

ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ Т-ДНК-ВСТРОЙКИ У ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ ТАБАКА ЛИНИИ NU 21

Д.Б. Логинова, В.К. Шумный, Е.В. Дейнеко

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: loginova@bionet.nsc.ru, shumny@bionet.nsc.ru, deineko@bionet.nsc.ru

Проведен анализ особенностей организации Т-ДНК-встройки у трансгенных растений табака с мозаичным проявлением экспрессии маркерного гена *nptII*. Установлено, что встройка экзогенной ДНК в геноме растений линии Nu 21 имеет сложную структуру и организована в виде двух предположительно полноразмерных копий (Т-ДНК1 и Т-ДНК2), ориентированных «голова к хвосту», и одной усеченной копии между ними, расположенной в обратной ориентации к полноразмерным копиям. Между усеченной копией Т-ДНК1 и Т-ДНК2 выявлен дополнительный фрагмент ДНК, организованный в виде двух повторов размером 33 пн каждый, расположенных в прямой ориентации относительно друг друга.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, инактивация экспрессии генов, прямые и инвертированные повторы.

Введение

В ядерном геноме трансгенных растений фрагменты экзогенных ДНК могут быть представлены в виде как одно-, так и многокопийных встроек, организованных в виде кластеров трансгенов (Kim *et al.*, 2003; Sallaud *et al.*, 2003; Scarn *et al.*, 2006). Наличие множественных копий в составе инсерции оказывает влияние на уровень и стабильность экспрессии чужеродных генов. Как правило, трансгенные растения с одной копией Т-ДНК на геном характеризуются стабильным уровнем экспрессии (Hobbs *et al.*, 1993), тогда как у трансгенных растений с множественными тандемно организованными копиями наблюдается нестабильная экспрессия гетерологичных генов (Muskens *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2002).

Трансгенные растения со сложными тандемно организованными копиями чужеродных генов могут быть удобными моделями для изучения механизмов регуляции экспрессии генов. Так, у трансгенных растений со сложноорганизованными инсерциями, состоящими из нескольких сцепленных между собой копий Т-ДНК (в прямой или обратной ориентации),

инактивация трансгенов регистрируется как на транскрипционном (Mette *et al.*, 1999; Fisher *et al.*, 2008), так и на посттранскрипционном уровнях (Kanno *et al.*, 2000; Дорохов, 2007; Chapman, Carrington, 2007). Оба механизма запускаются гомолого-зависимым действием коротких интерферирующих РНК (киРНК) (Brodersen, Voinnet, 2006; Дорохов, 2007). Известны случаи инактивации трансгенов на уровне соматических тканей одного органа трансгенного растения (Kilby *et al.*, 1992; Davies *et al.*, 1997; Leeuwen *et al.*, 2001).

Ранее среди независимо полученных трансформантов табака нами было выделено растение Nu 21, характеризующееся мозаичным проявлением маркерного гена *nptII*. Появление белых пятен на листовых пластинках 4–6-недельных растений линии Nu 21, культивируемых на селективной среде с антибиотиком канамицином, свидетельствовало о нарушении экспрессии *nptII*-гена в этих участках (Маренкова и др., 2007).

Установлено, что среди потомков первого и второго поколений, полученных от самоопыления исходного растения Nu 21, две Т-ДНК-копии, интегрированные в геном этого растения, на-

следуются сцепленно. Причины такого дифференциального инактивирования трансгена в различных клетках одного органа все еще остаются неясными. В связи с этим целью данной работы послужило выявление особенностей организации Т-ДНК-инсерций у растений линии Nu 21.

Материалы и методы

Исходным материалом послужили Т₄-потомки от самоопыления растения Nu 21, полученного ранее методом агробактериальной трансформации табака (*Nicotiana tabacum* L., SR1). В растительный геном табака Nu 21 была перенесена Т-ДНК генетической конструкции pC27-*nuclS* с маркерным геном неомицинфосфотрансферазы II (*nptII*) *E. coli* и целевым геном секреторной эндонуклеазы *Serratia marcescens* под управлением двунаправленного MAS-промотора гена маннопинсинтазы Ti плазмиды *A. tumefaciens* (Маренкова и др., 2007). Растения данной линии характеризовались мозаичным проявлением экспрессии гена *nptII*, что фенотипически проявлялось как чередование зеленых (устойчивых к канамицину) и неокрашенных (белых, неустойчивых к канамицину) секторов на листовых пластинках растений, растущих на селективной среде с антибиотиком канамицином.

Выделение геномной ДНК из листьев табака проводили по стандартной методике (Murray, Thompson, 1980) с модификациями. Для определения нуклеотидного состава в области Т-ДНК плазмиды pC27-*nuclS* использовали последовательности, полученные методом ПЦР, с праймерами:

nucl3 5'-GGATCCTTCTGATGGTGGAGTTCG-3', pMAS_L 5'-CGGTGACGCCATTTC-3', Ti-pl_p_L 5'-TTTCTAATGCTGCCCCG-3', *npt1* 5'-CGACGTTGTCACTGAAGCG-3', *nuclS* L 5'-CATATTGTTGTTAAAGCGC-3' (рис. 1). Для определения ориентации Т-ДНК-копий относительно друг друга в геномной ДНК исследуемых растений линии Nu 21 использовали праймеры: pTi_p2_L 5'-GATCCATGTAGATTTCCCGG-3', *npt_p2_R* 5'-CCGAGACGCCTATGATCG-3' (рис. 1). Для определения нуклеотидной последовательности между копиями Т-ДНК в геноме растений были сконструированы праймеры: *npt_p3_R* 5'-TGCCCCGAGAATTATGC-3', TDNA_left_end 5'-CGACGGATCGTAATTTGTTCG-3' (рис. 1). ПЦР проводили в конечном объеме 15 мкл с использованием набора Taq PCR Master Mix Kit («Quiagen», США) согласно протоколу производителя с добавлением 1,5 мкл 10 мкМ праймеров («Биосан», Россия) и 20–50 нг матрицы ДНК. Амплификацию осуществляли в следующем режиме: денатурация 3 мин при 95 °С, 35 циклов денатурация при 94 °С в течение 20 сек, отжиг праймеров при 58 °С в течение 20 сек; элонгация 1,2 мин при 72 °С. Очистку ПЦР-фрагментов осуществляли с использованием набора GenElute PCR Clean-up Kit («Sigma», США). Реакции секвенирования проводили с использованием «ABI PRISM Big Dye Terminator v 3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit» согласно инструкции производителя. Анализ продуктов реакции проводили в Межинститутском центре секвенирования ДНК (ИХБиФМ, СО РАН).

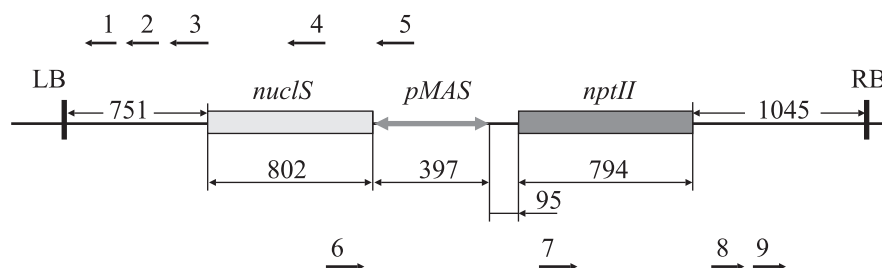


Рис. 1. Схема Т-области генетической конструкции pC27-*nuclS* (растение Nu 21) с праймерами для ПЦР и секвенирования: 1 – pTi_p2_L; 2 – TDNA_left_end; 3 – Ti-pl_p_L; 4 – *nucl3*; 5 – pMAS_L; 6 – *nuclS* L; 7 – *npt1*; 8 – *npt_p2_R*; 9 – *npt_p3_R*; *nuclS* – ген секреторной эндонуклеазы *S. marcescens*; *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы II *E. coli*; *pMAS* – двунаправленный промотор гена маннопинсинтазы Ti-плазмиды *A. tumefaciens*; LB, RB – повторы, ограничивающие Т-область Ti-плазмиды *A. tumefaciens*; цифрами указаны длины фрагментов в нп.

Результаты

На рис. 1 представлена схема Т-области генетической конструкции рС27-*nuclS*, построенная нами с учетом результатов секвенирования. По базе данных DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp>) с использованием метода BLAST установлено, что гены в составе Т-ДНК анализируемой плазмиды имеют гомологию более 99 % с соответствующими генами из базы данных: длина последовательности гена секреторной эндонуклеазы *S. marcescens* составила 802 пн, последовательности MAS-промотора гена маннопинсинтазы Тi-плазмиды *A. tumefaciens* – 397 пн, последовательности гена *nptII* *E. coli* – 794 пн. Некодирующая область между правой границей области *pMAS* и левой границей гена *nptII* имеет длину 95 пн. На расстоянии 751 пн от последовательности гена *nuclS* и 1045 пн от гена *nptII* располагаются LB и RB (левый и правый повторы, окаймляющие Т-область Тi-плазмиды *A. tumefaciens*) длиной по 25 пн. Участки нуклеотидных последовательностей, расположенные между геном *nuclS* и последовательностью LB, а также между геном *nptII* и последовательностью RB, гомологичны не кодирующим районам Тi плазмиды рTi15955 *A. tumefaciens* (X00493) (рис. 1).

На основании полученных данных были сконструированы праймеры, комплементарные левому и правому концевым районам последовательности Т-ДНК (рис. 1). Для определения ориентации Т-ДНК копий относительно друг друга была проведена ПЦР с праймерами, каж-

дая комбинация которых была подобрана так, что фрагменты могли быть амплифицированы только при определенной ориентации Т-ДНК копий: с праймерами рTi_p2_L – ориентация «хвост к хвосту»; с праймерами рTi_p2_L и npt_p2_R – «голова к хвосту»; с праймерами npt_p2_R – «голова к голове».

На рис. 2 представлены результаты ПЦР анализа с тремя вышеперечисленными типами праймеров для двух произвольно взятых растений (дорожки 2–4 и 5–7 соответственно) линии Nu 21. Как видно из представленных данных, продукты ПЦР с праймерами рTi_p2_L и npt_p2_R, соответствующие размеру ожидаемого фрагмента порядка 2300 пн, выявлялись только на дорожках 3 и 6, что свидетельствовало о том, что копии Т-ДНК располагаются одна за другой и имеют ориентацию «голова к хвосту». Продукты амплификации геномных ДНК с соответствующими парами праймеров на дорожках 2 и 4 для одного растения и на дорожках 5 и 7 – для другого растения линии Nu 21 свидетельствовали о том, что предполагаемые типы ориентаций Т-ДНК-встройек («хвост к хвосту» и «голова к голове») не подтвердились.

На рис. 3 представлена схема организации Т-ДНК встройки в геноме растений линии Nu 21, составленная с учетом данных секвенирования. Методом BLAST по базе данных DDBJ (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp>) установлено наличие усеченной копии Т-ДНК между двумя предположительно полноразмерными копиями. Усеченная копия Т-ДНК располагалась в обратной ориентации к полноразмерным

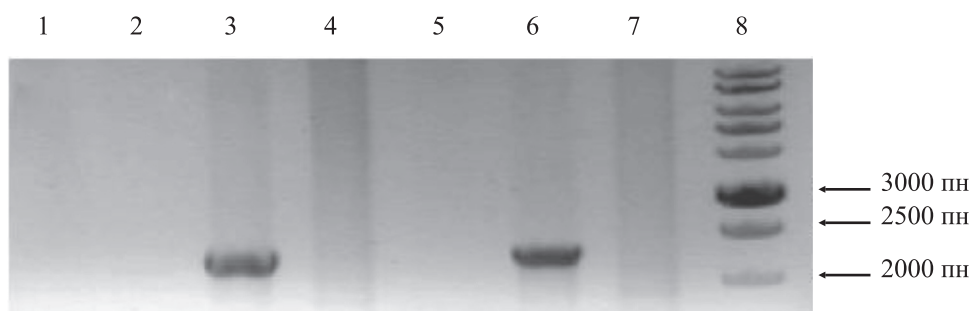


Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, амплифицированных с геномной ДНК двух (дорожки 2–4 и 5–7) произвольно взятых растений линии Nu 21 с праймерами, комплементарными границам Т-ДНК последовательности: 1 – отрицательный контроль (без добавления матрицы ДНК); 2 и 5 – с праймерами рTi_p2_L; 3 и 6 – с праймерами рTi_p2_L и npt_p2_R; 4 и 7 – с праймерами npt_p2_R; 8 – маркер молекулярного веса 1кб («Медиген», Россия).

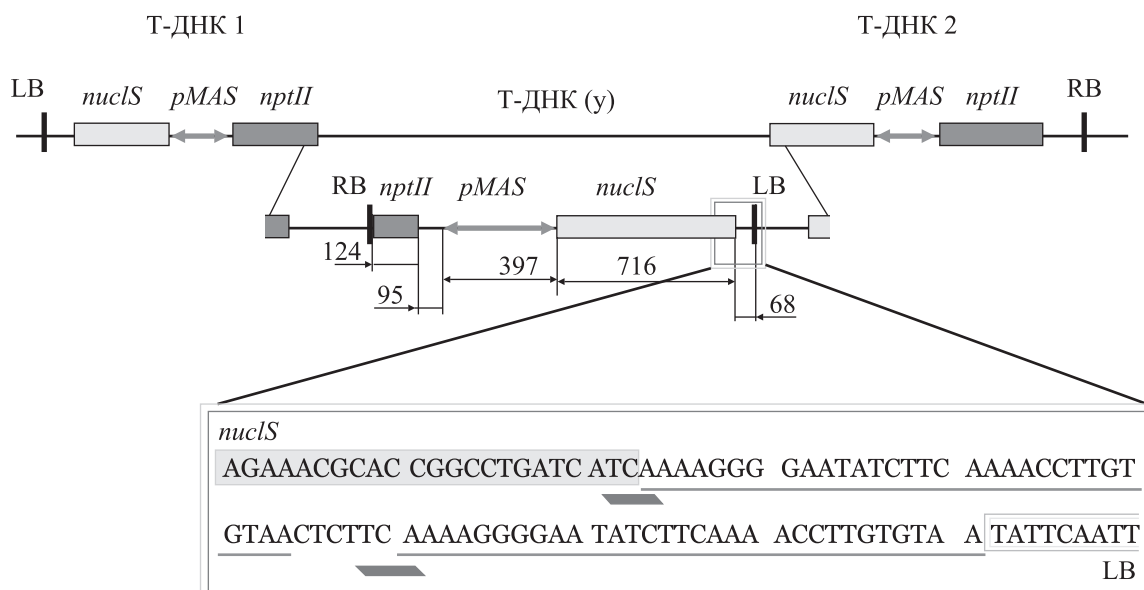


Рис. 3. Схема расположения копий Т-ДНК в геноме растений линии Nu 21.

nuclS – ген секреторной эндонуклеазы *S. marcescens*; *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы II *E. coli*; *pMAS* – двунаправленный промотор гена маннопинсинтазы Тi-плазмиды *A. tumefaciens*; LB, RB – повторы, ограничивающие Т-область Тi-плазмиды *A. tumefaciens*; тонкой линией подчеркнута последовательность 31 нп повторенной последовательности, жирной линией выделена область микрогомологии.

Т-ДНК-копиям. Последовательность нуклеотидов *pMAS* усеченной копии составила 397 пн, что соответствовало полученным ранее результатам для последовательности Т-ДНК плазмиды рС27-*nuclS*. Между правой границей области *pMAS* и левой границей гена *nptII* выявлена некодирующая область длиной 95 пн, гомологичная некодирующей области, выявленной у рС27-*nuclS*. Последовательности генов *nptII* и *nuclS* усеченной копии имели длину 124 пн и 715 пн соответственно, в то время как в Т-ДНК плазмиды рС27-*nuclS* длина данных генов составила 794 пн и 802 пн. Усеченная копия Т-ДНК при встраивании утратила часть гена *nuclS*, большую часть гена *nptII*, а также прилежащие к ним последовательности, включая LB и RB (рис. 3). Установлено, что интеграция первой копии Т-ДНК (условно обозначена Т-ДНК1) произошла с потерей большей части RB (23 пн из 25 пн), LB Т-ДНК2 в геноме растений составляла 17 пн вместо 25 пн.

Между LB Т-ДНК2 и последовательностью усеченного гена *nuclS* выявлен дополнительный фрагмент размером 68 пн. Нуклеотидный состав данного фрагмента представлен на рис. 3

в виде выделенного сегмента. Как видно из представленного рисунка, последовательность содержит повторенные фрагменты размером 31 пн в прямой ориентации относительно друг друга, разделенные 6 пн.

При сравнительном анализе нуклеотидных составов 68 пн дополнительного фрагмента и последовательности рядом расположенного усеченного гена *nuclS* выявлено наличие пары нуклеотидов TC в начале каждого повторенного фрагмента. Полученные результаты позволили скорректировать длину повторенных фрагментов до 33 пн, из чего следует, что первый повтор перекрывается с геном *nuclS*, образуя область микрогомологии длиной 2 пн.

Обсуждение

Известно, что встраивание Т-ДНК в геном растений происходит путем негомологичной (незаконной) рекомбинации. При таком механизме интеграции фрагментов экзогенной ДНК в растительный геном необходимо наличие коротких (1–8 пн) участков гомологии между нуклеотидными последовательностями на

концах Т-ДНК и геномной ДНК (Mayerhofer *et al.*, 1991), поэтому выявленный нами фрагмент размером 68 пн, расположенный между LB Т-ДНК2 и последовательностью усеченного гена *nuclS*, мог быть образован растительной ДНК. Методом BLAST по базе данных DDBJ найдена гомология этой дополнительной последовательности ДНК с участками генов и межгенными участками ДНК различных растений (ячмень, люцерна, кукуруза, виноград, томат), однако протяженность гомологичных участков не превышала 19 пн. Следовательно, предположение о растительном происхождении последовательности ДНК между усеченной копией Т-ДНК и Т-ДНК2 оказалось несостоятельным.

В результате ошибок в процессе интеграции фрагментов чужеродных ДНК в растительном геноме выявлены встройки множественных, тесно сцепленных копий гетерологичных генов (Jakowitsch *et al.*, 1999; Wang, Waterhouse, 2000; Zhang *et al.*, 2008), усеченных фрагментов Т-ДНК (Jakowitsch *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2008). Часто такие ошибки сопровождаются перестройками на правой или/и левой границах Т-ДНК с образованием делеций, прямых и инвертированных дупликаций (Windels *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2007).

Известны случаи встраивания в геном трансгенного растения дополнительных последовательностей ДНК, образованных растительной и/или плазмидной ДНК (Windels *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2008; Gambino *et al.*, 2009). Если Т-ДНК встраивалась в район повторов геномной ДНК, то такие встройки часто сопровождались образованием дополнительных фрагментов растительной ДНК (Iglesias *et al.*, 1997). Дополнительные последовательности могли быть образованы в результате дупликации фрагмента растительной ДНК в районе интеграции (Windels *et al.*, 2003; Muller *et al.*, 2007) или в результате встраивания векторной последовательности вместе с Т-ДНК (Windels *et al.*, 2003; Gambino *et al.*, 2009). Следует подчеркнуть, что выявленная нами последовательность размером 68 пн, прилежащая к Т-ДНК2 и усеченной копии Т-ДНК, не имела гомологии с векторной последовательностью плазмиды, и ее происхождение до сих пор остается неясным.

Механизм негомологичной рекомбинации при интеграции фрагментов экзогенных ДНК в

ядерный геном растения включает репарацию одно- или двцепочечного разрывов (Mayerhofer *et al.*, 1991). Образование дополнительного фрагмента в процессе интеграции Т-ДНК посредством синтеза по матрице случайной ДНК-цепи, основанного на микрогомологии последовательности Т-ДНК и геномной ДНК растения, описано в работе В. Горбуновой и А. Леви (Gorbunova, Levy, 1997). Сложные по составу дополнительные фрагменты могут быть образованы переключением репаративной достройки ДНК-цепи на новую матрицу, имеющую участок микрогомологии от 1 до 16 пн (Gorbunova, Levy, 1997). Данная модель могла бы объяснить образование сложной дополнительной ДНК-последовательности, имеющей область микрогомологии длиной 2 пн (рис. 3) у трансгенных растений линии Nu 21. Однако на основании данной модели невозможно объяснить интеграцию в растительный геном нескольких сцепленных между собой Т-ДНК-копий.

Для объяснения встраивания множественных копий Т-ДНК в геноме трансгенных растений (например, двух копий Т-ДНК в прямой ориентации и одной усеченной с обеих сторон копии, расположенной между ними в обратной ориентации) предложена модель совместной интеграции (коинтеграции) копий Т-ДНК (Krizkova, Hroudá, 1998). В основе данной модели положены инвазия одноцепочечной Т-ДНК с образованием разрыва одной из цепей растительной ДНК и репаративная репликация встраиваемой ДНК. Однако данная модель может лишь частично объяснить образование сложноорганизованной встройки у трансгенных растений линии Nu 21. Возможно, интеграция сложной встройки в геном трансгенного растения Nu 21 могла произойти в результате сочетания описанных выше механизмов.

На основании проделанной работы установлено, что встройка экзогенной ДНК в геноме растений линии Nu 21 имеет сложную структуру и организована в виде двух предположительно полноразмерных копий Т-ДНК и одной усеченной копии между ними, расположенной в обратной к ним ориентации. Между усеченной копией Т-ДНК и Т-ДНК2 выявлен дополнительный фрагмент, организованный в виде двух повторов размером 33 пн каждый, расположенных

в прямой ориентации относительно друг друга. Полученные нами данные об особенностях организации Т-ДНК-встройки у растений линии Nu 21 дают основания предположить, что нестабильность экспрессии *nptII*-гена у исследуемых растений линии Nu 21 могла быть связана с возможным участием коротких интерферирующих РНК, запускающих процесс метилирования данного гена. В усеченной Т-ДНК-копии терминирующая последовательность *nptII*-гена отсутствует, вследствие чего может быть транскрибирована длинная молекула РНК, способная к образованию шпильки, что служит сигналом для образования кРНК и инактивации экспрессии *nptII*-гена. Однако причины «сбоев» в запуске такого механизма инактивирования *nptII*-гена, проявляющихся в мозаичном характере распределения белых и зеленых секторов на листовых пластинках растений линии Nu21, все еще остаются неясными.

Итак, линия Nu 21 трансгенных растений табака с мозаичным проявлением *nptII*-гена в составе сложноорганизованной инсерции (две предположительно полноразмерные копии и усеченная копия Т-ДНК между ними) представляет удобную модель для изучения механизмов дифференциального инактивирования трансгена в различных клетках одного и того же органа растения, что послужит предметом наших дальнейших исследований. Полученные нами данные о составе нуклеотидной последовательности области Т-ДНК исходной плазмиды рС27-*nuclS* и районов Т-ДНК у растений линии Nu 21 позволят в дальнейшем провести анализ статуса метилирования и определение возможного механизма инактивации маркерного гена *nptII*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ-08-04-00954а.

Литература

- Дорохов Ю.Л. Умолкание генов у растений // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. № 4. С. 579–592.
- Маренкова Т.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Мозаичный характер проявления гена *nptII* у трансгенных растений табака линии Nu21 // Генетика. 2007. Т. 43. №7. С. 943–954. (Marenkova T., Deineco E., Shumny V. Mosaic expression pattern of the *nptII* gene in transgenic tobacco plants Nu 21 // Russ. J. Genet. V. 43. № 7. P. 780–790.)
- Brodersen P., Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants // Trends Genet. 2006. V. 22. № 5. P. 268–280.
- Chapman E.J., Carrington J.C. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways // Nat. Rev. Genet. 2007. V. 8. P. 884–896.
- Davies G.J., Sheikh M.A., Ratcliffe O.J. *et al.* Genetics of homology-dependent gene silencing in *Arabidopsis*: a role for methylation // The Plant J. 1997. V. 12. P. 791–804.
- Fischer U., Kuhlmann M., Pecinka A. *et al.* Local DNA features affect RNA-directed transcriptional gene silencing and DNA methylation // Plant J. 2008. V. 53. № 1. P. 1–10.
- Gambino G., Chitarra W., Fatemeh M. *et al.* Characterization of T-DNA insertions in transgenic grapevines obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation // Mol. Breed. 2009. V. 24. № 3. P. 305–320.
- Gorbunova V., Levy A.A. Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. № 22. P. 4650–4657.
- Hobbs S.L.A., Warkentin T.D., DeLong C.M.O. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression // Plant Mol. Biol. 1993. V. 21. P. 17–26.
- Iglesias V.A., Moscone E.A., Papp I. *et al.* Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco // The Plant Cell. 1997. V. 9. P. 1251–1264.
- Jakowitsch J., Papp I., Moscone E.A. *et al.* Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans // Plant J. 1999. V. 17. P. 131–140.
- Kanno T., Naito S., Shimamoto K. Post-transcriptional gene silencing in cultured rice cells // Plant Cell Physiol. 2000. V. 41. P. 321–326.
- Kilby N.J., Leyser H.M.O., Fumer I.J. Promoter methylation and progressive transgene inactivation in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. 1992. V. 20. P. 103–112.
- Kim S-R., Lee J., Jun S-H., Park S. *et al.* Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants // Plant Mol. Biol. 2003. V. 52. P. 761–773.
- Krizkova L., Hroudá M. Direct repeats of T-DNA integrated in tobacco chromosome: characterization of junction regions // Plant J. 1998. V. 16. P. 673–680.
- Leeuwen W. van, Ruttink T., Borst-Vrens A.W.M. *et al.* Characterization of position-induced spatial and temporal regulation of transgene promoter activity in plants // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 949–959.
- Ma C., Mitra A. Intrinsic direct repeats generate consistent post-transcriptional gene silencing in tobacco //

- Plant J. 2002. V. 31. № 1. P. 37–49.
- Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C. *et al.* T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants // EMBO J. 1991. V. 10. P. 697–704.
- Mette M.F., Van der Winden J., Matzke M.A. *et al.* Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans // EMBO J. 1999. V. 18. № 1. P. 241–248.
- Muller A.E., Atkinson R.G., Sandoval R.B., Jorgensen R.A. Microhomologies between T-DNA ends and target sites often occur in inverted orientation and may be responsible for the high frequency of T-DNA-associated inversions // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 617–630.
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. P. 4321–4325.
- Muskens M., Vissers A., Mol J. *et al.* Role of inverted DNA repeats in transcriptional and post-transcriptional gene silencing // Plant Mol. Biol. 2000. V. 43. P. 243–260.
- Sallaud C., Meynard D., Boxtel J. van *et al.* Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 106. P. 1396–1408.
- Scarn M., Eike M.C., Meza T.J. *et al.* An inverted repeat transgene with a structure that cannot generate double-stranded RNA, suffers silencing independent of DNA methylation // Transgenic Res. 2006. V. 15. P. 489–500.
- Wang M.B., Waterhouse P.M. High-efficiency of a β -glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation // Plant Mol. Biol. 2000. V. 43. P. 67–82.
- Windels P., De Buck S., Van Bockstaele E. *et al.* T-DNA integration in Arabidopsis chromosomes. Presence and origin of filler DNA sequences // Plant Physiol. 2003. V. 133. P. 2061–2068.
- Zhang J., Cai L., Cheng J. Transgene integration and organization in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) genome // Transgenic Res. 2008. V. 17. P. 293–306.

FEATURES OF T-DNA INSERT ORGANIZATION IN TRANSGENIC TOBACCO-PLANTS, LINE NU 21

D.B. Loginova, V.K. Shumny, E.V. Deineko

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: loginova@bionet.nsc.ru, shumny@bionet.nsc.ru, deineko@bionet.nsc.ru

Summary

Features of T-DNA insert organization in transgenic tobacco-plant line Nu 21 showing marker gene *nptII* mosaic expression were analyzed. It was found that the insert of exogenous DNA in the Nu 21 genome is complex. It consists of two presumably full-size T-DNA copies, T-DNA1 and T-DNA2, which have the «head to tail» orientation. A T-DNA copy truncated at both ends was detected between the two full-size copies. The truncated copy is oriented opposing the other copies. It is separated from T-DNA2 by two 33-bp long tandem repeats.

Key words: *Nicotiana tabacum*, inactivation of genes expression, tandem and inverted repeats.