической конструкции. Широкая вариабельность

экспрессии трансгенов между независимо полученными трансформантами описана в литературе [Halfhill et al., 2003]. Также в культуре *in vitro* вариабельность экспрессии перенесенных генов может быть связана с соматоклональной изменчивостью [Stroud et al., 2013]. Более низкий уровень активности у растительных эндогенных промоторов по сравнению с вирусными и синтетическими промоторами был обнаружен при тестировании 19 различных промоторов в листьях табака и в культуре клеток BY2 в двух независимых исследованиях с разными репортерными генами [Shakhova et al., 2022; Tian et al., 2022].

Анализ уровня экспрессии гена *uidA* на транскрипционном уровне в каллусной клеточной культуре табака из стеблевого (А) и листового (Б) эксплантов приведен на рис.2. Уровень транскрипции, нормированный по хозяйскому гену *gsp*, у линий с меристематическими промоторами был низок и

варьировал от $0,1 \pm 0,001$ до $3,2 \pm 3,2$. В контроле вариабельность составила от $0,4 \pm 0,01$ до $25,1 \pm 14,0$. Отмечаются достоверные отличия между данными группами для каллусов из стебля ($H(1; N=13) = 3,9176, p = 0,0478$) и из листьев ($H(1; N=14) = 4,133, p = 0,0421$). Корреляции между ферментативной активностью белка GUS и уровнем экспрессии не выявляется, так наибольшее значение уровня мРНК отмечается для линии r3 на среде 1 из стеблевого экспланта, в то время как флюориметрический анализ показал средние значения для данной линии ($1,3 \pm 0,2$ мкМ 4-MU/ (мг мин)). Важно отметить, что в контроле, на среде варианта 2 отмечается низкий уровень транскрипции для обоих типов эксплантов. Отсутствие прямой корреляции между уровнем целевого белка и уровнем его мРНК отмечается во многих исследованиях, которая особенно выражена для растительных слабых промоторов [Halfhill et al., 2003; Tian et al., 2022; Shakhova et al., 2022].

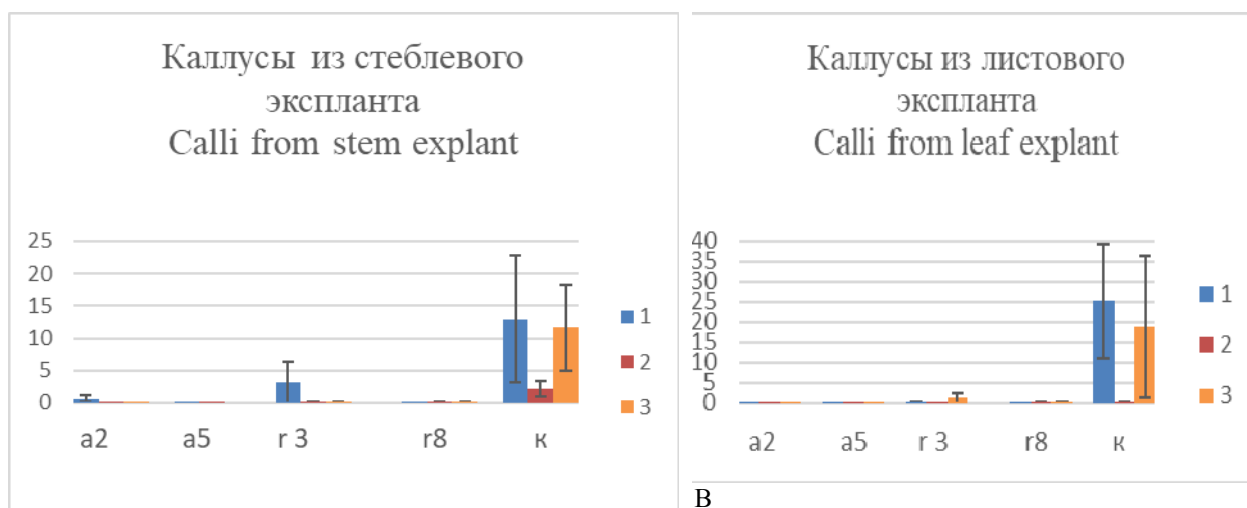


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии гена *uidA* методом количественной ОТ-ПЦР в каллусной клеточной культуре табака из стеблевого (А) и листового (Б) эксплантов. По оси ординат указан уровень экспрессии, нормализованный по хозяйскому гену *gsp*. Показана стандартная ошибка среднего.

Обозначения: a2, a5 – каллусные линии с промотором *ap3*; r3, r8 – каллусные линии с промотором *rpt2a*; к – контроль, каллусы табака с геном *uidA* под управлением 35S промотора ВМЦК; 1 - среда MS, НУК 1 мг/л, кинетин 0,1 мг/л; 2 - среда MS, НУК 0,1 мг/л, кинетин 0,25 мг/л; 3 - среда MS, НУК 2 мг/л, кинетин 0,2 мг/л.

Fig. 2. Analysis of the expression level of the *uidA* gene using quantitative RT-PCR in tobacco callus cell culture from stem (A) and leaf (B) explants. The y-axis indicates the expression level normalized to the host *GSP* gene. Standard error of the mean is shown.

Designations: a2, a5, a7 – callus lines with the *ap3* promoter; r3, r6, r8 – callus lines with the *rpt2a* promoter; k – control, tobacco calli with the *uidA* gene under the control of the 35S CaMV promoter; 1 - MS medium, NAA 1 mg/l, kinetin 0.1 mg/l; 2 - MS medium, NAA 0.1 mg/l, kinetin 0.25 mg/l; 3 - MS medium, NAA 2 mg/l, kinetin 0.2 mg/l.

Гистохимическое окрашивание образцов выявило, что во всех линиях с различной частотой присутствуют как полностью окрашенные каллусы, мозаично окрашенные и совсем без окраски. На рис.3 приведен пример гистохимического окрашивания

каллусов с промотором гена *ap3*. Это указывает на вариабельность экспрессии перенесенного репортерного гена на клеточном уровне, что безусловно вносит вклад в наблюдаемую вариабельность по активности фермента β -

глюкуронидазы. Причинами мозаичности и отсутствия окрашивания по-видимому является инактивация экспрессии трансгена, феномен которого давно известен и широко описан в литературе [Vaucheret, 2023]. Трансгенные каллусы табака линии BY-2 только в 35-50% имели гомогенную флуоресценцию GFP, в остальных случаях отмечались каллусы с разным уровнем флуоресценции в виде отдельных секторов или мозаичного расположения. Наблюдаемая гетерогенность по экспрессии репортерного гена была связана с различным эпигенетическим статусом клеток внутри каллусов [Nocarova et al., 2010].



Рис. 3 Гистохимическое окрашивание каллусов табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичного промотора гена *ap3 A. thaliana*.

Fig. 3 Histochemical staining of tobacco calli with the *uidA* gene under the control of a tissue-specific gene promoter *ap3 A. thaliana*.

Заключение

Методы генной инженерии, включающую как классический трансгенез, так и редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas9, широко используется для получения растений с важными для человека признаками, такими, например, как повышенное содержание витаминов [Kaur et al., 2020; Dong et al., 2020], антиоксидантов [Mock et al., 2018; Rudenko et al., 2023], устойчивостью к заболеваниям [Nazarian-Firouzabadi et al., 2023] и др. Трансгенные клеточные суспензионные культуры используются для наработки ценных рекомбинантных белков, вакцин [Lee et al., 2023; Chandran et al., 2020]. При таком стремительном развитии модификации генома растений/клеточных культур по-прежнему актуальной является проблема поиска нативных растительных промоторов, которые могут быть использованы самостоятельно, либо в составе синтетических промоторов [Jores et al., 2021]. Исследование

особенностей экспрессии репортерного гена *uidA* под контролем промоторов генов *ap3* и *rpt2a A. thaliana* в каллусной клеточной культуре табака показал, что данные промоторы активны в гетерологичной системе в условиях *in vitro*. Возможно, наиболее эффективным является использование их для создания синтетических промоторов, что позволит повысить их активности до уровня конститутивных промоторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования, грант №FWNR-2022-0022.

Литература

1. Новоселя Т.В., Дейнеко Е.В. Моделирование нестабильной экспрессии гена *npt II* у трансгенных растений табака // Физиология растений. 2002. Т.49(3). С. 437-443.
2. Сидорчук Ю.В., Маренкова Т.В., Кузнецов В.В., Герасименко И. М., Шелудько Ю. В., Дейнеко Е.В. Особенности экспрессии гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *ap3* и *rpt2a Arabidopsis thaliana* L. в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* // Физиология растений. 2021. V.68(5). С. 489–500. doi: 10.31857/S0015330321040175
3. Зверева С.Д., Романов Г.А. Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика и методы тестирования // Физиология растений. 2000. Т. 47(3). С. 479-488.
4. Amack SC, Antunes M.S. CaMV35S promoter – a plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology // Current Plant Biology. 2020. V.24. P.100179. doi: 10.1016/j.cpb.2020.100179
5. Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds // Biotechnol Rep (Amst). 2020. V.26. e00450. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00450
6. Dong OX, Yu S, Jain R, Zhang N, Duong PQ, Butler C, Li Y, Lipzen A, Martin JA, Barry KW, Schmutz J, Tian L, Ronald PC. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9 // Nat Commun. 2020. V.11(1). P.1178. doi: 10.1038/s41467-020-14981-y
7. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures // Engineering. 2019. V.5(1). P.50-59. doi: 10.1016/j.eng.2018.11.006
8. Halfhill MD, Millwood RJ, Rufty TW, Weissinger AK, Stewart CN Jr. Spatial and temporal patterns of green fluorescent protein (GFP) fluorescence during leaf canopy development in transgenic oilseed rape, *Brassica napus* L. // Plant Cell Rep. 2003. V.22(5). P.338-343. doi: 10.1007/s00299-003-0696-4

9. He Y, Zhang T, Sun H, Zhan H, Zhao Y. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation // *Hortic Res.* 2020. V.7(1). P.152. doi: 10.1038/s41438-020-00390-1
10. Hill TA, Day CD, Zondlo SC, Thackeray AG, Irish VF. Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA3* // *Development.* 1998. V.125(9). P.1711-1721. doi: 10.1242/dev.125.9.1711
11. Huttly A. Reporter genes // *Methods Mol Biol.* 2009. V.478. P.39-69. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_3
12. Jores T, Tonnie J, Wrightsman T, Buckler ES, Cuperus JT, Fields S, Queitsch C. Synthetic promoter designs enabled by a comprehensive analysis of plant core promoters // *Nat Plants.* 2021. V.7(6). P.842-855. doi: 10.1038/s41477-021-00932-y
13. Kaur N, Alok A, Shivani, Kumar P, Kaur N, Awasthi P, Chaturvedi S, Pandey P, Pandey A, Pandey AK, Tiwari S. CRISPR/Cas9 directed editing of lycopene epsilon-cyclase modulates metabolic flux for β -carotene biosynthesis in banana fruit // *Metab Eng.* 2020. V.59. P.76-86. doi: 10.1016/j.ymben.2020.01.008
14. Kowalczyk T, Merecz-Sadowska A, Picot L, Brčić Karačonji I, Wiczfinska J, Śliwiński T, Sitarek P. Genetic manipulation and bioreactor culture of plants as a tool for industry and its applications // *Molecules.* 2022. V.27(3). P.795. doi: 10.3390/molecules27030795
15. Lee J, Lee SK, Park JS, Lee KR. Plant-made pharmaceuticals: exploring studies for the production of recombinant protein in plants and assessing challenges ahead // *Plant Biotechnol Rep.* 2023. V.17(1). P.53-65. doi: 10.1007/s11816-023-00821-0
16. Malik K, Wu K, Li XQ, Martin-Heller T, Hu M, Foster E, Tian L, Wang C, Ward K, Jordan M, Brown D, Gleddie S, Simmonds D, Zheng S, Simmonds J, Miki B. A constitutive gene expression system derived from the *tCUP* cryptic promoter elements // *Theor Appl Genet.* 2002. V.105(4). P.505-514. doi: 10.1007/s00122-002-0926-0
17. Mock HP, Martin C, Matros A. Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures // *Metab Eng.* 2018. V.48. P.218-232. doi: 10.1016/j.ymben.2018.06.004
18. Nazarian-Firouzabadi F, Torres MT, de la Fuente-Nunez C. Recombinant production of antimicrobial peptides in plants // *Biotechnol Adv.* 2023. P.108296. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108296
19. Nocarova E, Fischer L. Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression // *BMC Plant Biol.* 2009. V.9. P.44. doi: 10.1186/1471-2229-9-44
20. Rudenko NN; Vetoshkina DV; Marenkova TV; Borisova-Mubarakshina MM Antioxidants of non-enzymatic nature: their function in higher plant cells and the ways of boosting their biosynthesis // *Antioxidants.* 2023. V.12. P.2014. doi:10.3390/antiox12112014
21. Santamaria M, Thomson CJ, Read ND, Loake GJ. The promoter of a basic *PRI-like* gene, *AtPRB1*, from Arabidopsis establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate // *Plant Mol Biol.* 2001. V.47(5). P.641-652. doi: 10.1023/a:1012410009930
22. Shakhova ES, Markina NM, Mitiouchkina T, Bugaeva EN, Karataeva TA, Palkina KA, Fakhranurova LI, Yampolsky IV, Sarkisyan KS, Mishin AS. Systematic comparison of plant promoters in *Nicotiana* spp. expression systems. // *Int J Mol Sci.* 2022. V.23(23). P.15441. doi: 10.3390/ijms232315441
23. Stroud H, Ding B, Simon SA, Feng S, Bellizzi M, Pellegrini M, Wang GL, Meyers BC, Jacobsen SE. Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice // *ELife.* 2013. 2:e00354. doi: 10.7554/eLife.00354
24. Tian C, Zhang Y, Li J, Wang Y. Benchmarking intrinsic promoters and terminators for plant synthetic biology research // *Biores Res.* 2022. 2022:9834989. doi: 10.34133/2022/9834989
25. Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Okada K. Arabidopsis *Rpt2a* encoding the 26S proteasome subunit is required for various aspects of root meristem maintenance, and regulates gametogenesis redundantly with its homolog, RPT2b // *Plant Cell Physiol.* 2011. V.52(9). P.1628-1640. doi: 10.1093/pcp/pcr093
26. Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, Sano R, Wada T, Paponov I, Palme K, Okada K. The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit Rpt2a is essential for the maintenance of Arabidopsis meristems // *Development.* 2004. V.131(9). P.2101-2111. doi: 10.1242/dev.01096
27. Vaucheret H. Epigenetic management of self and non-self: lessons from 40 years of transgenic plants // *C R Biol.* 2023. V.345(4). P.149-174. doi: 10.5802/crbio.96
28. Villao-Uzho L, Chávez-Navarrete T, Pacheco-Coello R, Sánchez-Timm E, Santos-Ordóñez E. Plant promoters: their identification, characterization, and role in gene regulation // *Genes (Basel).* 2023. V.14(6). P.1226. doi: 10.3390/genes14061226
29. Zhao CM, Hou H, Xing MG, Xue RG. Identification of stigma specific expression fragment in the promoter of a soybean chitinase class I gene // *Mol Biol (Mosk).* 2023. V.57(1). P. 95–97. doi: 10.31857/S0026898423010172 (In Russian)

References

1. Amack SC, Antunes MS. CaMV35S promoter – a plant biology and biotechnology workhorse in the era of synthetic biology. *Current Plant Biology.* 2020. V.24. P.100179. doi: 10.1016/j.cpb.2020.100179

2. Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2020. V.26. e00450. doi: 10.1016/j.btre.2020.e00450
3. Dong OX, Yu S, Jain R, Zhang N, Duong PQ, Butler C, Li Y, Lipzen A, Martin JA, Barry KW, Schmutz J, Tian L, Ronald PC. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9. *Nat Commun*. 2020. V.11(1). P.1178. doi: 10.1038/s41467-020-14981-y
4. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*. 2019. V.5(1). P.50-59. doi: 10.1016/j.eng.2018.11.006
5. Halfhill MD, Millwood RJ, Rufty TW, Weissinger AK, Stewart CN Jr. Spatial and temporal patterns of green fluorescent protein (GFP) fluorescence during leaf canopy development in transgenic oilseed rape, *Brassica napus* L. *Plant Cell Rep*. 2003. V.22(5). P.338-343. doi: 10.1007/s00299-003-0696-4
6. He Y, Zhang T, Sun H, Zhan H, Zhao Y. A reporter for noninvasively monitoring gene expression and plant transformation. *Hortic Res*. 2020. V.7(1). P.152. doi: 10.1038/s41438-020-00390-1
7. Hill TA, Day CD, Zondlo SC, Thackeray AG, Irish VF. Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA3*. *Development*. 1998. V.125(9). P.1711-1721. doi: 10.1242/dev.125.9.1711
8. Huttly A. Reporter genes. // *Methods Mol Biol*. 2009. V.478. P.39-69. doi: 10.1007/978-1-59745-379-0_3
9. Jores T, Tonnie J, Wrightsman T, Buckler ES, Cuperus JT, Fields S, Queitsch C. Synthetic promoter designs enabled by a comprehensive analysis of plant core promoters. *Nat Plants*. 2021. V.7(6). P.842-855. doi: 10.1038/s41477-021-00932-y
10. Kaur N, Alok A, Shivani, Kumar P, Kaur N, Awasthi P, Chaturvedi S, Pandey P, Pandey A, Pandey AK, Tiwari S. CRISPR/Cas9 directed editing of lycopene epsilon-cyclase modulates metabolic flux for β -carotene biosynthesis in banana fruit. *Metab Eng*. 2020. V.59. P.76-86. doi: 10.1016/j.ymben.2020.01.008
11. Kowalczyk T, Merecz-Sadowska A, Picot L, Brčić Karačonji I, Wieczfinska J, Śliwiński T, Sitarek P. Genetic manipulation and bioreactor culture of plants as a tool for industry and its applications. *Molecules*. 2022. V.27(3). P.795. doi: 10.3390/molecules27030795
12. Lee J, Lee SK, Park JS, Lee KR. Plant-made pharmaceuticals: exploring studies for the production of recombinant protein in plants and assessing challenges ahead. *Plant Biotechnol Rep*. 2023. V.17(1). P.53-65. doi: 10.1007/s11816-023-00821-0
13. Malik K, Wu K, Li XQ, Martin-Heller T, Hu M, Foster E, Tian L, Wang C, Ward K, Jordan M, Brown D, Gleddie S, Simmonds D, Zheng S, Simmonds J, Miki B. A constitutive gene expression system derived from the *tCUP* cryptic promoter elements. *Theor Appl Genet*. 2002. V.105(4). P.505-514. doi: 10.1007/s00122-002-0926-0
14. Mock HP, Martin C, Matros A. Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. *Metab Eng*. 2018. V.48. P.218-232. doi: 10.1016/j.ymben.2018.06.004
15. Nazarian-Firouzabadi F, Torres MT, de la Fuente-Nunez C. Recombinant production of antimicrobial peptides in plants. *Biotechnol Adv*. 2023. P.108296. doi: 10.1016/j.biotechadv.2023.108296
16. Nocarova E, Fischer L. Cloning of transgenic tobacco BY-2 cells; an efficient method to analyse and reduce high natural heterogeneity of transgene expression. *BMC Plant Biol*. 2009. V.9. P.44. doi: 10.1186/1471-2229-9-44
17. Novoselja T.V., Dejneko E.V. Modelirovanie nestabil'noj jekspressii gena *npt II* u transgennyh rastenij tabaka. *Fiziologija rastenij*. 2002. Vol.49(3). P. 437-443. [Modeling of unstable expression of the *npt II* gene in transgenic tobacco plants] (In Russian)
18. Rudenko NN; Vetoshkina DV; Marenkova TV; Borisova-Mubarakshina MM. Antioxidants of non-enzymatic nature: their function in higher plant cells and the ways of boosting their biosynthesis. *Antioxidants*. 2023. V.12. P.2014. doi:10.3390/antiox12112014
19. Santamaria M, Thomson CJ, Read ND, Loake GJ. The promoter of a basic *PR1-like* gene, *AtPRBI*, from *Arabidopsis* establishes an organ-specific expression pattern and responsiveness to ethylene and methyl jasmonate. *Plant Mol Biol*. 2001. V.47(5). P.641-652. doi: 10.1023/a:1012410009930
20. Shakhova ES, Markina NM, Mitiouchkina T, Bugaeva EN, Karataeva TA, Palkina KA, Fakhranurova LI, Yampolsky IV, Sarkisyan KS, Mishin AS. Systematic comparison of plant promoters in *Nicotiana* spp. expression systems. *Int J Mol Sci*. 2022. V.23(23). P.15441. doi: 10.3390/ijms232315441
21. Sidorchuk Y.V., Marenkova T.V., Kuznetsov V.V., Deineko E.V., Gerasimenko I.M., Sheludko Y.V. Peculiarities of *uidA* gene expression under the control of *ap3* and *rpt2a* tissue-specific gene promoters of *Arabidopsis thaliana* L. in *Nicotiana tabacum* L. transgenic plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2021. V. 68(5). P. 838-848. doi: 10.31857/S0015330321040175
22. Stroud H, Ding B, Simon SA, Feng S, Bellizzi M, Pellegrini M, Wang GL, Meyers BC, Jacobsen SE. Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. *ELife*. 2013. 2. e00354. doi: 10.7554/eLife.00354
23. Tian C, Zhang Y, Li J, Wang Y. Benchmarking intrinsic promoters and terminators for plant synthetic biology research. *Biodes Res*. 2022. 2022:9834989. doi: 10.34133/2022/9834989

24. Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Kobayashi M, Seki M, Shinozaki K, Okada K. *Arabidopsis Rpt2a* encoding the 26S proteasome subunit is required for various aspects of root meristem maintenance, and regulates gametogenesis redundantly with its homolog, RPT2b. *Plant Cell Physiol.* 2011. V.52(9). P.1628-1640. doi: 10.1093/pcp/pcr093
25. Ueda M, Matsui K, Ishiguro S, Sano R, Wada T, Paponov I, Palme K, Okada K. The *HALTED ROOT* gene encoding the 26S proteasome subunit Rpt2a is essential for the maintenance of *Arabidopsis* meristems. *Development.* 2004. V.131(9). P.2101-2111. doi: 10.1242/dev.01096
26. Vaucheret H. Epigenetic management of self and non-self: lessons from 40 years of transgenic plants. *C R Biol.* 2023. V.345(4). P.149-174. doi: 10.5802/crbio.96
27. Villao-Uzho L, Chávez-Navarrete T, Pacheco-Coello R, Sánchez-Timm E, Santos-Ordóñez E. Plant promoters: their identification, characterization, and role in gene regulation. *Genes (Basel).* 2023. V.14(6). P.1226. doi: 10.3390/genes14061226
28. Zhao CM, Hou H, Xing MG, Xue RG. Identification of stigma specific expression fragment in the promoter of a soybean chitinase class I gene. *Mol Biol (Mosk).* 2023. V.57(1). P. 95–97. doi: 10.31857/S0026898423010172 (In Russian)
29. Zvereva SD, Romanov GA Reporter genes for plant genetic engineering: characteristics and detection. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2000. V.47(3). P.424-432.