

УДК 581.1

**ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *uidA* ПОД УПРАВЛЕНИЕМ  
ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *AP3* И *RPT2a*  
*Arabidopsis thaliana* L. В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ *Nicotiana tabacum* L.**

© 2021 г. Ю. В. Сидорчук<sup>а, \*</sup>, Т. В. Маренкова<sup>а</sup>, В. В. Кузнецов<sup>а</sup>,  
И. М. Герасименко<sup>б</sup>, Ю. В. Шелудько<sup>б</sup>, Е. В. Дейнеко<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение “Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук”, Новосибирск, Россия

<sup>б</sup>Технический университет Дармштадта, факультет биологии, группа биотехнологии растений и метаболической  
инженерии, Дармштадт, ФРГ

\*e-mail: sidorch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 05.09.2020 г.

После доработки 03.11.2020 г.

Принята к публикации 03.11.2020 г.

Исследованы особенности экспрессии репортерного гена *uidA*, кодирующего фермент β-глюкуронидазу, под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a Arabidopsis thaliana* L. в гомозиготных моноинсерционных трансгенных растениях *Nicotiana tabacum* L. Оба используемых промотора обеспечивали экспрессию репортерного гена в меристематических тканях растений табака, хотя для промотора *AP3* выявленный тип экспрессии является эктопическим. В исследованных группах независимых трансформантов и их гибридах выявлена широкая вариабельность как по накоплению мРНК, так и по ферментативной активности β-глюкуронидазы. Показано, что уровень накопления транскрипта репортерного гена *uidA* не коррелирует с уровнем ферментативной активности его продукта. Выявленная вариабельность среди анализируемых трансгенных растений табака вероятнее всего связана с особенностями организации хроматина в районах Т-ДНК инсерций и (или) обусловлена различным характером взаимодействий между цис-элементами исследуемых промоторов и растительными регуляторными элементами, расположенными вне района Т-ДНК инсерции. По результатам биоинформатического анализа в структуре исследуемых промоторов выявлено около 20-ти цис-регуляторных элементов, часть из которых обнаруживались в обоих исследуемых промоторах. В целом результаты анализа показали, что промоторы генов *AP3* и *RPT2a A. thaliana* могут быть эффективны в качестве регуляторных элементов для экспрессии трансгенов в меристематических тканях других видов растений, в частности, *N. tabacum*.

**Ключевые слова:** *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, промоторы, тканеспецифичная экспрессия, трансгенез, репортерный ген, цис-элементы

DOI: 10.31857/S0015330321040175

## ВВЕДЕНИЕ

Современные технологии модификации растений, направленные на улучшение хозяйственно-ценных признаков важных сельскохозяйственных культур, предполагают использование двух основных подходов – трансгенез и геномное редактирование. В случае создания трансгенных растений в растительный геном вводятся фрагменты экзогенных ДНК, включающие гены из различных гетерологических систем, в случае редактирования – гены, кодирующие белки с нуклеазной активностью. Успешность применения этих подходов в значительной степени зависит от наличия в арсенале исследователей достаточно большого набора регуляторных генетических элементов, в том числе

и промоторов, используемых для создания генно-инженерного инструментария. В настоящее время для этих целей применяют промоторы, различающиеся по проявляемой ими активности, например, конститутивные, индуцибельные, тканеспецифичные [1–4]. Использование тканеспецифичных промоторов представляет особый интерес для исследователей, поскольку их применение дает возможность выявлять функционирование генов в определенных типах тканей, а также направленно экспрессировать в них чужеродные целевые гены [1, 4, 5]. Применение данного подхода основано на консервативности регуляторных элементов, детерминирующих экспрессию генов в каком-либо типе тканей растения. Этот факт предполагает возможность использовать их для регуляции экс-

прессии чужеродного гена в аналогичном типе тканей других видов растений. Поиск новых тканеспецифичных промоторов и оценка активности их экспрессии в гетерологичных растительных геномах с помощью репортерных генов является важным этапом при создании трансгенных растений с заданными хозяйственно-ценными признаками [6–8].

Тканеспецифичные промоторы, обеспечивающие экспрессию целевых генов в меристематических тканях растений, представляют особый интерес для биотехнологии, в частности, при культивировании активно делящихся клеток – продуцентов рекомбинантных белков. Ген *APETALA3* (*AP3*) экспрессируется в цветочных меристемах *A. thaliana* и кодирует фактор транскрипции группы В, регулирующий развитие цветка [9, 10]. Ген *RPT2a* кодирует АТФазу в составе 19S регуляторной субъединицы 26S протеасомы *A. thaliana* и экспрессируется преимущественно в апикальных меристемах корня и стебля [6, 11]. Представляет интерес исследование возможности применения промоторов этих генов в генетических конструкциях в качестве регуляторных элементов и оценка особенности их регуляции в гетерологичных системах. Целью данной работы было выявление особенностей экспрессии гена *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana* в трансгенных растениях *N. tabacum*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Растительный материал.** В качестве исходного материала использовали моноинсерционные гомозиготные ( $T_2$ ) трансгенные растения табака (*N. tabacum* L., сорт Petit Havana, линия SR1) и их гибриды ( $F_1$ ). Исходные трансформанты ( $T_0$ ) табака были получены нами ранее методом агробактериального переноса двух генетических конструкций на основе вектора pBIN19 [12]. Генетические конструкции включали репортерный ген *uidA* под управлением промотора гена *AP3* или гена *RPT2a*. Промотор гена *AP3* длиной 620 п.н. от точки старта транскрипции в сочетании с 5'-НТР ВТМ (5'-нетранслируемый район вируса табачной мозаики), а также промотор и 5'-НТР гена *RPT2a* длиной 1667 п.н. от стартового кодона были амплифицированы с геномной ДНК *A. thaliana*. В работе были проанализированы потомки  $T_2$  7-ми независимо полученных моноинсерционных линий с промотором гена *AP3* (линии a1–a7) и 8-ми – с промотором гена *RPT2a* (линии g1–g8).

Отбор моноинсерционных гомозиготных линий проводили с использованием общепринятого теста на устойчивость к антибиотику канамицину в поколениях  $T_1$  и  $T_2$ . Для получения семян от самоопыления и последующего их анализа соцветия трансформантов предварительно изоли-

ровали пергаментными колпачками. Собранные отдельно из каждой коробочки семена анализировали по устойчивости к селективному агенту при посеве на стандартную агаризованную МС-среде с добавлением антибиотика канамицина в концентрации 200 мг/л. В  $T_1$  для дальнейшего анализа отбирали генотипы с расщеплением по устойчивости к канамицину  $3K_m^+ : 1K_m^-$  (зеленые : белые), что свидетельствовало об единичной инсерции трансгена. Устойчивые к антибиотику генотипы выращивали в теплице, самоопыляли для получения поколения  $T_2$  и вновь тестировали по устойчивости к антибиотику. Моноинсерционные гомозиготные растения  $T_2$ , не дающие расщепления (все зеленые) на среде с канамицином, использовали для изучения особенностей экспрессии *uidA*-гена под управлением исследуемых тканеспецифичных промоторов. Гибриды  $F_1$  между моноинсерционными гомозиготными растениями получали с помощью искусственного опыления путем нанесения пыльцы на пестики предварительно изолированных и кастрированных цветков в соответствии с типом изучаемого промотора.

Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы с фотопериодом 16/8 ч и при температуре 22/18°C (день/ночь).

**Гистохимическое выявление экспрессии гена *uidA* в тканях трансгенных растений табака (GUS-окрашивание).** Для выявления особенностей экспрессии гена *uidA* под управлением исследуемых промоторов в цветках в качестве модели использовали бутоны трансгенных растений табака на стадиях развития II, IV и VI согласно классификации по Koltunow с соавт. [13]. Для анализа особенностей экспрессии гена *uidA* в апикальных меристемах корня и стебля моноинсерционных гомозиготных растений  $T_2$  и их гибридов  $F_1$  использовали 6-ти недельные растения табака. Для этого стерилизованные 96%-ным этанолом семена с последующей их двукратной промывкой стерильной дистиллированной водой высевали на агаризованную МС-среду с добавлением антибиотика канамицина (200 мг/л). Растения выращивали из семян в условиях факторостатной комнаты при освещении 10 клк, фотопериоде 16/8 ч (день/ночь) и температуре 24°C. Окрашивание бутонов и растений в возрасте 6-ти недель проводили в реакционной смеси следующего состава: 100 мМ фосфатный буфер (pH = 7.0), 10 мМ EDTA, 0.1% Triton X100 и 1 мМ X-Gluc (Fermentas, США). Для улучшения качества окрашивания свежий растительный материал в реакционной смеси помещали в камеру геной пушки (PSD-1000/He, Biogad, США) и удаляли воздух с помощью вакуумирования. Обработанный таким образом материал оставляли на ночь в термостате при температуре 37°C. После окрашивания материал отмывали от хлорофилла 70%-ным этанолом.

**Количественное определение активности репортерного белка  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS).** Измерение активности GUS в экстрактах растений табака проводили в соответствии со стандартной методикой [14]. Для получения белковых экстрактов 6-ти недельные растения (общей массой около 150 мг) гомогенизировали в 200 мкл экстракционного буфера следующего состава: 50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.0, 10 мМ ЭДТА, 0.1% Triton X-100, 0.1% лауроилсаркозин натрия соль, 10 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол. Флуоресценцию измеряли на флуориметре Victor3 1420 (“Perkin Elmer”, США) при длине волны возбуждения 355 нм и длине волны испускания 455 нм. Калибровку флуоресценции проводили с помощью стандартного раствора 1 мМ 4-метилумбеллиферона (4-MU, Sigma-Aldrich, США) в 0.2 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Активность  $\beta$ -глюкуронидазы рассчитывали после определения общего растворимого белка в экстрактах по методу

Bradford [15] с использованием раствора БСА в экстракционном буфере в качестве стандарта. Измерения проводили в 3 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 тканей 6-ти недельных растений с помощью набора реактивов RNeasy® Plant Mini Kit (Quiagen, Германия), РНК обрабатывали DNase I и 4  $\mu\text{g}$  РНК брали для синтеза кДНК (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, США).

Анализ экспрессии гена *uidA* проводили при помощи ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Структура праймеров и зондов следующая:

*gsp\_прямой* – 5'-TGGAAACTTTAGGGTCCTTACTAC-3',  
*gsp\_обратный* – 5'-CAAGCCTTGTAGTGAGCATCTG-3',  
*gsp\_зонд* – 5'-FAM-ATGACTTATCCGCTCCAGCACCCAC-BHQ1-3';  
*uidA\_прямой* – 5'-CTTCCATGATTTCTTTAACTATGC-3',  
*uidA\_обратный* – 5'-GCACAGTTCATAGAGATAACC-3',  
*uidA\_зонд* – 5'-FAM-TACACCACGCCGAACACCTG-BHQ1-3'.

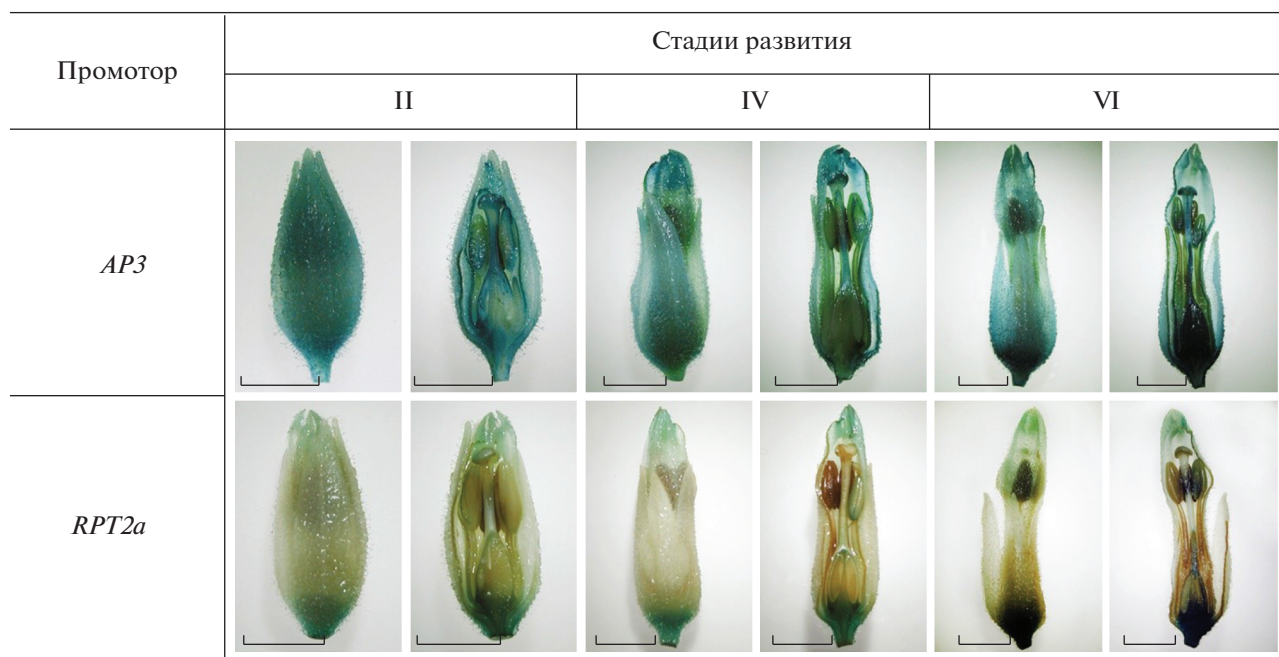
Программа амплификации: 95°C – 3 мин, далее 5 циклов без детекции (95°C – 10 сек, 61°C – 20 сек, 72°C – 5 сек); затем 40 циклов с детекцией на стадии отжига (канал FAM): 95°C – 10 сек, 61°C – 20 сек, 72°C – 5 сек. Каждый образец амплифицировали в трех аналитических повторностях. Уровень экспрессии оценивали при помощи ПО “Bio-Rad CFX Manager 2.1”. Уровень экспрессии гена *uidA* выражали в процентах относительно экспрессии гена *GSP* табака, кодирующего глутаминсинтетазу.

**Биоинформатический анализ тканеспецифических промоторов генов *AP3* и *RPT2a A. thaliana*.** Для предварительной обработки и анализа нуклеотидных последовательностей с использованием общедоступных баз данных использовали онлайн ресурсы Blast ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) и Clustalo (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>). Для биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей исследуемых промоторов использовали программы PLACE (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=new-place>), PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) в соответствии с руководством и рекомендациями разработчиков, а также TSSP и Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=tssp&group=programs&subgroup=promoter>).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Особенности экспрессии *uidA* гена в различных тканях трансгенных растений табака.** Результаты сравнительного анализа особенностей экспрессии гена *uidA* под управлением промоторов тканеспецифических генов *AP3* и *RPT2a* на модели цветков трансгенных растений табака на стадиях развития II, IV и VI представлены на рис. 1. Интенсивность и локализация гистохимического окрашивания элементов цветка и околоцветника в анализируемых группах трансгенных растений существенно различалась, что свидетельствовало об особенностях функционирования исследуемых регуляторных элементов. В цветках растений табака, у которых *uidA* ген находился под управлением промотора гена *AP3*, на всех исследуемых стадиях развития (рис. 1) синее GUS-окрашивание гистохимически выявлялось во всех элементах цветка (за исключением тычиночных нитей). Интенсивность окрашивания цветков у 7-ми независимо полученных трансгенных растений табака варьировала, однако характер окрашивания элементов развивающихся цветков и околоцветников в целом оставался одинаковым.

Ген *AP3* согласно ABC-модели флорального морфогенеза в цветках *A. thaliana* кодирует транскрипционный фактор группы В и экспрессируется только в лепестках и тычинках [9, 16]. Наличие GUS-окрашивания во всех остальных частях



**Рис. 1.** Особенности гистохимического GUS-окрашивания тканей цветков на трех стадиях их развития у трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana*. Масштабная линейка – 5 мм.

цветка и околоцветника носит эктопический характер. Ранее анализ активности промотора гена *AP3* по характеру распределения GUS-окрашивания был проведен на примере трансгенных растений *A. thaliana*, то есть в его исходном генетическом окружении, и эктопической экспрессии обнаружено не было [10, 17]. Более того, было показано, что длина минимального промотора, обеспечивающего корректную по времени и месту локализации экспрессию репортерного гена *uidA* в трансгенных растениях *A. thaliana*, находится в границах 556 – 727 п.н. от точки старта транскрипции [10]. В соответствии с этим клонированный нами фрагмент промотора длиной 620 п.н. от точки старта транскрипции должен содержать набор цис-регуляторных элементов, необходимых для корректной экспрессии репортерного гена. Тем не менее, регуляция экспрессии факторов транскрипции генов флорального морфогенеза весьма сложна. Известно, что положительным активатором транскрипции гена *AP3*, например, является ген идентичности флоральной меристемы *API* [16]. Предполагается, что *API* может действовать в комбинации с другими кофакторами для подавления эктопической экспрессии *AP3* в первом и четвертом кругах флоральной меристемы, возможно, путем прямого связывания с блоком CA<sub>2</sub>G 3 [10]. В геноме табака обнаружено как минимум два *API*-подобных гена, экспрессирующихся в цветках [7]. Вполне возможно, что данные транскрипционные факторы табака по каким-то причи-

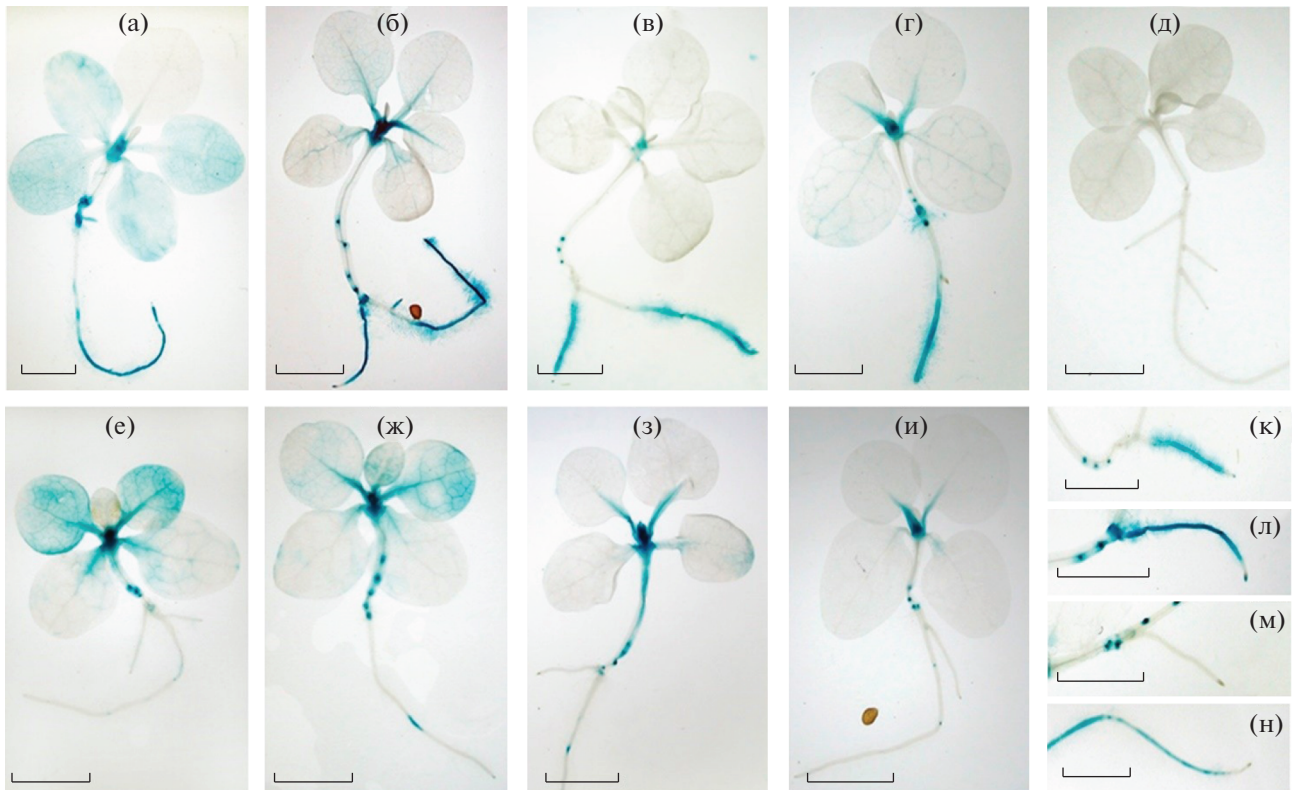
нам не взаимодействуют с используемым нами фрагментом промотора гена *AP3* *A. thaliana* и, соответственно, не могут ограничить его транскрипционную активность только правильными, 2-м и 3-м кругами флоральной меристемы. Однако данное предположение требует дополнительных исследований.

Можно допустить также, что эктопический характер GUS-окрашивания в исследованных нами растениях объясняется использованием омега-лидерной последовательности BTM [18] вместо нативного 5'-НТР гена *AP3* *A. thaliana*. Эта замена была предпринята с целью усиления уровня трансляции трансгена, однако известно, что в ряде случаев тканеспецифичность накопления белка определяется не только на транскрипционном, но и на трансляционном уровне [19].

В цветках растений табака с геном *uidA* под управлением промотора гена *RPT2a* на всех исследуемых стадиях развития GUS-окрашивание выявлялось в цветоножке и цветоложе, и очень слабое – в развивающихся лепестках (рис. 1). Окрасивание таких элементов цветка как пестик, завязь, тычинки и тычиночные нити отсутствовало. Слабый характер окрашивания отдельных элементов цветка, либо полное отсутствие окрашивания, было характерно для всех 8-ми независимо полученных трансгенных растений табака.

Ген *RPT2a*, кодирующий АТФазу в составе 19S регуляторной субъединицы 26S протеасомы у *A. thaliana*, необходим для поддержания клеточ-





**Рис. 2.** Особенности гистохимического окрашивания тканей у двух групп трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana*. (а) – (в), (к), (л) – растения *AP3*; (г) – гибрид  $F_1$  *AP3*; (е) – (з), (м), (н) – растения *RPT2a*; (и) – гибрид  $F_1$  *RPT2a*; (д) – нетрансгенный контроль SR1. Масштабная линейка – 3 мм.

ной организации апикальных меристем вегетативных тканей [6, 11]. Его действие заключается в регулировании времени и направления деления клеток как в меристемах побегов, так и в меристемах корней [11]. Кроме того, показано, что *RPT2a* ингибирует переход от митоза к эндоредупликации в контрольной точке G2/M клеточного цикла [6].

Известно, что в геноме *A. thaliana* RPT2 АТФаза 19S регуляторной субъединицы 26S протеасомы кодируется двумя дублированными генами *RPT2a* и *RPT2b*. Транскрипты этих генов обнаруживаются в самых различных тканях и органах, включая стебли, листья, корни и даже цветочные бутоны, а их белковые продукты обладают высокой степенью гомологии и различаются всего тремя аминокислотными остатками [6, 11]. Таким образом, *RPT2a* и *RPT2b* промоторы *A. thaliana* обеспечивают определенный уровень экспрессии гена *uidA* и после превращения вегетативной меристемы в генеративную, что позволяет объяснить наличие GUS-окрашивания в отдельных элементах цветка и околоцветника у трансгенных растений табака.

На рис. 2 представлены результаты сравнительного анализа GUS-окрашивания трансгенных растений табака, различающихся между собой по двум типам промоторов генов *AP3* и *RPT2a*

*A. thaliana*. Гистохимическое окрашивание выявлялось в апикальных меристемах стебля, вдоль листовых жилок семядолей и первых настоящих листьев (рис. 2а–г; е–и). Ткани гипокотыля у моноинсерционных гомозиготных растений, за редким исключением (рис. 2з), не окрашивались. Также GUS-активность выявлялась во вторичных меристемах зон ветвления корней, в меристемах кончиков корней и в тканях корня, иногда захватывая зону корневых волосков (рис. 2к–н).

Интересен тот факт, что несмотря на вариабельность GUS-окрашивания у независимых трансформантов и их гибридных комбинаций, наблюдаемая картина была схожа для обеих групп исследуемых растений табака. Однако, если для промотора гена *RPT2a* наблюдаемый тип экспрессии *uidA* гена является нормой, то для промотора гена *AP3*, кодирующего фактор транскрипции флорального морфогенеза *A. thaliana*, экспрессия в меристемах и тканях вегетативных органов является эктопической. У мутанта *A. thaliana* по гену *CLF* (*curly leaf*), относящегося к семейству генов *polycomb*, наличие транскрипта *AP3* детектировалось в листьях [20]. Тем не менее выявленный нами тип эктопического проявления гена *uidA* под

**Таблица 1.** Специфичность экспрессии гена *uidA* в тканях и органах трансформантов табака.

Промотор	Меристемы		Элементы цветка и околоцветника					
	стеблевая	корневая	цветоножка и цветоложе	чашелистики	лепестки	тычинки	пестик	завязь
<i>AP3</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>RPT2a</i>	+	+	+	–	+	–	–	–

управлением промотора гена *AP3* ранее описан в литературе не был.

Показано, что распределение GUS-активности в трансгенных растениях *A. thaliana* детерминированной геном *uidA* под управлением *RPT2a* и *RPT2b* промоторов в целом является сходным и отражает локализацию мРНК. Тем не менее, *RPT2a* промотор обеспечивает более высокую активность репортерного гена в меристемах побегов, а *RPT2b* – в меристемах побегов и корней [6]. Таким образом, результаты, полученные нами на модели трансгенных растений табака, в которых ген *uidA* находился под управлением промотора *RPT2a*, совпадают с результатами, полученными на модели трансгенных растений *A. thaliana*.

Согласно суммированным данным, представленным в табл. 1, применение промотора гена *AP3* в сочетании с 5'-НТР ВТМ в гетерологичной системе (в геноме табака) приводит к экспрессии репортерного гена практически во всех элементах цветка и околоцветника, а также в стеблевых и корневых меристемах растений. Промотор гена *RPT2a*, напротив, в гетерологичной системе экспрессии высоко активен только в стеблевых апикальных меристемах, менее активен в корневых меристемах, а в цветке обеспечивает экспрессию репортерного гена только в определенных частях (цветоножка, цветоложе и лепестки).

Таким образом, результаты сравнительного анализа гистохимического GUS-окрашивания тканей цветков двух групп трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana* показали, что узкая специфичность регуляторных элементов не всегда эффективно сохраняется при их сочетании с альтернативными 5'-НТР и/или переносе в новое генетическое окружение других видов растений. При этом можно предположить, что изменение специфичности промотора, как показано нами на примере промотора *AP3*, может служить расширению возможностей его использования в гетерологичных системах экспрессии, что находит подтверждение и в других исследованиях [21].

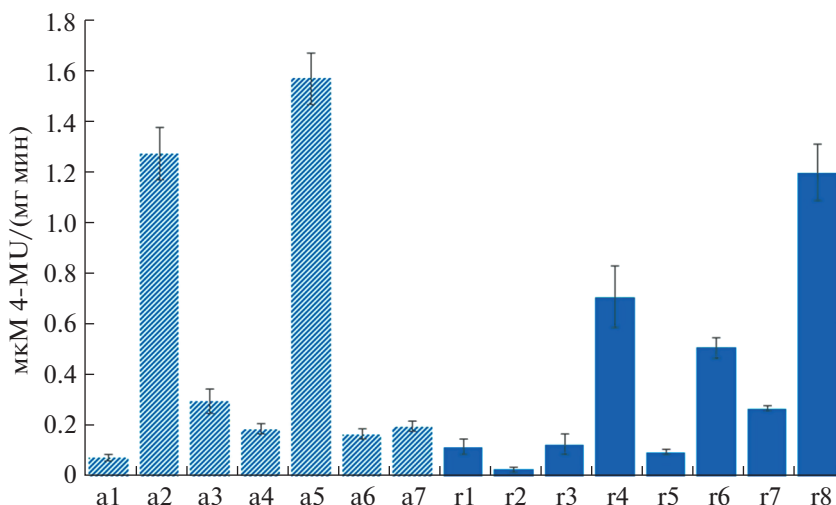
Поскольку оба исследуемых промотора генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana* были способны сохранять свои функции в геноме трансгенных растений табака, причем активность промотора гена *AP3* проявлялась как эктопическая, представляло ин-

терес провести сравнительный анализ эффективности экспрессии гена *uidA* под управлением этих промоторов в меристемах стебля и корня. Для этого была проведена оценка активности фермента β-глюкуронидазы в меристемах трансгенных растений табака.

**Сравнительный анализ активности β-глюкуронидазы в меристемах трансгенных растений табака.** Результаты сравнительного анализа по активности β-глюкуронидазы в меристемах T<sub>2</sub>-потомков от самоопыления независимо полученных трансгенных растений табака с одной инсерцией гена *uidA* под управлением промоторов генов *AP3* и *RPT2a* представлены на рис. 3.

Как видно на рис. 3, для обеих анализируемых групп растений характерна широкая вариабельность по активности β-глюкуронидазы. В тканях растений табака с геном *uidA* под управлением промотора *AP3* выявлены 20-ти кратные превышения максимальных значений по активности анализируемого фермента ( $1.57 \pm 0.10$  мкМ 4-MU/ (мг мин) для растения а5) над минимальными ( $0.08 \pm 0.01$  для растения а1). Еще более значительные отличия по анализируемому признаку были выявлены для растений табака с геном *uidA* под управлением промотора *RPT2a*. Так, например, максимальное значение активности у растения г8 составило  $1.20 \pm 0.11$ , а минимальное у растения г2 –  $0.03 \pm 0.01$  мкМ 4-MU/ (мг мин), с превышением максимального значения активности фермента по сравнению с минимальным в 40 раз. Согласно критерию Краскела-Уоллиса, для непараметрического сравнения данных по активности фермента между исследуемыми группами растений достоверных отличий ( $H(1; N = 15) = 0.4821442$ ,  $p = 0.4875$ ) не выявлено.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оба промотора в целом с одинаковой эффективностью обеспечивают наработку транскрипта исследуемого репортерного гена *uidA* и могут быть использованы в качестве регуляторных элементов для экспрессии трансгенов в меристематических тканях растений. Несмотря на эктопический характер экспрессии, промотор гена *AP3* *A. thaliana* с успехом может быть использован при создании генно-инженерных векторов для экспрессии целевых генов в стеблевых и корневых меристемах.



**Рис. 3.** Активность  $\beta$ -глюкуронидазы в меристемах трансгенных растений табака с геном *uidA* под управлением тканеспецифичных промоторов *A. thaliana*. a1–a7 – ген *uidA* под управлением промотора гена *AP3*; r1–r8 – ген *uidA* под управлением промотора гена *RPT2a*.

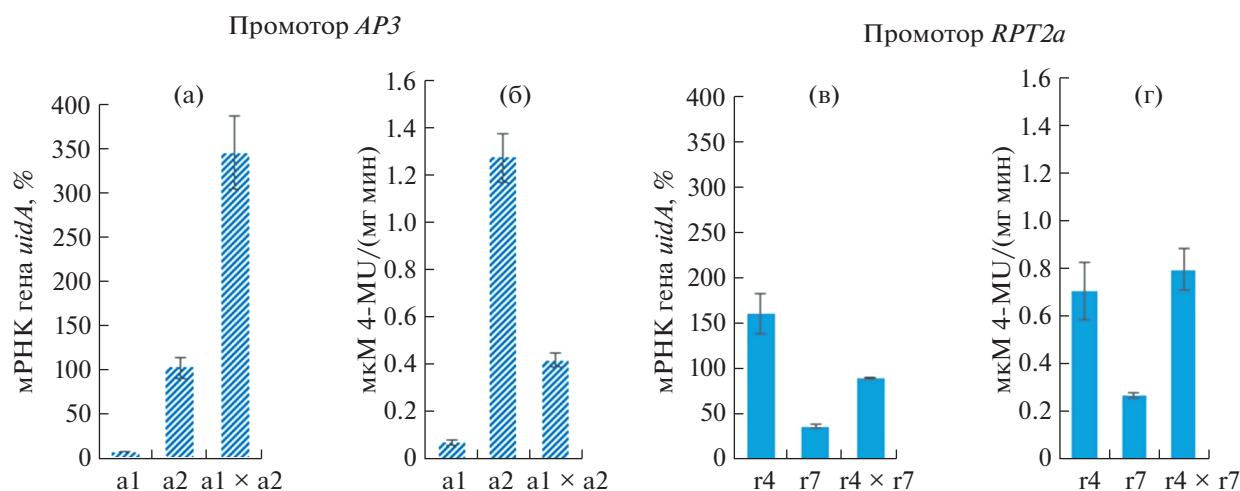
Наблюдаемая вариабельность по активности  $\beta$ -глюкуронидазы у анализируемых трансгенных растений табака может быть связана с различными факторами, в частности, с особенностями организации хроматина в районах встройки T-ДНК, организацией самих инсерций и их копийности. Вариабельность по экспрессии трансгенов, интегрированных в разные районы генома, продемонстрирована во многих работах [22–24]. Достоверное увеличение активности  $\beta$ -глюкуронидазы в тканях трансгенных растений табака при объединении в геноме двух копий гена *uidA* под управлением конститутивного 35S промотора вируса мозаики цветной капусты было показано нами ранее [25]. В связи с этим представляло интерес проанализировать взаимосвязь между активностью фермента  $\beta$ -глюкуронидазы и количеством мРНК, транскрибируемой с *uidA* гена, не только у гомозиготных трансгенных растений, различающихся по активности фермента, но и у гибридов между ними.

**Анализ взаимосвязи активности  $\beta$ -глюкуронидазы с накоплением мРНК в меристемах трансгенных растений табака.** Результаты количественного анализа мРНК, транскрибируемой с *uidA* гена под управлением двух исследуемых тканеспецифичных промоторов, и активности его белкового продукта у независимо полученных трансгенных растений табака, а также гибридов между ними, представлены в табл. 2. Сопоставляя полученные данные, следует отметить отсутствие очевидной прямой взаимосвязи между этими параметрами, то есть ферментативная активность белка GUS не коррелирует с наблюдаемыми флуктуациями по экспрессии соответствующего транскрипта.

В качестве примера на рис. 4 представлены данные сравнительного анализа накопления мРНК гена *uidA* и активности фермента  $\beta$ -глюкуронидазы

в тканях 6-ти недельных трансгенных растений табака, контрастно различающихся по экспрессии репортерного гена, а также в тканях гибридов F<sub>1</sub>, полученных от их скрещивания.

В случае использования промотора *AP3* низкий уровень накопления мРНК в тканях моноинсерционных гомозиготных растений линии a1 ( $7.50 \pm 0.60\%$ ) соответствовал низкой активности фермента ( $0.08 \pm 0.01$  мкМ 4-MU/(мг мин)), в то же время более высокий уровень мРНК у растений a2 ( $102.10 \pm 12.10\%$ ) коррелировал с более высокими значениями ферментативной активности ( $1.27 \pm 0.10$  мкМ 4-MU/(мг мин)). Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае использования промотора *RPT2a* (рис. 4). Более низкому значению накопления мРНК ( $37.70 \pm 2.60\%$ ) у растений линии r7 соответствовала и низкая активность фермента ( $0.27 \pm 0.01$  мкМ 4-MU/(мг мин)), а более высокому уровню мРНК ( $161.60 \pm 22.40\%$ ) у растений линии r4 соответствовала более высокая активность фермента ( $0.71 \pm 0.12$  мкМ 4-MU/(мг мин)). Однако при объединении двух независимых инсерций T-ДНК в геноме гибридных растений подобной корреляции между уровнем накопления транскрипта и ферментативной активностью не наблюдалось. Так, у гибридных растений F<sub>1</sub> (a1  $\times$  a2) с промотором гена *AP3* уровень экспрессии *uidA*-гена по накоплению мРНК значительно превысил этот показатель у родительских форм ( $343.20 \pm 41.00\%$ ), в то же время активность  $\beta$ -глюкуронидазы заняла лишь промежуточное положение ( $0.42 \pm 0.03$  мкМ 4-MU/(мг мин)), существенно уступив одной из родительских форм (табл. 2; рис. 4а, б). При объединении двух *uidA* генов под управлением промотора гена *RPT2a* в гибридном геноме (F<sub>1</sub> r4  $\times$  r7) ак-



**Рис. 4.** Сравнительный анализ накопления мРНК гена *uidA* и активности  $\beta$ -глюкуронидазы в трансгенных растениях табака и гибридах  $F_1$  от их скрещивания. (а), (в) – количество мРНК, % от мРНК гена *GSP*; (б), (г) – активность  $\beta$ -глюкуронидазы, мкМ 4-MU/(мг мин). Обозначения: а1, а2 – *uidA* под управлением промотора *ар3*,  $F_1$  (а1  $\times$  а2) – гибрид от скрещивания а1 и а2; г4, г7 – *uidA* под управлением промотора *RPT2a*,  $F_1$  (г4  $\times$  г7) – гибрид от скрещивания г4 и г7.

**Таблица 2.** Характеристика трансгенных растений табака с геном *uidA* по накоплению мРНК и активности  $\beta$ -глюкуронидазы.

Моноинсерционные гомозиготные растения и их гибриды $F_1$	Количество мРНК гена <i>uidA</i> , %	Активность $\beta$ -глюкуронидазы, мкМ 4-MU/(мг мин)
а1	7.5 $\pm$ 0.6	0.08 $\pm$ 0.01
а2	102.1 $\pm$ 12.1	1.27 $\pm$ 0.10
а3	19.8 $\pm$ 4.2	0.30 $\pm$ 0.05
а4	31.2 $\pm$ 4.9	0.19 $\pm$ 0.02
а5	–	1.57 $\pm$ 0.10
а6	–	0.17 $\pm$ 0.02
а7	–	0.20 $\pm$ 0.02
$F_1$ а3 $\times$ а4	58.8 $\pm$ 4.8	0.36 $\pm$ 0.05
$F_1$ а2 $\times$ а4	72.8 $\pm$ 7.0	0.44 $\pm$ 0.03
$F_1$ а2 $\times$ а3	84.8 $\pm$ 8.6	0.31 $\pm$ 0.01
$F_1$ а1 $\times$ а2	343.2 $\pm$ 41.0	0.42 $\pm$ 0.03
$F_1$ а1 $\times$ а4	36.8 $\pm$ 5.9	0.15 $\pm$ 0.03
$F_1$ а1 $\times$ а3	79.9 $\pm$ 6.0	0.25 $\pm$ 0.05
г1	–	0.12 $\pm$ 0.03
г2	–	0.03 $\pm$ 0.01
г3	–	0.13 $\pm$ 0.04
г4	161.6 $\pm$ 22.4	0.71 $\pm$ 0.12
г5	–	0.10 $\pm$ 0.01
г6	–	0.51 $\pm$ 0.04
г7	37.7 $\pm$ 2.6	0.27 $\pm$ 0.01
г8	–	1.20 $\pm$ 0.11
$F_1$ г4 $\times$ г7	90.7 $\pm$ 1.2	0.80 $\pm$ 0.09



тивность  $\beta$ -глюкуронидазы, напротив, незначительно возрастала, превысив показатели родительских форм ( $0.80 \pm 0.09$  мкМ 4-МУ/ (мг мин)), на фоне промежуточных значений ( $90.70 \pm 1.20\%$ ) уровня мРНК (табл. 2; рис.4в, г).

Поскольку анализируемые трансгенные растения представляли собой потомство  $T_2$  моноинсерционных гомозигот, полученных в результате интеграции единичных инсерций Т-ДНК в случайные районы растительного генома, наблюдаемый позиционный вклад области интеграции Т-ДНК в геном трансгенного растения сопровождался различной транскрипционной активностью трансгенов в составе инсерции [22, 24]. Однако наблюдаемые нами несоответствия между уровнями мРНК и их белковых продуктов свидетельствуют о существовании сложных и все еще мало изученных механизмов декодирования генома. Дальнейшая судьба любого транскрипта может определяться многочисленными регуляторными элементами, скрытыми в их нуклеотидных контекстах [26]. В настоящий момент поиск таких регуляторных элементов и проверка их активности является весьма важной задачей, поскольку позволяет создавать синтетические промоторы, адаптированные под конкретные биоинженерные задачи, а также исследовать тонкие настройки генной экспрессии как на транскрипционном, так и на трансляционном уровнях [4, 26–28].

**Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей тканеспецифичных промоторов генов *AP3* и *RPT2a A. thaliana*.** Важную роль в обеспечении специфичности функционирования промотора любого гена играют цис-регуляторные элементы, представляющие собой короткие нуклеотидные последовательности, входящие в его структуру и обеспечивающие взаимодействие с различными транскрипционными факторами, в том числе и в ответ на воздействие внешних факторов среды [1, 2, 27]. При случайной интеграции Т-ДНК инсерций в различные районы чужеродного генома взаимодействие регуляторных элементов трансгена и транскрипционных факторов в районе интеграции инсерции может изменяться и приводить к эктопической экспрессии. В связи с этим было весьма интересно проверить, какие цис-регуляторные элементы могут входить в состав исследуемых тканеспецифичных промоторов, и могут ли они оказывать какое-либо влияние на особенности экспрессии репортерного гена в новом генетическом контексте генома табака.

Следует отметить, что биоинформатический анализ последовательности промотора гена *AP3* выявил возможность начала транскрипции на 191 нуклеотид ранее, чем было определено экспериментально. При конструировании векторов для экспрессии в растениях за точку начала транскрипции был принят 5'-конец наиболее длинной мРНК гена *AP3 A. thaliana*, существование которой было

показано экспериментально [29]. Поскольку длина 5'-НТР этой мРНК составляла только 36 п.н., было принято решение с целью повышения эффективности трансляции заменить нативный 5'-НТР гена *AP3 A. thaliana* на омега-лидер ВТМ [18].

Биоинформатический анализ позволил выявить в структуре исследуемых промоторов около 20 цис-регуляторных элементов, часть которых были перекрывающимися, то есть обнаруживались в обоих промоторах (табл. 3). Среди перекрывающихся элементов были выделены высококонсервативные элементы корового промотора. К ним относятся ТАТА-боксы, СААТ-мотив (табл. 3). Для промотора *RPT2a* также была выделена последовательность CAN(A/C)(A/C)(C/A)C(C/A)N2A(C/A) сайта инициации транскрипции. Сочетание обнаруженных ТАТА-боксов и сайта инициации транскрипции характерно для промоторов генов растений с высоким уровнем экспрессии [30].

Следует отметить, что большая часть выявленных цис-регуляторных элементов тем или иным образом связана с ответными реакциями на различные стрессовые воздействия (табл. 3). Вполне вероятно, что именно такой тип регуляции характерен для промоторов генов, функционирующих в меристематических тканях, критически ответственных за рост и развитие растений на разных этапах онтогенеза.

Наибольший интерес в данном исследовании представляли мотивы, имеющие гомологию с цис-регуляторными элементами промоторов, описанными для рода *Nicotiana*, поскольку именно они с наибольшей долей вероятности могли влиять на экспрессию репортерного гена *uidA* у полученных трансгенных растений. Анализ последовательностей выявил всего 6 таких регуляторных мотивов, из которых 3 относились к виду *N. glutinosa* L., и 3 – к *N. tabacum* (табл. 3). Последовательность промотора гена *AP3* включала мотивы, гомологичные элементу корового промотора (СААТ-боксы) и элементу ответной реакции на поранение (WUN-motif), характерные для *N. glutinosa*. В последовательности промотора гена *RPT2a* 19S субъединицы 26S протеасомы обнаружили участки, гомологичные AuxRE и TCA элементам, а также TC-rich повторам, отвечающим на действие ауксина, салициловой кислоты и индуцирующим стрессоустойчивость соответственно. В данном промоторе выявился мотив, гомологичный ERE-элементу *N. glutinosa*, отвечающему на воздействие этилена (табл. 3). Функциональность цис-регуляторных элементов, описанных для других неродственных табаку видов, в геноме *N. tabacum* остается под вопросом. Тем не менее, присутствие среди перекрывающихся мотивов элемента Box 4, указывает на участие света в регуляции активности экспрессии исследуемых тканеспецифичных промоторов (табл. 3).

Таблица 3. Регуляторные мотивы, обнаруживаемые в последовательностях тканеспецифических промоторов генов *AP3* и *RPT2a* *A. thaliana*.

Промоторы	Мотивы	Последовательности	Источник	Описание	
<i>AP3</i> и <i>RPT2a</i>	<b>Перекрывающиеся мотивы</b>				
	CAAT-box	СААССААСТСС (ССААТ)	<i>A. thaliana</i>	Элемент корового промотора, характерный для генов с высокой экспрессией	
	TATA-box	TATAA (TATA)		Элемент корового промотора	
	STRE	AGGGG		Элемент, участвующий в ответе на стресс	
	MYB	СААССА		Участвует в регуляции развития растений, метаболизма, старения и защитных реакций	
	MYC	САТТТГ		Участвует в ответе на стрессовые факторы: засуха, низкая температура, засоление и АБК	
	Box 4	АТТААТ		<i>Petroselinum crispum</i>	Часть консервативного участка ДНК, вовлеченного в ответ на свет
	ARE	АААССА	<i>Z. mays</i>	Индукция при анаэробных условиях	
	WRE3	ССАССТ	<i>Pisum sativum</i>	Ответ на поранение	
	<i>AP3</i>	<b>Неперекрывающиеся мотивы</b>			
		as-1	TGACG	<i>A. thaliana</i>	Регуляторный цис-элемент, вовлеченный в метилжасмонатный путь передачи сигнала
		CGTCA-motif	CGTCA	<i>H. vulgare</i>	Регуляторный цис-элемент, вовлеченный в метилжасмонатный путь передачи сигнала
		CAAT-box	САААТ	<i>Nicotiana glutinosa</i>	Элемент корового промотора, характерный для генов с высокой экспрессией
WUN-motif		СААТТАСАТ		Ответ на поранение	
W-box		ТТGACC	<i>A. thaliana</i>	Ответ на поранение и элиситоры фитопатогенных грибов	
HD-Zip 1		СААТ(А/Т)АТТG		Элемент, вовлеченный в дифференциацию палисадных клеток мезофилла листа	
AuxRE-core		GGTCCAT	<i>N. tabacum</i>	Регуляторный элемент, отвечающий на действие ауксина	
TCA-element		ССАГСТТТТТ		Цис-элемент, участвующий в ответе на салициловую кислоту	
TC-rich repeats		GТТТТСТТАС		Цис-элемент, участвующий в индукции стрессоустойчивости	
ERE		АТТТТААА	<i>N. glutinosa</i>	Регуляторный элемент, отвечающий на действие этилена	
Circadian		САААGАТАС	<i>L. esculentum</i>	Контроль циркадных ритмов	
O2-site		GATGATGTGG	<i>Z. mays</i>	Цис-элемент, участвующий в регуляции метаболизма зеина	
<i>RPT2a</i>					

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные способы модификации организмов основаны на создании искусственных генетических конструкций и их переносе, например, в геномы растений с целью улучшения хозяйственно ценных признаков. Такие экзогенные ДНК методами генной инженерии могут быть интегрированы в случайные районы генома или методами геномного редактирования — в заранее выбранные исследователями районы-мишени. В обоих случаях экспрессия чужеродных генов будет определяться различными факторами, которые могут быть связаны как с особенностями района интеграции, так и особенностями их собственной организации, например, входящими в их состав промоторами. Полученные нами результаты показывают, что оба исследованных промотора *A. thaliana* (*AP3* и *RPT2a*) обеспечивают экспрессию репортерного гена *uidA* в меристемах растений табака примерно с одинаковой эффективностью. Эктопический характер экспрессии, отмеченный для промотора *AP3*, свидетельствует о том, что узкая специфичность не всегда сохраняется в новом генетическом окружении. Однако в определенных условиях такую ситуацию можно рассматривать не как нежелательную, а, наоборот, как расширяющую возможности потенциального использования тканеспецифичных промоторов. Возможной причиной изменения специфичности, а также вариабельности уровня экспрессии переносимых генетических конструкций в условиях случайной интеграции, может служить нарушение взаимодействия соответствующих транскрипционных факторов и цис-регуляторных элементов, закодированных в их промоторных последовательностях. Исследование подобных взаимодействий является важным этапом при создании синтетических промоторов, адаптированных под решение конкретных биотехнологических задач.

Работа поддержана бюджетным проектом 0259-2021-0010 “Изучение систем контроля метаболизма живых систем в условиях взаимодействия с окружающей средой, в том числе после генетической модификации”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Potenza C., Aleman L., Sengupta-Gopalan Ch.* Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation // *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant.* 2004. V. 40. P. 1.
2. *Porto M.S., Pinheiro M.P.N., Batista V.G.L., dos Santos R.C., de Albuquerque Melo Filho P., de Lima L.M.* Plant promoters: an approach of structure and function // *Mol. Biotechnol.* 2014. V. 56. P. 38. <https://doi.org/10.1007/s12033-013-9713-1>
3. *Ali S., Kim W.-Ch.* A fruitful decade using synthetic promoters in the improvement of transgenic plants // *Front. Plant Sci.* 2019. V.10: 1433. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01433>
4. *Smirnova O.G., Shumny V.K., Kochetov A.V.* Regulatory Sequences for Constitutive, Tissue-Specific, and Induced Expression of Transgenes in Ornamental Plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2019. V. 66. P. 679. <https://doi.org/10.1134/S001533031905018X>
5. *Vyacheslavova A.O., Berdichevets I.N., Tyurin A.A., Shimshilashvili Kh.R., Mustafayev O.N., Goldenkova-Pavlova I.V.* Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities // *Russ. J. Genet.* 2012. V. 48. P. 1067.
6. *Sonoda Y., Sako K., Maki Y., Yamazaki N., Yamamoto H., Ikeda A., Yamaguchi J.* Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit // *Plant J.* 2009. V. 60. P. 68. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03932.x>
7. *Zhang J., Yan G., Wen Z. An Y.-Q., Singer S.D., Liu Z.* Two tobacco AP-like gene promoters drive highly specific, tightly regulated and unique expression patterns during floral transition, initiation and development // *Planta.* 2014. V. 239. P. 469. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1995-9>
8. *Komakhin R.A., Vysotskii D.A., Shukurov R.R., Voblikova V.D., Komakhina V.V., Strelnikova S.R., Vetchinkina E.M., Babakov A.V.* Novel strong promoter of antimicrobial peptides gene pro-SmAMP2 from chickweed (*Stellaria media*) // *BMC Biotechnol.* 2016. V. 16: 43. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0273-x>
9. *Krizek B.A., Meyerowitz E.M.* The Arabidopsis homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function // *Development.* 1996. V. 122. P. 11.
10. *Hill Th.A., Day C.D., Zondlo S.C., Thackeray A.G., Irish V.F.* Discrete spatial and temporal cis-acting elements regulate transcription of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA3* // *Development.* 1998. V. 125. P. 1711.
11. *Ueda M., Matsui K., Ishiguro S., Sano R., Wada T., Paponov I., Palme K., Okadae K.* The HALTED ROOT gene encoding the 26S proteasome subunit RPT2a is essential for the maintenance of Arabidopsis meristems // *Development.* 2004. V. 131. P. 2101. <https://doi.org/10.1242/dev.01096>
12. *Сидорчук Ю.В., Герасименко И.М., Шелудько Ю.В., Дейнеко Е.В.* Регуляторные элементы для экспрессии трансгенов в меристемах растений // *Вестник Новосибирского государственного аграрного университета.* 2017. Т. 4. С. 66.
13. *Koltunow A.M., Truettner J., Cox K.H., Wallroth M., Goldberg R.B.* Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development // *The Plant Cell.* 1990. V. 2. P. 1201.
14. *Зверева С.Д., Романов Г.А.* Репортерные гены для генетической инженерии растений: характеристика и методы тестирования // *Физиология растений.* 2000. Т. 47. С. 479.

15. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* 1976. V. 72. P. 248.
16. O'Maoileidigh D.S., Graciet E., Wellmer F. Gene networks controlling *Arabidopsis thaliana* flower development // *New Phytologist.* 2014. V. 201. P. 16. <https://doi.org/10.1111/nph.12444>
17. Tilly J.J., Allen D.W., Jack T. The CArG boxes in the promoter of the *Arabidopsis* floral organ identity gene *APETALA3* mediate diverse regulatory effects // *Development.* 1998. V. 125. P. 1647.
18. Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W., Turner Ph.C., Wilson T.M.A. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo // *Nucleic Acids Res.* 1987. V. 15. P. 3257.
19. Кочетов А.В., Филипенко Е.А., Смирнова О.Г., Шумный В.К. Энкапсуляция транскрипции для генной инженерии растений // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2014. Т. 18. С. 610.
20. Goodrich J., Puangsomlee P., Martin M., Long D., Meyerowitz E.M., Coupland G.A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis* // *Nature.* 1997. V. 386. P. 44.
21. Arce A.L., Cabello J.V., Chan R.L. Patents on plant transcription factors // *Recent Patents on Biotechnology.* 2008. V. 2. P. 209. <https://doi.org/10.2174/187220808786241024>
22. Butaye K.M.J., Cammue B.P.A., Delaure S.L., De Bolle M.F.C. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants // *Molecular Breeding.* 2005. V. 16. P. 79. <https://doi.org/10.1007/s11032-005-4929-9>
23. Bako A., Gell G., Zámbo A., Spitko T., Pok I., Pinter J., Balazs E. Monitoring transgene expression levels in different genotypes of field grown maize (*Zea mays* L.) // *S. Afr. J. Bot.* 2013. V. 84. P. 6. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2012.09.005>
24. Маренкова Т.В., Сидорчук Ю.В., Носов А.В., Фоменков А.А., Кузнецов В.В., Мурсалимов С.Р., Загорская А.А., Уварова Е.А., Белавин П.А., Дейнеко Е.В. Вариабельность по экспрессии *GFP*-гена в моноклональных клеточных линиях *Arabidopsis thaliana* // *Биотехнология.* 2019. Т. 35. С. 58.
25. Marenkova T.V., Deineko E.V. A change in the stability of marker *nptII* and *uidA* gene expression in transgenic tobacco plants // *Russ. J. Genet.* 2006. V. 42. P. 518.
26. Goldenkova-Pavlova I.V., Pavlenko O.S., Mustafaev O.N., Deyneko I.V., Kabardaeva K.V., Tyurin A.A. Computational and experimental tools to monitor the changes in translation efficiency of plant mRNA on a genome-wide scale: advantages, limitations, and solutions // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20: 33. <https://doi.org/10.3390/ijms20010033>
27. Venter M. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. P. 118. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.002>
28. Hernandez-Garcia C.M., Finer J.J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements // *Plant Sci.* 2014. V. 217–218. P. 109. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.12.007>
29. Jack T., Brockman L.L., Meyerowitz E.M. The homeotic gene *apetala3* of *Arabidopsis thaliana* encodes a mads box and is expressed in petals and stamens // *Cell.* 1992. V. 68. P. 683.
30. Sawant S., Singh P., Gupta S., Madnala R., Tuli R. Conserved nucleotide sequences in highly expressed genes in plants // *J. Genet.* 1999. V. 78. P. 123.