

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Увеличение доли трансгенных растений в потомстве трансформантов рапса *Brassica napus* L.

Г.Н. Ралдугина¹✉, Т.Ж. Хоанг^{1,2}, Х.Б. Нгок¹, И.В. Карпычев¹

¹ Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт сельскохозяйственной генетики, Ханой, Вьетнам

✉ raldugina42@mail.ru

Аннотация. Семядольные и листовые экспланты двух сортов ярового рапса (канолы) были трансформированы с использованием *Agrobacterium tumefaciens*, несущими генетическую конструкцию с геном-маркером *gfp*. Для уменьшения доли витрифицированных побегов-регенерантов мы оптимизировали содержание сахарозы в среде регенерации. Анализ потомства, полученного от растений поколения T₀, показал, что в ряде линий распределение маркера *gfp* не подчинялось сегрегации моногенного признака по Менделю для самоопыляемых растений, в то время как в потомстве других линий маркер *gfp* полностью отсутствовал, хотя его присутствие было подтверждено у всех отобранных растений T₀. Обнаружено, что у индивидуальных трансформантов *gfp* наследуется случайным образом по всему центральному цветonoсу, его наличие в геноме проростков не зависело от местоположения стручка. Таким образом, в образовании гамет растений T₀ участвовали оба типа клеток – трансформированные и нетрансформированные. Помимо того, сегрегация маркера различалась у растений линий T₁, полученных черенкованием первичного трансформанта, в зависимости от местоположения черенка на стебле исходного растения, что указывает на химерность растений данного поколения. Далее установлено, что черенкование растений с последующим размножением семенами, образовавшимися в результате самоопыления, приводило к увеличению доли трансгенных растений в следующих поколениях. Полученные результаты показывают, что трансформанты были химерными, т.е. их ткани содержали как трансгенные, так и нетрансгенные клетки, и эта химерность передавалась в последующие поколения. Кроме состава питательных сред, на появление химерных растений во время трансформации влияют такие факторы, как генотип растения и тип экспланта. Основываясь на этих результатах, мы разработали упрощенный метод, состоящий из нескольких раундов комбинации черенкования, получения семян методом самоопыления и последующей отбраковки растений дикого типа, который позволил значительно обогатить популяции потомков исходных трансформантов рапса растениями, трансгенными по маркеру *gfp*.

Ключевые слова: наследование трансгена; трансформация; химера; витрификация (гипергидратация); рапс (канола).

Для цитирования: Ралдугина Г.Н., Хоанг Т.Ж., Нгок Х.Б., Карпычев И.В. Увеличение доли трансгенных растений в потомстве трансформантов рапса *Brassica napus* L. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):147-156. DOI 10.18699/VJ21.018

An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants

G.N. Raldugina¹✉, T.Z. Hoang^{1,2}, H.B. Ngoc¹, I.V. Karpichev¹

¹ Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² NKLPСB, Agricultural Genetics Institute, Hanoi, Vietnam

✉ raldugina42@mail.ru

Abstract. Cotyledon and leaf explants of two spring rapeseed varieties were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* harboring a genetic construct with the *gfp* marker gene. In order to reduce the proportion of hyper-hydrated shoots, which appeared during regenerant formation, we optimized sucrose content in the regeneration media. Analysis of the progeny obtained from T₀ regenerants showed that in a number of lines the distribution of the *gfp* marker did not follow Mendelian segregation of a monogenic trait in self-pollinated plants, while in the progeny of the other lines of transgenic plants, the *gfp* marker was completely absent, although its presence had been confirmed in all selected T₀ plants. We also found that in individual transformants *gfp* is randomly inherited throughout the central peduncle; its presence in the genome of seedlings does not depend on the location of the pod. Thus, both transformed and non-transformed cells were involved in the formation of gametes in T₀ plants. In addition, marker segregation was different in plants of the T₁ line obtained by nodal cuttings of a primary transformant, depending on the location of the cuttings on the stem of the original plant, indicating that the nature of T₁ generation plants was also chimeric. Furthermore, we showed that propagation of plants by cutting followed by propagation by seeds formed as a result of self-pollination led to an increase in the proportion of transgenic plants in subsequent gene-

rations. The results obtained during the course of this study show that the transformants were chimeric, i.e. their tissues contained both transgenic and non-transgenic cells, and this chimeric nature was passed on to subsequent generations. We found that, in addition to nutrient media composition, other factors such as plant genotype and explant type also contribute to the rising of chimeric plants during transformation. Based on these results, we developed a simplified method, which consists of several rounds of a combination of cutting, seed production by self-pollination, and subsequent culling of wild-type plants, which significantly enriched descendent populations of the original rapeseed transformants with plants transgenic for the *gfp* marker.

Key words: transgene inheritance; transformation; chimera; vitrification; rapeseeds.

For citation: Raldugina G.N., Hoang T.Z., Ngoc H.B., Karpichev I.V. An increased proportion of transgenic plants in the progeny of rapeseed (*Brassica napus* L.) transformants. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):147-156. DOI 10.18699/VJ21.018

Введение

Перенос чужеродной ДНК в растения в настоящее время стал обычной процедурой для многих видов. Однако осложнения, возникающие при регенерации побегов, могут препятствовать получению трансгенных растений.

С серьезными проблемами исследователи сталкиваются, когда законы Менделя по какой-то причине нарушаются при наследовании трансгена, интегрированного в геном полученных во время трансформации рекомбинантных растений. Это усложняет как саму экспериментальную работу, так и интерпретацию ее результатов, и потому требует дополнительного тщательного изучения.

Чужеродная ДНК, интегрированная в геном, обычно наследуется по законам Менделя и сегрегирует в строго определенных соотношениях в зависимости от количества локусов интеграции. Но в ряде случаев эти правила нарушаются и трансгены наследуются совершенно случайно (Sarmah et al., 2004; Popelka et al., 2006). В таких случаях предполагают, что неменделевское наследование может быть вызвано различными перестройками, которые происходят во время интеграции трансгенов (Walters et al., 1992; Tizaoui, Kchouk, 2012). Неканоническое наследование можно объяснить и образованием генотипических химер при регенерации растений (Schmülling, Schell, 1993).

Трансгенные растения-химеры были описаны для многих видов (Costa et al., 2002; Flachowsky et al., 2008). Появление химерных растений во время трансформации может быть обусловлено несколькими причинами, например неэффективностью селективного давления вместе с присутствующей у самих растений эндогенной устойчивостью к селективным агентам (Rakosy-Tican et al., 2007), а также защитой нетрансформированных клеток от действия селективного агента фактор-устойчивыми трансформированными клетками при регенерации (Domínguez et al., 2004). Таким образом, наиболее вероятно, что трансформированные растения-химеры происходят из группы клеток, а не из одной клетки первичного экспланта (Zhu et al., 2007). Причины образования химер редко обсуждаются в литературе, в то время как выяснение этих механизмов поможет устранить возможность появления химер. Выявить причины формирования химер помогает использование генов-репортеров, таких как гены устойчивости к антибиотикам или гербицидам, а также генов, экспрессия которых может вызывать окрашивание или свечение трансформированных клеток (Zvereva, Romanov, 2000). Одним из таких «окрашивающих» репортеров является ген *gfp*, выделенный из люминесцирующей медузы

Aequorea victoria (Shimomura et al., 1962). GFP оказался полезным инструментом для мониторинга регенерации побегов во время трансформации у ряда видов растений (Malysenko et al., 2003; Faize et al., 2010).

Образование химерных растений во время регенерации затрудняет дальнейшую работу с трансформантами; при этом доля трансгенных растений в популяции потомства может значительно уменьшаться, как при черенковании, так при размножении растений T0 семенами. Чтобы получить генетически гомогенные трансгенные растения-потомки поколения T0 при использовании вегетативного размножения, необходимо разработать подходы по удалению химер из растений-потомков, созданных данным путем. Для этого сначала необходимо выяснить факторы, способствующие формированию химерных растений рапса, что может быть достигнуто путем изучения наследования маркера *gfp* у потомков первичных регенерантов, полученных при трансформации. Кроме того, мы поставили целью разработать достаточно простой подход, который поможет устранить химеры и обогатить полученные популяции потомков трансформантов растениями, содержащими трансген.

Материалы и методы

Получение растительного материала и приготовление эксплантов. В исследовании использовались два яровых сорта рапса *Brassica napus* L. – Вестар (канадского происхождения) и Подмосковный (русского происхождения). Семядоли пятидневных семян, пророщенных *in vitro*, или сегменты листьев растений, размноженных черенками и затем выращенных *in vitro* в течение 10–12 недель, использовали в качестве эксплантов. Перед прорастанием семена стерилизовали 1 мин 70 % этанолом и 20 мин 20 % раствором промышленного гипохлорита натрия (Доместос, Россия), 5 раз промывали стерильной дистиллированной водой и затем помещали на агаризованную 1/2 среду Мурасиге–Скуга (МС), не содержащую гормонов, с добавлением 0.5 % сахарозы. Чашки Петри с семенами ставили в камеру без света и выдерживали там в течение 24 ч, затем переносили в световую камеру фитотрона с циклом 12/12 ч (день/ночь) при интенсивности освещения 250 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и дневных/ночных температурах 20–22/17–19 °С. Через 5 дней семядольные листья проростков использовали для получения эксплантов. Листовые экспланты получали, разрезая листовую пластинку с предварительно удаленной основной жилкой на 5 мм сегменты.

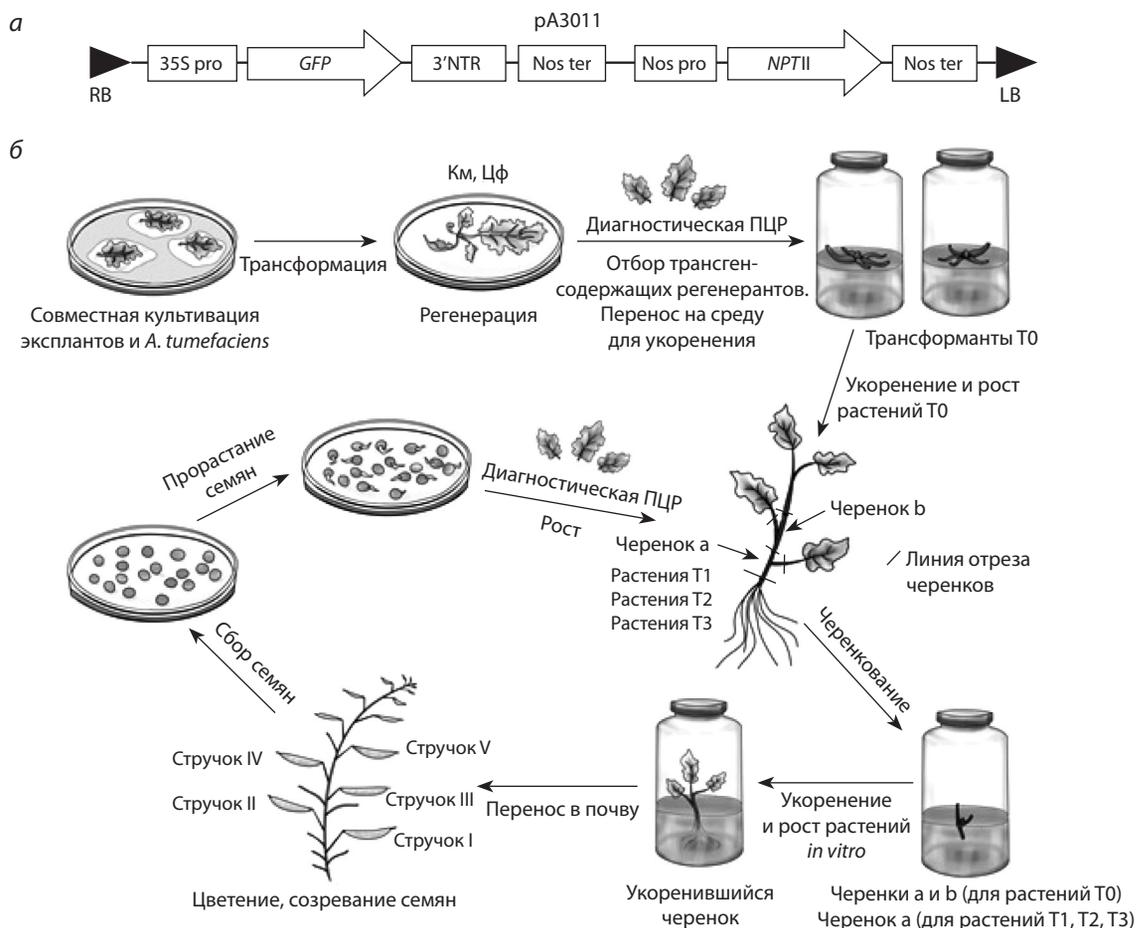


Рис. 1. Схемы использованной генетической конструкции (а) и опыта по обогащению популяций потомков трансгенных растений *gfp*-положительными растениями (б). Создан с помощью программы Paint Tool Sai 2.0.

а – карта области Т-ДНК в составе плазмиды рА3011, которая была использована для трансформации семядольных и листовых эксплантов рапса. 35S pro – промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV) 35S; *GFP* – кодирующая область гена GFP; 3'NTR – 3'-нетранслируемая последовательность гена нопалинсинтазы (NOS); Nos ter и Nos pro – соответственно терминатор и промотор гена нопалинсинтазы; *NPTII* – кодирующая область гена неомицинфосфотрансферазы; RB и LB – правая и левая границы Т-ДНК.

б – схема обогащения популяции потомков трансгенных растений *Brassica napus* L. растениями, содержащими маркер *gfp*. *gfp*-положительные растения поколения Т0 черенковали, затем черенки (а и б) высаживали в сосуды со средой для укоренения *in vitro*, после чего подросшие саженцы а и б высаживали в почву для получения семян. Для посадки в почву использовали только нижние черенки (а) растений следующего по отношению к Т0 поколения. Описанный цикл черенкования и получения семян от растений, выращенных только из нижних черенков, повторяли для поколений Т2 и Т3 и для последующих поколений при необходимости. Черенки: а – первый (нижний), б – второй (верхний). Диагностическая ПЦР – ПЦР на матрице геномной ДНК, выделенной из одного листа каждого из отдельных регенерантов с праймерами для маркера *gfp*; трансформант Т0 – трансген-положительный регенерант; растение Т0 – укоренившийся побег-трансформант Т0.

Все регенерационные среды содержали 7 г/л агара. Перед добавлением агара и последующим автоклавированием рН сред доводили до 5.8.

Агробактериальная трансформация и регенерация растений. Для трансформации растений использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0 с генетической конструкцией рА3011, содержащей *gfp* в качестве маркерного гена, и селективным маркером *nptII* (рис. 1, а). Конструкция была любезно предоставлена д-ром Петром Ивановым, кафедра вирусологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Культуры *A. tumefaciens* выращивали в жидкой среде LB, содержащей 50 мг/л рифампицина (Рф) и 50 мг/л канамицина (Км), при энергичном встряхивании при 25 °С в течение 24 ч.

Метод получения трансгенных растений путем совместного культивирования эксплантов с клетками *A. tumefa-*

ciens на поверхности агаризованной среды был описан ранее (Malyshenko et al., 2003; Danilova et al., 2009). После 2 дней совместного культивирования в темноте на среде для каллусогенеза (среда МС, содержащая 3 % сахарозы, 2 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК), 4 мг/л кинетина, 0.1 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д)) оба типа эксплантов переносили на среду для морфогенеза (среда МС, содержащая 0.7 или 1 % сахарозы, 8 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП), 1.0 мг/л НУК) с добавлением 800 мг/л цефотаксима (Цф), 3 мг/л абсцизовой кислоты (АБК) и 5 мг/л AgNO₃ и затем помещали в световую камеру (световой цикл 12/12 ч день/ночь при интенсивности освещения 250 мкмоль·м⁻²·с⁻¹, дневная/ночная температура 20–22/17–19 °С). В конце двухнедельной инкубации экспланты переносили на среду для морфогенеза без АБК, но с добавлением 500 мг/л Цф. Для

семядольных эксплантов в зависимости от требований конкретного эксперимента в среду добавляли Км (15 мг/л). Через 5–6 недель сформированные побеги отделяли от эксплантов и помещали на среду для укоренения (0.7 % сахарозы, 1/2 макро-МС, полный набор микроэлементов, 0.1 мг/л НУК). На данной стадии в среду добавляли Цф в концентрации 300 мг/л.

Трансгенные растения поколения T0 обоих сортов, у которых присутствие маркера *gfp* было подтверждено с помощью ПЦР, были расчленены, и как нижний (а), так и верхний (б) черенки были посажены *in vitro* на среду для укоренения (см. рис. 1, б). После формирования корней растения пересаживали в почву и выращивали в фитотроне (цикл 12/12 ч день/ночь при интенсивности света 250 мкмоль·м⁻²·с⁻¹ и дневной/ночной температуре 20–22/17–19 °С) для образования семян. Для анализа распределения трансгенных и нетрансгенных семян в стручках, созревших на цветоносах растений T0 после самоопыления, семена из каждого стручка каждой отдельной кисти собирали и после дезинфекции высевали на поверхность твердой среды 1/2 МС, содержащей 0.5 % сахарозы. Канамицин в среду не добавляли, поскольку трансгенные по *gfp* семена не всегда содержали *nptII* и обе группы семян (как дикого типа, так и *gfp*-трансгенные) плохо прорастали на средах с Км. Проростки подвергали скринингу на маркерные гены с использованием диагностической ПЦР. Для получения растений T1 все семена из стручков каждого отдельного растения T0 смешивали, проращивали, как описано выше, отбирая только *gfp*⁺ проростки. Семена, созревшие на растениях последующих поколений, использовали в дальнейших экспериментах. Схема вышеописанных экспериментов приведена на рис. 1, б.

Скрининг растений на наличие маркерных генов. Плазмидную ДНК выделяли из бактериальных клеток методом щелочного лизиса (Green, Sambrook, 2013). Суммарную ДНК растений для ПЦР-анализа выделяли с использованием метода, описанного в работе (Fulton et al., 1995).

Трансформанты и растения поколений T0, T1 и T2 подвергали скринингу с помощью диагностической ПЦР: на наличие маркера *gfp* – с парой праймеров eGFP_FW 5'-ССТГААГТТКАТСТГСАССАС-3' и eGFP_RV 5'АСТССАГСАГСАТГТГАТ-3'; на ген *nptII* – с парой NPT_FW 5'-ГТГГАГААГГСТАТТССГГСА-3' и NPT_RV 5'-ССАКАТГАТАТТССГСААГ-3' соответственно. Использовали следующий протокол амплификации: 94 °С – 4 мин, затем 30 циклов амплификации (94 °С – 60 с, 64 °С – 60 с, 72 °С – 60 с) и последняя стадия синтеза при 72 °С в течение 4 мин. ДНК плазмиды pA3011 служила положительным контролем, а геномная ДНК, выделенная из растений рапса дикого типа, – отрицательным. Для определения возможной контаминации T0 растений агробактериями использовали диагностическую ПЦР с парой праймеров для *virD2*: *virD2F* – 5'-ГААССААГАССТТСАГСА-3' и *virD2R* – 5'-АТССАГСАТАТГССГТГАС-3', следуя следующему протоколу амплификации: 94 °С – 4 мин, затем 35 циклов амплификации (94 °С – 60 с, 55 °С – 60 с, 72 °С – 30 с), последняя стадия – синтез при 72 °С в течение 4 мин.

Аmplифицированные фрагменты разделяли в 0.8 % неденатурирующем агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

В качестве дополнительного доказательства трансгенности растений выявляли флуоресценцию белка GFP в органах растений-кандидатов путем освещения тканей растений голубым светом (440–480 нм) с использованием микроскопов AxioPhot или AxioImager (Zeiss, Германия). Пример свечения GFP в трансгенных растениях показан на рис. 2, б.

Статистический анализ сегрегации. Пять идентичных экспериментов с выборкой из по меньшей мере 24 эксплантов для каждого эксперимента были проанализированы с помощью одностороннего ANOVA с использованием статистической программы SPSS v. 9. Для оценки разницы между трансгенным и нетрансформированным растением выполнен *t*-тест Стьюдента. Результаты считали статистически достоверными при $p \leq 0.05$.

Частоту трансформации определяли как отношение количества трансгенных *gfp*⁺ побегов к общему количеству образовавшихся побегов. Экспериментальные данные были обработаны в программе Microsoft Excel. Критерий χ^2 рассчитывали по методу Смиряева и Кильчевского (2007).

Результаты

Поиск оптимальных условий для регенерации побегов на эксплантах рапса

Если содержание сахарозы в среде не оптимизировано, побеги, образующиеся в процессе регенерации, могут витрифицироваться (гипергидратироваться) (Qin et al., 2006). Следует отметить, что в наших экспериментах по трансформации рапса регенерированные растения формировались на эксплантах двух типов, морфологически отличных друг от друга. На семядольных эксплантах образовывались преимущественно хорошо дифференцированные невитрифицированные побеги, тогда как на листовых эксплантах большинство появившихся побегов и зачатков были гипергидратированными, а среди невитрифицированных побегов не было трансгенных. Чтобы минимизировать витрификацию, мы проверили корреляцию содержания сахарозы в среде со степенью гипергидратации регенерантов с использованием листовых эксплантов сорта Вестар. Уменьшив концентрацию сахарозы в среде до 0.7 %, нам удалось значительно снизить степень витрификации регенерированных побегов (табл. 1). Такая среда для морфогенеза была использована во всех последующих экспериментах.

Наследование маркерных генов, интегрированных в геном рапса

В более ранних исследованиях по трансформации эксплантов семядолей рапса различными генетическими конструкциями (Gomaa et al., 2012; Raldugina et al., 2018) мы показали, что в потомстве самоопыляющихся трансгенных растений сегрегация трансгенов и генов-маркеров часто не подчиняется законам наследования Менделя. Среди потомков самоопыляющихся растений преобладали дикие, а не трансгенные растения. В некоторых случаях

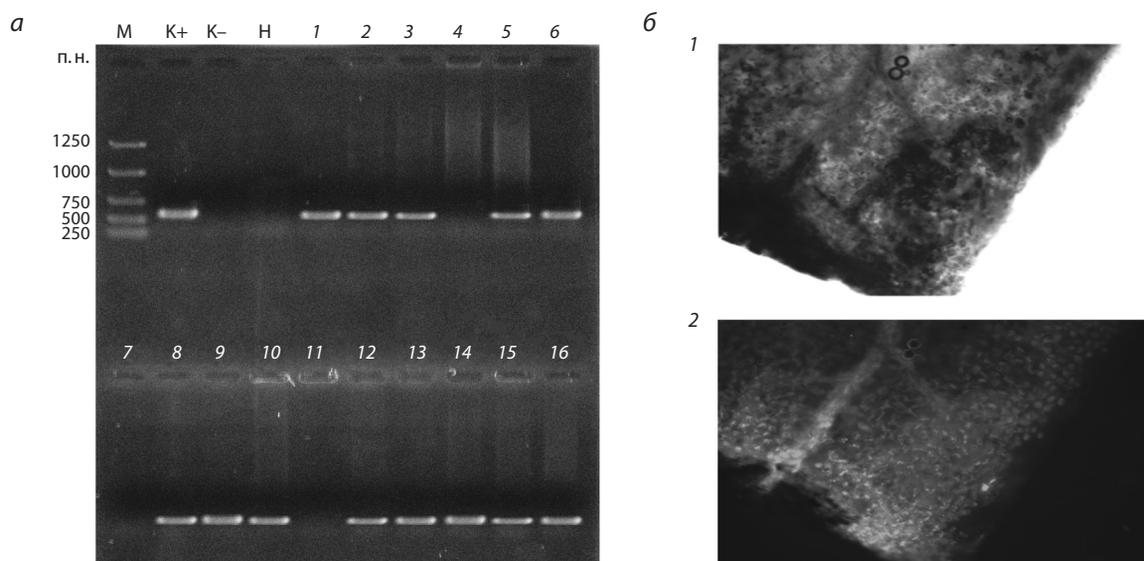


Рис. 2. Скрининг растений-кандидатов, полученных путем агробактериальной трансформации, на присутствие маркера *gfp*.
а – диагностическая ПЦР для определения присутствия маркера *gfp* в геномах растений-кандидатов. Тотальную ДНК выделяли из растительного материала и проводили ПЦР в объеме 20 мкл (см. Материалы и методы). Затем 10 мкл алиquotы образцов наносили на 1 % неденатурирующий агарозный гель, содержащий бромид этидия. М – маркер молекулярной массы; К+ – ПЦР с ДНК плазмиды рА3011 (положительный контроль); К– – ПЦР с тотальной ДНК рапса дикого типа (отрицательный контроль); Н – ПЦР с использованием воды вместо ДНК-матрицы (контроль на контаминацию); 1–16 – ПЦР с тотальной ДНК, полученной из растений-кандидатов.
б – флуоресценция белка GFP в клетках мезофилла листа трансформированного растения рапса. Лист трансгенного растения: 1 – в проходящем свете; 2 – в ультрафиолетовом свете, клетки мезофилла видны как светящиеся точки.

Таблица 1. Зависимость степени витрификации регенерированных побегов рапса сорта Вестар от концентрации сахарозы в среде

Концентрация сахарозы, %	Частота образования дифференцированных побегов, %	Доля среди дифференцированных побегов, %	
		витрифицированные	трансгенные (частота трансформации)
1.0	7.6 ± 0.3	3.7 ± 0.7	0
0.7	8.7 ± 0.3	1.4 ± 0.4	66.67 ± 19.7

Примечание. Данные представлены как М ± SD, где М – средняя величина, SD – стандартное отклонение.

целевой ген вообще не наследовался. Мы предположили, что эти линии растений на самом деле были химерными. Вероятно, отчасти это происходило по причине того, что нижняя часть химерного побега Т0 была под более сильным селективным давлением, чем апикальная часть, которая располагалась дальше от среды, а также росла позже, когда антибиотик уже мог частично разложиться. Таким образом, нетрансформированные клетки выживали и участвовали в образовании растений поколения Т0.

В дальнейшем мы проанализировали наследование маркерного гена в нескольких последующих за Т0 поколениях. Для этой цели были выбран ген *gfp* в качестве маркера, так как наблюдение за люминесценцией белка GFP должно было бы позволить нам следить за образованием побегов-регенерантов на ранних стадиях. Однако надежных данных с явным доказательством присутствия химеры в сформированных первичных структурах не

было получено (Hoang, Raldugina, 2012), поскольку нам не удавалось отличить трансгенные клетки от нетрансформированных. Свечение наблюдалось в разных частях растений, независимо от генотипа и/или типа эксплантата (см. рис. 2, б). Поэтому мы не применяли данный подход в настоящей работе для изучения химерной природы трансгенных растений и факторов, которые могут быть вовлечены в формирование химер. Дальнейшее изучение трансформированных растений проводили с использованием только диагностической ПЦР (см. Материалы и методы). Результаты скрининга растений-кандидатов на наличие маркера *gfp* показаны на рис. 2, а. Полученные методом ПЦР данные подтверждали путем выявления флуоресценции белка GFP в органах растений-кандидатов (см. рис. 2, б).

Кроме того, исходные регенеранты-трансформанты Т0 тестировали с помощью ПЦР на контаминацию агробактериями, как описано в разделе «Материалы и методы». При этом ни одно растение не оказалось контаминированным (результаты не представлены).

Наследование маркера *gfp* в Т0 регенерантах

Несколько линий GFP-экспрессирующих растений поколения Т0, полученных на эксплантах обоих сортов, были посажены в почву. Все растения были фертильными и после самоопыления образовали жизнеспособные семена. Собранные семена проращивали в асептических условиях и затем подвергали скринингу на наличие гена-маркера *gfp*.

Чтобы выяснить, какие типы клеток – трансформированные или нетрансгенные, были вовлечены в формирование генеративных органов растений поколения Т0,

Таблица 2. Распределение трансгенных и нетрансгенных семян в стручках, образовавшихся на цветоносах трансформированных растений рапса поколения Т0

Трансгенная линия	Число трансгенных и нетрансгенных семян (gfp^+/gfp^-) и доля трансгенных семян, %				
	Номер стручка				
	1	2	3	4	5
ПС-1	2/8 20	7/1 87.5	7/3 70	3/6 33	НФ –
ПС-2	0/7 0	0/10 0	2/5 28.5	0/8 0	3/3 50
ВС-3	8/2 80	6/1 85.7	4/3 57.1	НФ –	НФ –
ПЛ-4	0/9 0	0/8 0	0/8 0	0/10 0	НФ –
ПЛ-5	0/10 0	0/10 0	0/5 0	0/10 0	НФ –
ВЛ-6	0/10 0	0/8 0	0/8 0	НФ –	НФ –

Примечание. Среда для проращивания семян содержала 0,5х МС и 0,5 % сахарозы. П – сорт Подмосковный; В – сорт Вестар; С – семядольные экспланты; Л – листовые экспланты. Прочерк – семена не всхожие, НФ – семена не сформировались.

мы проверили наследование маркера *gfp* в стручках, сформированных на центральном цветоносе растений каждой из шести отобранных линий. На наличие *gfp* были проанализированы только четыре-пять нижних стручков, собранных с центральных частей цветоноса, поскольку в условиях фитотрона жизнеспособные семена формировались исключительно в этих стручках, а не в расположенных выше. Выяснилось, что *gfp* наследуется случайным образом по всему цветоносу, его присутствие в геноме проростков не зависит от местоположения стручка. Маркер *gfp* был обнаружен лишь в потомстве растений, полученных на эксплантах семядолей (табл. 2). Все семена, собранные на растениях, происходящих из листовых эксплантов, оказались нетрансгенными. Таким образом, в образовании гамет растений поколения Т0, образовавшихся на эксплантах семядолей, участвовали оба типа клеток.

Наследование маркера *gfp* у растений, размножаемых черенками

Способность растений рапса размножаться вегетативно с помощью стеблевых черенков широко используется для клонирования индивидуальных растений. Мы изучали, зависит ли наследование маркера *gfp* от числа черенкований (см. рис. 1, б). Семена растений Т0 дезинфицировали и затем проращивали *in vitro*. Проростки, экспрессирующие GFP, высаживали на корнеобразующую среду. После образования двух междоузлий побеги черенковали, снова укореняли, а растения, образованные из пазушной почки нижнего междоузлия, высаживали в почву (см. рис. 1, б, черенки а). Растения, сформированные из апикальных почек, снова черенковали; после укоренения верхних че-

ренков (б) их также высаживали в почву. Семена, собранные с этих растений, снова высевали, а проростки проверяли на наличие маркера *gfp*.

Статистический анализ данных сегрегации *gfp* с использованием критерия χ^2 показал, что для черенков а, полученных из трех независимых линий сорта Вестар (В-2, В-3, В-4), наследование *gfp* соответствовало закону Менделя для наследования моногенного признака (табл. 3). Однако для верхних черенков б случайная сегрегация маркера *gfp* наблюдалась на растениях следующего поколения. Только в В-5, где растение, сформированное из нижнего черенка, к сожалению, погибло, сегрегация по Менделю наблюдалась в потомстве растения, выращенного из верхнего черенка.

Для растений сорта Подмосковный сегрегация маркерного гена была совершенно случайной, и его наследования по Менделю никогда не наблюдалось. Однако на каждом растении этого сорта всегда созревало некоторое количество семян, содержащих *gfp*.

Таким образом, растения-потомки, полученные путем самоопыления исходных трансформантов Т0, неожиданно для нас тоже оказались, скорее всего, химерными.

Наследование маркера *gfp* у растений поколений Т1 и Т2

Интеграция трансгенных конструкций в один менделевский локус, независимо от количества копий, часто (но не всегда) наблюдается у трансформантов, продуцируемых *Agrobacterium*-опосредованной трансформацией. Исходя из предположения, что трансформанты Т0 и клоны Т0, полученные из нижних и верхних черенков, содержат вставку маркера *gfp* только в одном локусе, в поколении Т1 следует ожидать три класса растений в соответствии с их генотипом.

Чтобы обогатить трансгенные популяции рапса индивидуумами, содержащими маркер *gfp*, для получения потомства Т1 можно взять только растения, гомозиготные по маркеру *gfp*. Такие генотипы могут быть идентифицированы путем физического картирования локуса интеграции вставки маркера с последующим отбором гомозигот методом ПЦР-анализа. Альтернативно гомозиготность маркера *gfp* может быть определена с помощью анализа его сегрегации. Сегрегация маркера *gfp* в соотношении 4:0 в следующем поколении будет указывать, что родительские растения были gfp^+/gfp^+ гомозиготами. Однако оба эти подхода трудоемки и требуют много времени, поэтому мы предложили упрощенный метод отбора для обогащения популяций потомков Т0 *gfp*-позитивными растениями независимо от генотипа. Хотя трансгенные гетерозиготы при расщеплении в последующих поколениях и будут давать нетрансгенных потомков, но в смысле экспрессии трансгена в популяции данного поколения на практике часто не так важно, являются ли трансгенные растения гетеро- или гомозиготными, главное, чтобы в них имела место вышеупомянутая экспрессия.

Для обогащения трансгенных популяций рапса растениями, содержащими маркер *gfp*, как гами-, так и гомозиготными, мы выбраковывали *gfp*-негативные семена в потомстве Т1 и Т2. Три линии трансформированных растений сорта Вестар и одну линию сорта Подмосковный

Таблица 3. Сегрегация маркера *gfp* у трансгенных растений рапса поколения Т1, полученных из семядольных эксплантов

Трансгенная линия	Черенок	Количество растений потомства Т0			Н _f	Н ₀	χ^2_{theor}
		общее	трансгенных (<i>gfp</i> ⁺) и их доля, %	нетрансгенных (<i>gfp</i> ⁻)			
В-1	a	20	4 (20)	16	0.8 : 3.2	3 : 1	>3.84
	b	21	0	21	0 : 4	3 : 1	НП
В-2	a	24	18 (75)	6	3 : 1	3 : 1	0
	b	42	6 (14.3)	36	0.6 : 3.4	3 : 1	>3.84
В-3	a	18	15 (83.3)	3	3.3 : 0.7 15 : 3	3 : 1 15 : 1	0.67 >3.84
	b	33	16 (48.5)	17	1.9 : 2.1	3 : 1	>3.84
В-4	a	20	16 (80)	4	3.2 : 0.8 15 : 3.75	3 : 1 15 : 1	0.27 >3.84
	b	37	14 (37.8)	23	1.5 : 2.5	3 : 1	>3.84
В-5	a	Растение погибло					
	b	31	24 (77.4)	7	3.1 : 0.9	3 : 1	0.10
В-6	a	Растение погибло					
	b	18	0	18	0 : 4	3 : 1	НП
П-7	a	47	7 (14.9)	40	0.6 : 3.4	3 : 1	>3.84
	b	Растение погибло					
П-8	a	37	19 (51.3)	18	18	2 : 2	3 : 1
	b	40	17 (42.5)	23	23	1.7 : 2.3	3 : 1
П-9	a	39	5 (12.8)	34	34	0.5 : 3.5	3 : 1
	b	30	11 (36.7)	21	21	1.5 : 2.5	3 : 1

Примечание. Стандартное значение $\chi^2_{\text{theor}} = 3.84$ ($p \leq 0.05$). Н₀ и Н_f – теоретическая и фактическая сегрегация соответственно; В – Вестар; П – Подмосковский; а и b – нижний и верхний черенки соответственно; НП – неприменимо.

Таблица 4. Доли (%) *gfp*⁺ растений в трех последовательных поколениях трансформированных растений

Трансгенная линия	Т1	Т2	Т3
В-3b <i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> ⁻	16/17	16/5	17/1
Трансгенные семена, %	48.5	76.2	94.4
В-4b <i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> ⁻	14/23	17/4	16/2
Трансгенные семена, %	37.8	80.9	88.9
В-5b <i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> ⁻	24/7	10/11	12/6
Трансгенные семена, %	77.4	47.6	66.7
П-8b <i>gfp</i> ⁺ / <i>gfp</i> ⁻	17/23	16/5	14/2
Трансгенные семена, %	45.5	76.2	87.5

Примечание. Проанализированы растения, происходящие из верхних черенков (b), поскольку некоторые растения, происходящие из нижних черенков, не выжили после пересадки в почву. В – Вестар, П – Подмосковский.

выращивали из верхних черенков (нижние черенки не использовали, так как некоторые из них погибли) (табл. 4).

Семена, полученные методом самоопыления, затем проращивали и проверяли на наличие маркера *gfp*. Проростки с *gfp* брали для черенкования, когда образовывалось одно междоузлие. В этом случае верхние черенки (b) трансгенных растений Т2 и Т3 высаживали в землю.

Результаты ПЦР-анализа показали, что процентное содержание *gfp*-негативных семян в общем количестве семян, продуцируемых растениями поколений Т2 и Т3, уменьшилось, хотя абсолютное количество трансгенных семян для каждого тестируемого растения осталось примерно на одном уровне.

Обсуждение

Влияние сахарозы на степень витрификации побегов-регенерантов

Образование витрифицированных побегов у многих видов растений зависит от содержания сахарозы в питательной среде (Sharma, Thorpe, 1989; Qin et al., 2006). В этом исследовании мы показали, что уменьшение концентрации сахарозы в среде для регенерации до 0.7 % приводило к снижению степени витрификации побегов рапса (см. табл. 1). Это соответствует результатам, описанным в работе (Yu et al., 2011) для регенерации гипокотильных сегментов проростков брокколи.

Наследование маркера *gfp* у растений рапса поколения Т0

Анализ распределения трансгенных и нетрансгенных семян на цветоносах каждого растения Т0 семядольного происхождения показал, что во время роста кистей и формирования стручков распределение маркера *gfp* было

совершенно случайным, не зависело от местоположения стручка (см. табл. 2). Случайный характер наследования позволяет предполагать, что эти растения, вероятно, были химерными. Возможно, такое распределение обусловлено образованием гамет из трансгенных и нетрансформированных клеток. Многие исследователи, изучавшие наследование трансгенов у разных видов растений, предполагают, что искажение сегрегации может отражать стерильность одного типа гамет. Aragão с коллегами (1996) объяснили сегрегацию в соотношении 1 : 1, наблюдаемую у потомства трансгенных растений сои, нежизнеспособностью трансгенной пыльцы. Другие исследователи предположили, что отсутствие ожидаемой сегрегации в потомстве, происходящем от скрещивания трансгенных и нетрансформированных растений кукурузы, может быть связано с нежизнеспособностью пыльцы в трансгенных растениях, вызванной неудачной интеграцией трансгена (Walters et al., 1992). Неканоническая сегрегация также может быть объяснена химерной природой трансгенных растений, в которых часть гамет образована из нетрансформированных клеток. Ниеі с соавторами (1994) отмечают необычную сегрегацию гена-маркера *gus* в потомстве трансформантов риса, поскольку популяция растений T0 состояла исключительно из химерных растений.

Меристематические образования на эксплантах, образующиеся во время морфогенеза, состоят из корпуса и оболочки, причем последняя содержит несколько слоев, обозначаемых, начиная с внешнего слоя, как L1, L2, L3 и т. д. (Tooke, Battey, 2003). Каждый слой меристемы отвечает за развитие определенных растительных тканей и органов. Например, слой L2 обеспечивает формирование пыльцы и семян (растительные цветочные органы) (Irish, 1991). По-видимому, трансформированные клетки присутствуют преимущественно во внешнем слое L1 (Tooke, Battey, 2003). Мы предположили, что регенеранты, образованные на семядольных эксплантах, происходили в основном из слоя L2 с участием слоев L1 и L3. На листовых эксплантах формирование побегов, вероятно, шло исключительно из клеток слоя L3, где трансформированные клетки не обнаруживаются.

Чтобы подтвердить это предположение, мы проанализировали сегрегацию маркера *gfp* в потомстве исходных трансформантов. Почти для всех растений были выявлены существенные отклонения от менделевского соотношения сегрегации 3 : 1 (один локус интеграции *gfp*) (см. табл. 3, черенки а). Статистическая оценка данных о сегрегации гена *gfp* в популяции T0 растений рапса, размноженных черенкованием, была выполнена с использованием критерия χ^2 , учитывая, что во время агробактериальной трансформации маркер *gfp* интегрировался в геном рапса только в одном локусе. Следует отметить, что некоторые линии, например В-3а и В-4а, на которых вызревало не менее 80 % *gfp*-содержащих семян, могли иметь два или даже больше локусов интеграции маркерного гена в одной или в разных хромосомах (см. табл. 3, полужирные цифры). Это предположение, однако, не меняет сделанного ранее заключения, касающегося химерной природы растений T0, поскольку ни одно из растений не продуцировало *gfp*⁺ семена с долей около 95 %, что соответствовало бы сегрегации с соотношением 15 : 1 для дигенного признака.

Следовательно, линии В-3а и В-4а, наверное, тоже были химерными. И по-видимому, большинство оригинальных трансформантов были химерными. Таким образом, ткани их половых органов могли происходить одновременно из трансформированных и нетрансформированных клеток, образуя химерную меристему, где нетрансгенные клетки, вероятно, делились быстрее, чем трансгенные. Мы предположили, что при низком селективном давлении при росте побегов в какой-то момент в побегах начали преобладать нетрансформированные клетки.

Впоследствии мы проверили эту гипотезу, срезая побеги, выросшие непосредственно на экспланте (растения T0, см. рис. 1, б), и выращивая полученные из них растения для образования семян. Обнаружено, что тип сегрегации маркера зависит от конкретного побега-регенеранта, взятого для выращивания взрослого растения, которое позже образовывало семена.

Сегрегация маркера *gfp*⁺ у потомства растений, полученных черенкованием

Статистическая оценка данных сегрегации маркера *gfp* показала (см. табл. 3), что у некоторых растений, полученных из нижних черенков (черенки а, см. рис. 1, б, линии В-2, В-3 и В-4), наблюдалась сегрегация в соотношении 3 : 1. В то же время у растений, происходивших из верхней части побега этого же растения (черенки б), маркер распределялся случайным образом. Таким образом, у большинства растений T1 наследование *gfp* зависело от расположения черенка, подтверждая, что они были химерными. Следовательно, отбор оригинальных побегов, срезанных непосредственно с экспланта, несмотря на положительный результат их тестирования на маркер *gfp* без предварительных раундов дополнительного вегетативного размножения черенками, может привести к отбору химерных трансформантов, а в следующих поколениях – к повышению доли нетрансгенных растений в популяции.

Описанный выше подход позволил нам идентифицировать предполагаемые химеры, которые должны быть каким-то образом исключены из популяции трансгенных растений. Некоторые исследователи, например Chen (2011), чтобы избавиться от химер среди трансформантов *Lesquerella fendleri*, рекомендуют проводить несколько раундов последовательных регенераций на эксплантах полученных трансформантов, каждый раз выбирая побеги, экспрессирующие маркерный ген *gus*. Используя этот подход, автору удалось снизить долю химерных побегов с 80–90 до 2.2 % без увеличения концентрации селективного антибиотика, который сильно ингибировал морфогенез при добавлении в высоких концентрациях в среду регенерации.

Аналогичный подход, включающий последовательные субкультивирования листовых эксплантов, вырезанных из химерных трансгенных растений, рекомендован для производства трансгенных растений табака без маркера (Li et al., 2009). С помощью этой процедуры исследователям удалось снизить долю химерных растений в трансгенной популяции с 60–80 до 4–8 %.

Перечисленные подходы применяются, когда растения-трансформанты необходимо размножить вегетативно,

например черенкованием. В случае размножения семенами, например самоопылением, следующие поколения растений, казалось бы, должны быть «очищены» от химерности. Однако, к нашему удивлению, T1 растения, полученные путем самоопыления исходных трансформантов, тоже оказались химерными. Наиболее очевидное объяснение данного феномена – нестабильность маркера *gfp* в геноме трансформантов. Но «генетическое восстановление» – механизм менделевского наследования внегеномной информации, впервые обнаруженный у *Arabidopsis thaliana*, также может иметь место в нашем случае (Lolle et al., 2005). Было показано, что несколько независимых мутантных штаммов арабидопсиса продуцировали явно нормальное потомство с высокой частотой (до нескольких процентов), что выше, чем можно было бы ожидать, если бы речь шла о случайных обратных мутациях. Lolle с коллегами (Lolle et al., 2005) предположили, что это происходит из-за точной реверсии исходной ДНК по механизму, включающему управляемое этой матрицей восстановление исходной предковой ДНК, которая ранее была передана «на хранение» в так называемый кэш РНК. Феномен, называемый гипотезой «кэш РНК», означает, что организмы могут иногда восстанавливать свою ДНК до предковой на основе матрицы «кэш РНК», унаследованных от прошлых поколений (Lolle et al., 2005). Гипотеза кэширования РНК оспаривалась рядом авторов (Comai, Cartwright, 2005; Mercier et al., 2008; Miyagawa et al., 2013). Однако недавно было показано наличие РНК-кэша участков генома и даже полноразмерных хромосом у некоторых организмов (Byeon, Kovalchuk, 2016; Lindblad et al., 2017). Возможно, в нашем случае данный механизм работает только для части клеток, что и приводит к появлению химер.

Наследование маркера *gfp* у трансформантов рапса поколений T1 и T2

Определение количества трансгенных и нетрансгенных проростков из семян, образовавшихся на растениях поколений T1 и T2, полученных из верхних черенков (b) первичных трансформантов, показало, что с каждым последующим поколением доля *gfp*⁻ семян уменьшалась (см. табл. 4, рис. 1, б). При этом общее количество семян тоже уменьшалась, но в меньшей степени. Поскольку клетки дикого типа участвуют в формировании пула гамет в химерных растениях T1, в потомстве T0 наблюдается более высокая доля растений дикого типа по сравнению с потомством T1. Сегрегация 3:1 отмечалась для большинства линий растений T1, скорее всего, потому, что в этих линиях произошла интеграция маркера *gfp* только в одном локусе генома. Что касается увеличения доли *gfp*⁺ растений в потомстве T2 по сравнению с их родителями T1, то объяснение этому, вероятно, следует искать в несоблюдении условий, необходимых для реализации закона Менделя для сегрегации моногенного признака. Для большинства организмов, размножающихся половым путем, случаи, когда законы Менделя могут строго объяснять все типы наследования, относительно редки. Часто модели наследования являются более сложными (Schacherer, 2016). Также возможно, что несоблюдение закона сегрегации моногенных признаков в нашем случае

связано с выращиванием растений в условиях фитотрона, а не в естественной среде (влияние эпигенетических факторов и РНК-кэширования?). Однако изучение этих феноменов выходит за рамки настоящего исследования.

Заключение

В данном исследовании мы показали, что большинство регенерировавших в наших опытах трансгенных растений рапса являются химерами. К сожалению, нам не удалось выяснить, какие факторы определяют образование химерных трансгенных растений. Однако удалось продемонстрировать, что некоторые факторы могут быть связаны с появлением химерных растений во время трансформации. Это генотип растения, тип экспланта, используемого для трансформации, а также питательные среды для трансформации и регенерации. Мы также обнаружили, что химерность по каким-то причинам может передаваться в последующие поколения.

Согласно сообщениям других групп исследователей, в процессе создания трансгенных растений в некоторых случаях возникают и химерные растения. Как правило, их отбраковывают, оставляя только те регенеранты, в которых наблюдается менделевская сегрегация, и обычно только одного конкретного трансгена. Кроме того, наследование этих трансгенов в растениях, размножающихся с помощью черенкования, обычно не изучается. Весь регенерированный побег трансформированного растения высаживают в почву, затем выделяют суммарную ДНК из листового материала и проверяют ПЦР-анализом на трансгенность. Мы же, напротив, сначала размножали растения путем черенкования, затем сажали полученные черенки в почву и только потом изучали сегрегацию маркера *gfp*; и этот раунд отбора должен был повторяться по меньшей мере два-три раза. Используемый нами упрощенный подход позволил значительно увеличить долю растений, содержащих маркер *gfp*, в популяциях потомков трансформированных растений рапса.

Список литературы / References

- Смирязев А.В., Кильчевский А.В. Генетика популяций и количественных признаков. М.: КолосС, 2007.
- [Smiryayev A.V., Kilchevsky A.V. Genetics of Populations and Quantitative Traits. Moscow: KolosS Publ., 2007. (in Russian)]
- Aragão F.J.L., Barros L.M.G., Brasileiro A.C.M., Ribeiro S.G., Smith F.D., Sanford J.C., Faria J.C., Rech E.L. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 1996;93:142-150. DOI 10.1007/BF00225739.
- Byeon B., Kovalchuk I. Non-coding RNAs match the deleted genomic regions in humans. *Sci. Rep.* 2016;6:37452. DOI 10.1038/srep37452.
- Chen G.Q. Effective reduction of chimeric tissue in transgenics for the stable genetic transformation of *Lesquerella fendleri*. *HortScience.* 2011;46:86-90. DOI 10.21273/HORTSCI.46.1.86.
- Comai L., Cartwright R.A. A toxic mutator and selection alternative to the non-Mendelian RNA cache hypothesis for *hothead* reversion. *Plant Cell.* 2005;17:2856-2858. DOI 10.1105/tpc.105.036293.
- Costa M.G.C., Otoni W.C., Moore G.A. An evaluation of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Citrus paradisi* (Macf.) and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic genes. *Plant Cell Rep.* 2002;21:365-373. DOI 10.1007/s00299-002-0533-1.
- Danilova S.A., Kusnetsov V.V., Dolgikh Yu.I. A novel efficient method for maize genetic transformation: usage of agrobacterial monolayer.

- Russ. J. Plant Physiol. 2009;56:258-263. DOI 10.1134/S1021443709020150.
- Domínguez A., Cervera M., Pérez R.M., Romero J., Fagoaga C., Cubero J., López M.M., Juárez J.A., Navarro L., Peña L. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Mol. Breed.* 2004;14:171-183. DOI 10.1023/B:MOLB.0000038005.73265.61.
- Faize M., Faize L., Burgos L. Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnol.* 2010;10:53. DOI 10.1186/1472-6750-10-53.
- Flachowsky H., Riedel M., Reim S., Hanke V. Evaluation of the uniformity and stability of T-DNA integration and gene expression in transgenic apple plants. *Electron. J. Biotechnol.* 2008;11(1):26-40. DOI 10.4067/S0717-34582008000100003.
- Fulton T.M., Chunwongse J., Tanksley S.D. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1995;13:207-209. DOI 10.1007/BF02670897.
- Gomaa A.M., Raldugina G.N., Burmistrova N.A., Radionov N.V., Kuznetsov V.I.V. Response of transgenic rape plants bearing the *OsMyb4* gene from rice encoding a trans-factor to low above-zero temperature. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(1):105-114. DOI 10.1134/S1021443711060070.
- Green M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th edn. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2013.
- Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 1994;6:271-282. DOI 10.1046/j.1365-3113X.1994.6020271.x.
- Hoang T.G., Raldugina G.N. Regeneration of transgenic plants expressing the *gfp* gene from rape cotyledonary and leaf explants: effects of the genotype and ABA. *Russ. J. Plant Physiol.* 2012;59(3):406-412. DOI 10.1134/S1021443712030089.
- Irish V.F. Cell lineage in plant development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1991;1:169-173. DOI 10.1016/s0959-437x(05)80065-6.
- Li B., Xie C., Qiu H. Production of selectable marker-free transgenic tobacco plants using a non-selection approach: chimerism or escape, transgene inheritance, and efficiency. *Plant Cell Rep.* 2009;28:373-386. DOI 10.1007/s00299-008-0640-8.
- Lindblad K.A., Bracht J.R., Williams A.E., Landweber L.F. Thousands of RNA-cached copies of whole chromosomes are present in the ciliate *Oxytricha* during development. *RNA.* 2017;23(8):1200-1208. DOI 10.1261/ma.058511.116.
- Lolle S.J., Victor J.L., Young J.M., Pruitt R.E. Genome wide non-Mendelian inheritance of extra-genomic information in *Arabidopsis*. *Nature.* 2005;434:505-509. DOI 10.1038/nature03380.
- Malyschenko S.I., Tyul'kina L.G., Zvereva S.D., Raldugina G.N. Transgenic *Brassica campestris* plants expressing the *gfp* gene. *Russ. J. Plant Physiol.* 2003;50(2):276-281. DOI 10.1023/A:1022997803459.
- Mercier R., Jolivet S., Vignard J., Durand S., Drouaud J., Pelletier G., Nogué F. Outcrossing as an explanation of the apparent unconventional genetic behavior of *Arabidopsis thaliana* *hth* mutants. *Genetics.* 2008;180:2295-2297. DOI 10.1534/genetics.108.095208.
- Miyagawa Y., Ogawa J., Iwata Y., Koizumi N., Mishiba K.-I. An attempt to detect siRNA-mediated genomic DNA modification by artificially induced mismatch siRNA in *Arabidopsis*. *PLoS One.* 2013; 8(11):e81326. DOI 10.1371/journal.pone.0081326.
- Popelka J.C., Stephanie G., Moore A., Molvig L., Higgins T.J.V. Genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and stable transmission of the transgenes to progeny. *Plant Cell Rep.* 2006;25: 304-312. DOI 10.1007/s00299-005-0053-x.
- Qin Y., Gao L.H., Pulli S., Guo Y.D. Shoot differentiation, regeneration of cauliflower and analysis of somaclonal variation by RAPD. *Hereditas.* 2006;143:91-98. DOI 10.1111/j.2006.0018-0661.01944.x.
- Rakosy-Tican E., Aurori C.M., Dijkstra C., Thieme R., Aurori A., Davey M.R. The usefulness of the *gfp* reporter gene for monitoring *Agrobacterium*-mediated transformation of potato dihaploid and tetraploid genotypes. *Plant Cell Rep.* 2007;26:661-671. DOI 10.1007/s00299-006-0273-8.
- Raldugina G.N., Maree M., Mattana M., Shumkova G., Mapelli S., Kholodova V.P., Karpichev I.V., Kuznetsov V.I.V. Expression of rice *OsMyb4* transcription factor improves tolerance to copper or zinc in canola plants. *Biol. Plant.* 2018;62:511-520. DOI 10.1007/s10535-018-0800-9.
- Sarmah B.K., Moore A., Tate W., Molvig L., Morton R.L., Rees D.P., Higgins T.J.V. Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean α -amylase inhibitor. *Mol. Breed.* 2004;14(1):73-82. DOI 10.1023/b:molb.0000037996.01494.12.
- Schacherer J. Beyond the simplicity of Mendelian inheritance. *C. R. Biologies.* 2016;339(7-8):284-288. DOI 10.1016/j.crv.2016.04.006.
- Schmülling T., Schell J. Transgenic tobacco plants regenerated from leaf disks can be periclinal chimeras. *Plant Mol. Biol.* 1993;21:705-708. DOI 10.1007/BF00014554.
- Sharma K.K., Thorpe T.A. *In vitro* regeneration of shoot buds and plantlets from seedling root segments of *Brassica napus* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1989;18:129-141. DOI 10.1007/BF00033471.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962;59:223-239. DOI 10.1002/jcp.1030590302.
- Tizaoui K., Kchouk M.E. Genetic approaches for studying transgene inheritance and genetic recombination in three successive generations of transformed tobacco. *Genet. Mol. Biol.* 2012;35:640-649. DOI 10.1590/S1415-47572012000400015.
- Tooke F., Battey N. Models of shoot apical meristem function. *New Phytol.* 2003;159:37-52. DOI 10.1046/j.1469-8137.2003.00803.x.
- Walters D.A., Vetsch C.S., Potts D.E., Lundquist R.C. Transformation and inheritance of a hygromycin phosphotransferase gene in maize plants. *Plant Mol. Biol.* 1992;18:189-200. DOI 10.1007/BF00034948.
- Yu U., Zhao Y.-Q., Zhao B., Ren S., Guo Y.-D. Influencing factors and structural characterization of hyperhydricity of *in vitro* regeneration in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Can. J. Plant Sci.* 2011;91:159-165. DOI 10.1139/CJPS10034.
- Zhu X.Y., Zhao M., Ma S., Ge Y.M., Zhang M.F., Chen L.P. Induction and origin of adventitious shoots from chimeras of *Brassica juncea* and *Brassica oleracea*. *Plant Cell Rep.* 2007;26:1727-1732. DOI 10.1007/s00299-007-0398-4.
- Zvereva S.D., Romanov G.A. Reporter genes for plant genetic engineering: characteristics and detection. *Russ. J. Plant Physiol.* 2000; 47:424-432. Record Number: 20001614176.

ORCID ID

G.N. Raldugina orcid.org/0000-0002-3349-8461
T.G. Hoang orcid.org/0000-0001-6891-0121

Благодарности. Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, государственный номер регистрации госзадания АААА-А19-119081990032-1. Авторы выражают благодарность д-ру Петра Иванову за предоставленную плазмиду pA3011, д-ру Юлии Долгих за полезные обсуждения во время подготовки рукописи, Екатерине Платоновой и Ольге Шамовой за помощь в подготовке рисунков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.09.2020. После доработки 23.01.2021. Принята к публикации 27.01.2021.