

На правах рукописи

*long*

Головешкина Елена Николаевна

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ MADS-БЕЛКОВ АСТРОВЫХ,  
РЕГУЛИРУЮЩИХ ЦВЕТЕНИЕ, И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ  
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Специальность: 03.01.06 – биотехнология (в том числе  
бионанотехнологии), 03.02.07 – генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук  
Центр «Биоинженерия» РАН

**Научные руководители:** кандидат химических наук  
**Шульга Ольга Альбертовна**

кандидат биологических наук  
**Камнионская Анастасия Михайловна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
**Соловьев Александр Александрович**

кандидат биологических наук  
**Чернобровкина Мария Аркадьевна**

**Ведущая организация:** Станция искусственного климата «БИОТРОН»,  
Филиал учреждения РАН института  
биоорганической химии им. Академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (ФИБХ)

Защита диссертации состоится “08” февраля 2011 г. в 14 час. 30 мин. на  
заседании диссертационного совета Д 220.043.10 при Российском  
государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева по  
адресу: 127550, Москва, Тимирязевская ул., 49.

Факс: (499) 976-08-94

e-mail: genetics@timacad.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке  
им. Н.И. Железнова РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева и на сайте  
[www.timacad.ru](http://www.timacad.ru)

Автореферат разослан «29» декабря 2011 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук

 Л.С. Большакова

2012A

## 1318 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Покрытосеменные господствуют на большей части суши и играют решающую роль в формировании растительного покрова. Их обитание в различных экологических условиях во всех климатических зонах объясняется поразительной пластичностью онтогенеза этих растений, что отражается в изменениях их структуры. Важнейшим событием, ознаменовавшим возникновение покрытосеменных, стало появление цветка. И произошло это, согласно общепринятому мнению, в результате эволюционных изменений в последовательности генов, кодирующих MADS-box факторы транскрипции, что сопровождалось изменениями в механизмах контроля экспрессии как самих факторов, так и транскрипции их генов-мишеней. Поэтому сегодня особое внимание сфокусировано на MADS-белках, которые регулируют многие процессы развития растений, в частности, переход растения к репродуктивной стадии развития и последующий морфогенез цветка.

Функциональные исследования MADS-box факторов транскрипции свидетельствуют о том, что структурная гомология сопровождается сходством функции, но при этом имеются свои особенности, что обуславливает морфологию конкретного вида растений. В частности, было продемонстрировано, что конститутивная экспрессия MADS-генов групп *SQUAMOSA (SQUA)* и *AGL2 (SEPALLATA, SEP)* изменяет сроки цветения у модельных и сельскохозяйственных растений. Ранее в нашей лаборатории были клонированы кДНК семи MADS-генов Астровых, гомологичных генам *SQUA* и *AGL2*. Для двух из них был проведен функциональный анализ кодируемых ими белков в модельных растениях *A. thaliana*. Функции MADS-белков Астровых *SQUA*- и *AGL2*-групп мало изучены. Целью нашей работы стала характеристика всей группы указанных генов в модельном растении *N. tabacum*.

Выяснение общих основ и частных особенностей генетического контроля генеративного развития растений разных видов имеет несомненную фундаментальную значимость. Характер влияния эктопической экспрессии MADS-генов указывает на практическую ценность подобных экспериментов как оценивающих возможность использования этих генов в биотехнологии растений. И то, и другое подчеркивает актуальность сравнительного изучения функциональной роли MADS-факторов транскрипции Астровых.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы являлось изучение функциональной роли MADS-факторов транскрипции (группы *SQUA*) гомологичных *AP1*, *FUL* и *SEP* из хризантемы (CDM111, CDM41, CDM8 CDM77, CDM44; Shekharikova et al., 2004) и подсолнечника (HAM92, HAM75; Мухоморова и др., 2000).

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный структурно-филогенетический анализ использованных в работе MADS-белков хризантемы и подсолнечника.
2. Получить модельные трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun NN* с MADS-факторами транскрипции Астровых.
3. Изучить влияние конститутивной экспрессии MADS-генов Астровых *CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM77*, *CDM44*, *HAM92*, *HAM75* на вегетативное и генеративное развитие модельных растений табака.

**Научная новизна и практическая значимость работы.** Впервые проведен анализ функциональной роли MADS-факторов транскрипции (группы SQUA) гомологичных AP1, FUL и SEP из хризантемы *CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM77*, *CDM44* и подсолнечника *HAM92*, *HAM75*. Показано, что конститутивная экспрессия генов Астровых, кодирующих белки AP1/FUL, приводит к ускорению наступления фазы цветения в трансгенных растениях табака *Nicotiana tabacum* L., что свидетельствует о консервативности процессов, происходящих в растениях разных видов. Тем не менее, гомологи FUL из хризантемы не проявили своего участия в дифференцировке клеток плода. Продемонстрирована значимость порогового уровня экспрессии для функции гомологов AP1: *HAM75* и *HAM92*. Анализ влияния экспрессии *CDM44* и *CDM77* на онтогенез растений показал функциональное сходство *CDM44* и SEP3, участие *CDM44* в регуляции скорости клеточного деления и возможную узкую специализацию для *CDM77*. Изменение сроков цветения у модельных растений без существенного влияния на урожайность при конститутивной экспрессии генов MADS-факторов транскрипции (группы SQUA), таких как *CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM44*, *HAM92*, *HAM75*, делает их перспективными кандидатами для создания новых форм различных сельскохозяйственных культур с измененными сроками развития.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. MADS-белки Астровых AP1/FUL- и SEP-групп участвуют в определении времени зацветания растения;
2. Белки Астровых, подобные AP1, FUL и SEP, не влияют на закладку цветковых органов в трансгенных растениях табака.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были доложены на международных конференциях: «Инновационные технологии в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур» (Москва, 2006); «Генетика в России и в мире» (Москва, 2006); «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2007); «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Звенигород, 2008); «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях» (Звенигород, 2008);

«Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009); «*Plant Gene Discovery Technologies*» (Вена, 2011); а также на Съезде генетиков и селекционеров, посвященному 200-летию со дня рождения Ч.Дарвина (Москва, 2009), и на школах: 10 школе-конференции (Пушино, 2006); VII Молодежной научной школе-конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2007); 11 Международной школе-конференции (Пушино, 2007); II Международной Школе «Эмбриология, генетика и биотехнология» (Уфа, 2007); XV Школе по биологии развития (2008); Всероссийской научной школе «Горизонты нанобиотехнологии» (Москва, 2009). По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ: две статьи в рецензируемых отечественном (1) и международном (1) журналах, рекомендованных ВАК, и 13 тезисов на конференциях.

**Объем и структура диссертации.** Работа изложена на 133 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы из 185 источников. Иллюстративный материал состоит из 13 таблиц и 22 рисунков.

**Благодарности.** Автор глубоко признателен научным руководителям Шульге О.А. и Каминской А.М. и Щенниковой А. В. за неоценимую помощь в работе.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В работе использованы: штаммы *A. tumefaciens* GV3101; растения *Nicotiana tabacum* L. сорта *Samsun NN*; вектора pGD121::ген (*CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM44*, *CDM77*, *HAM75*, *HAM92*) для трансформации растений. Сравнительный и филогенетический анализ последовательностей MADS-генов осуществляли с помощью программ BLAST (Altschul et al., 1997), ClustalX (Larkin et al., 2007). Растения табака трансформировали согласно Horsch et al. (1984). Геномную ДНК из растений выделяли по Dellaporta et al. (1987). ПЦР проводили согласно Головешкиной с соавт. (2010). Выделение и ОТ-ПЦР анализ мРНК тканей табака проводили согласно протоколу фирмы QIAGEN. Статистическую обработку данных проводили по Доспехову (1985).

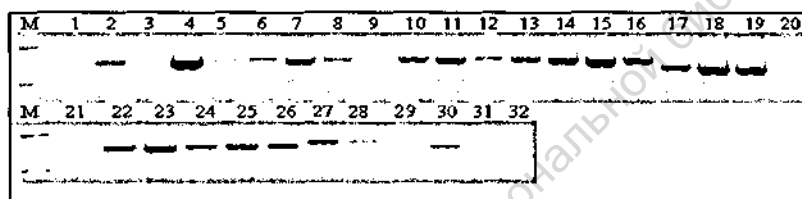
#### **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

##### **Трансгенные растения табака с экспрессией MADS-генов Астровых**

Предметом нашего исследования являются гены, кодирующие MADS факторы транскрипции представителей семейства Астровых – хризантемы (*Chrysanthemum morifolium* L., *CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM77*, *CDM44*; Щенникова и др., 2003) и подсолнечника (*Helianthus annuus* L., *HAM92*, *HAM75*; Шульга и др., 2008). Поскольку эти культуры отличаются сравнительно низкой эффективностью трансформации, мы проанализировали функции белков CDM и HAM, получив трансгенные модельные растения

табака *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun NN* с конститутивной экспрессией перечисленных выше MADS-генов.

Для экспрессии анализируемых белков мы использовали промотор 35S РНК вируса мозаики цветной капусты, который активен во всех тканях двудольных растений (Odell et al., 1985; Sunilkumar et al., 2002). Полученные нами в результате агробактериальной трансформации и селекции на среде с канамицином регенеранты проверили методом ПЦР на присутствие в геноме трансгенов (рис. 1) и отсутствие агробактериального заражения. 86 отобранных трансгенных растений Т0 (18 – 35S::HAM75, 20 – 35S::HAM92, 6 – 35S::CDM111, 3 – 35S::CDM44, 11 – 35S::CDM41, 8 – 35S::CDM8, 20 – 35S::CDM77) и нетрансгенные растения, полученные в ходе регенерации, выращивали в теплице до получения семенного материала Т1.



**Рисунок 1.** Электрофорез продуктов ПЦР с праймерами, специфичными к последовательностям промотора 35S *CaMV* и терминатора NOS. М – маркер молекулярной массы ДНК (2000 и 850 н.л.); 1, 21, 32 – без ДНК-матрицы; 2 – ДНК плазмиды *pGD121::HAM75*; 3 – ДНК нетрансгенного табака; 4-16, 27, 28 – ДНК растений 35S::HAM92; 17-20 – ДНК растений 35S::CDM8, 22 – ДНК плазмиды *pGD121::CDM111*; 23-26 – ДНК растений 35S::HAM75; 29-31 – ДНК растений 35S::CDM111.

#### Расщепление в поколении Т1 трансгенных растений табака

Экспрессия трансгена зависит от числа копий, района интеграции в геноме, характера вставок (отдельно или в составе тандема – в прямой или обратной ориентации) и др. (Scheid et al., 1991; Matzke et al., 1994, Jones et al., 1987, Wang et al., 2000). При агробактериальной трансформации в геном растения может интегрировать до нескольких копий вставки. По признаку устойчивости к канамицину мы отобрали 17 линий с расщеплением 3:1 и линию 92-3 с расщеплением 15:1, что предполагает однолокусную и независимую двухлокусную интеграции, соответственно (табл. 1). По 10 устойчивых к канамицину проростков Т1 каждой линии проверили с помощью ПЦР на наличие трансгена.

**Таблица 1.** Расщепление поколения Т1

линия	Км <sup>к</sup> , шт	Км <sup>с</sup> , шт	взошло, шт	Н <sub>0</sub>	$\chi^2$ факт.	$\chi^2$ теор.
CDM8-1*	231	69	300	3:1	0,6	3,84
CDM8-2*	235	65	300	3:1	1,7	3,84
CDM8-5*	216	84	300	3:1	1,44	3,84

Продолжение таблицы 1

CDM8-3	0	28	300	-	-	-
CDM41-1	260	40	300	3:1/15:1	21,7/25,7	3,84
CDM41-12*	220	80	300	3:1	0,4	3,84
CDM44-1*	214	86	300	3:1	2,6	3,84
CDM44-2*	227	73	300	3:1	0,7	3,84
CDM111-5*	216	84	300	3:1	1,44	3,84
CDM111-6	282	18	300	3:1/15:1	57,76/0,03	3,84
CDM77-1*	230	70	300	3:1	0,4	3,84
CDM77-2*	226	74	300	3:1	0,03	3,84
HAM75-1*	230	70	300	3:1	0,4	3,84
HAM75-2*	220	80	300	3:1	0,4	3,84
HAM75-3	227	73	300	3:1	0,07	3,84
HAM75-4*	214	86	300	3:1	2,1	3,84
HAM75-8*	217	83	300	3:1	1,2	3,84
HAM75-12	229	71	300	3:1	0,27	3,84
HAM75-16*	222	78	300	3:1	0,16	3,84
HAM75-18	210	90	300	3:1	4	3,84
HAM75-19	223	77	300	3:1	0,07	3,84
HAM75-20	270	30	300	3:1/15:1	37,7/7,15	3,84
HAM92-3*	275	25	300	3:1/15:1	44,4/2,2	3,84
HAM92-10	242	48	290	3:1/15:1	11,10/52,52	3,84
HAM92-11	295	5	300	3:1/63:1	93,10/0,02	3,84
HAM92-12*	233	67	300	3:1	1,2	3,84
HAM92-15	225	67	292	3:1	0,65	3,84
HAM92-16*	226	74	300	3:1	0,02	3,84
HAM92-17	218	82	300	3:1	0,9	3,84
HAM92-18	215	85	300	3:1	1,8	3,84
HAM92-19	209	91	300	3:1	4,6	3,84
HAM92-20	215	85	300	3:1	1,7	3,84

Примечание: \* - трансгенные линии, отобранные для последующих наблюдений.

#### Экспрессия MADS-генов Астровых в трансгенных растениях табака

С помощью ОТ-ПЦР мы выяснили, что во всех растениях T1, кроме HAM75-4 и HAM75-8, присутствует мРНК трансгенов (рис. 2А, Б).

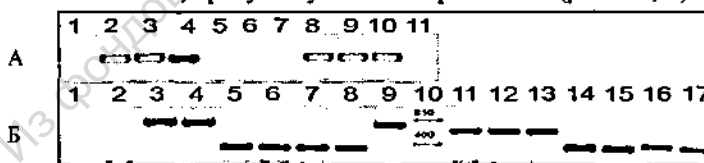


Рисунок 2. Электрофорез продуктов ОТ-ПЦР с ген-специфичными праймерами на РНК из листьев растений поколения T1

А. 1 – нетрансгенное растение; 2-4 – линия 75-1; 8-10 – 75-2; 5-7 – 75-4; 11 – смесь РНК анализируемых растений без ревертазы. Б. 10 – маркер молекулярной массы (Fast Ruler™ DNA Ladder Middle Range, Fermentas); 1 – нетрансгенное растение; 2 – смесь РНК анализируемых растений без ревертазы; 3, 4 – 35S::CDM111; 5-8 – 35S::HAM92; 9 – 35S::CDM41; 11-13 – 35S::CDM44; 14, 15 – 35S::CDM77; 16, 17 – 35S::CDM3.

При агробактериальной трансформации растений трансгены встраиваются в геном случайным образом путем негомологичной рекомбинации. Поэтому число встроенных копий, их хромосомное местоположение и локальное расположение отличаются у независимых трансгенных регенерантов. Увеличение числа копий может привести к подавлению транскрипции трансгена вплоть до ее полного выключения (Vaucheret and Fagard, 2001). Случаи делеции фрагментов перенесенной с помощью агробактерии ДНК также инактивируют трансген (Deroles and Gardner, 1988).

Результаты молекулярного анализа растений HAM75-4 и HAM75-8 позволяют сделать вывод о наличии полной трансгенной вставки. Устойчивость проростков этих линий к канамицину свидетельствует об экспрессии гена *nptII*, входящего в перенесенную в растения конструкцию. Отсутствие мРНК трансгена можно объяснить замалчиванием, так как число копий *HAM75* может быть две и больше, хотя расщепление этих линий в поколении T1 говорит об однолокусной интеграции вставки. Линии HAM75-4 и HAM75-8 взяли в дальнейшие наблюдения в качестве дополнительного контроля.

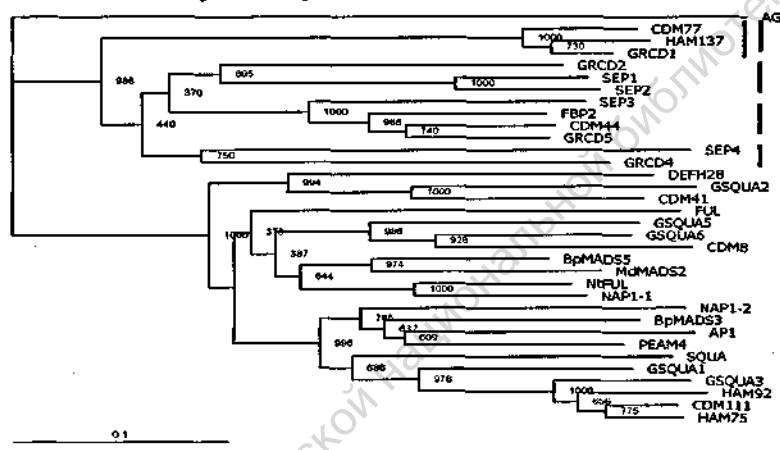
#### Структурно-филогенетический анализ белков CDM и HAM

Чтобы лучше понять филогенетические отношения между MADS-генами хризантемы и подсолнечника, мы провели сравнительный структурно-филогенетический анализ аминокислотных последовательностей соответствующих белков. Как и другие представители растительного MADS-семейства группы MICK, они состоят из консервативных MADS- и K-доменов, соединяющей их консервативной I-области и варибельного C-конца. Из дендрограммы (рис. 3) очевидно, что CDM111, HAM92 и HAM75 являются членами клады euAP1, CDM41 и CDM8 – FUL, а CDM44 и CDM77 – SEP3 и ASTERACEAE.SEP3 (AST.SEP3), соответственно (Purugganan et al., 1995; Theissen et al., 1996). Анализ с помощью BLAST (Altschul et al., 1997) показал, что ближайшими гомологами всех исследуемых белков CDM и HAM являются MADS-белки Астровых, что предполагает большее функциональное сходство с ними, нежели с гомологами из других растительных семейств.

Считается, что растительные MADS-гены эволюционировали преимущественно за счет изменений в *cis*-регуляторных элементах, что меняло профиль их экспрессии, обновляло функции и являлось причиной морфологических перестроек, которые привели к разнообразию соцветий и цветков (Litt and Irish, 2003). Полагают, что члены клады euAP1 эволюционировали за счет мутации сдвига рамки считывания в C-концевом мотиве paleoAP1 белков группы euFUL/FUL. Поэтому клады euAP1 и FUL признаны близкородственными и объединены в одно семейство SQUA



(API/FUL) (Litt and Irish, 2003). Филогенетический анализ и профили экспрессии генов клады API/FUL хризантемы (*CDM111*, *CDM41* и *CDM8*) свидетельствуют в пользу эволюционного происхождения всех трех генов от одного предшественника в результате дупликации (Shchennikova et al., 2004). Наиболее широко представлена область транскрипции *CDM41*, что предполагает его более раннее происхождение. Транскрипция всех трех генов в меристеме цветка говорит об общем свойстве определять ее идентичность. Наличие мРНК *CDM111* в лепестках язычковых цветков и мРНК *CDM41* и *8* в вегетативных тканях и плодolistиках говорит о вероятном участии генов в развитии соответствующих органов.



**Рисунок 3.** Дендрограмма на основе сравнительно структурно-филогенетического анализа аминокислотных последовательностей API/FUL- и SEP-белков Астровых и других видов растений

Для укоренения взят MADS-белок AG. Сплошной линией обозначен кластер AST.SEP3; прерывистой – клада AGL2 (SEP3); точечной – клада FUL; двойной – euAPI.

Значительное сходство последовательностей API и FUL часто затрудняет определение ортологии конкретного белка. Белок API служит субстратом для фарнезилтрансферазы (ФТазы), что является критическим для правильной регуляции им перехода растения к цветению (Yalovsky et al., 2000). Мы нашли на С-конце *CDM111*, *HAM92* и *HAM75* консервативный мотив euAPI, включающий последовательность CFPS, которая напоминает сигнал фарнезилирования CFAA из API. Эктопическая экспрессия нефарнезилированного API в *Arabidopsis* не приводит к формированию сложного терминального цветка, в отличие от фарнезилированной версии (Yalovsky et al., 2000). Ранее было показано, что эктопическая экспрессия

*CDM111* и *HAM75* в *Arabidopsis* приводит к формированию терминального сложного цветка (Shchennikova et al., 2004; Шульга О.А., не опубликовано). Следовательно, сигнал CFPS на конце этих белков распознается ФТазой.

Litt и Irish (2003), анализируя происхождение семейства AP1/FUL, нашли гидрофобный paleoAP1-мотив, свойственный белкам FUL и euFUL. Факторы CDM41 и 8 имеют такие мотивы: MPLWMI и MPPWMV, соответственно. Похожий мотив (IPGWML) был обнаружен для гомологов SEP (Litt and Irish, 2003). Главным отличием от FUL-мотива является остаток, следующий за триптофаном (в основном это не метионин), и то, что SEP-мотив почти всегда завершает последовательность, в то время как за FUL-мотивом есть несколько аминокислот. На С-конце CDM44 имеются последовательности MPGWYQ, соответствующая SEP-мотиву, и AGPS, характерная для гомологов SEP3 и предположительно ответственная за их свойство активировать транскрипцию генов-мишеней (Immink et al., 2009). И действительно, в двухгибридной дрожжевой GAL4-системе CDM44 активирует транскрипцию репортерных генов (Shchennikova et al., 2004). Внутри клады SEP3 есть рано расходящийся кластер AST.SEP3, включающий MADS-гены Астровых и говорящий о вероятности второй дупликации в ранней эволюции покрытосеменных (Malcomber and Kellogg, 2005). С-мотив HQMQGWPA указывает на принадлежность CDM77 данному кластеру. Эволюция С-мотива SEP-белков индивидуализирует функцию конкретного SEP-белка. Например, ген герберы *GRCD1* (*AST.SEP3*) участвует только в развитии стаминодий женских цветков (Ruokolainen et al., 2010). Возможно, и *CDM77* имеет персональную функцию.

Высокая степень консервативности обнаруженных С-мотивов говорит об их функциональной важности. В подтверждение общего происхождения, все обнаруженные AP1/FUL- и SEP-гомологичные гены, за исключением членов *AST.SEP3*, участвуют в определении закладки меристемы цветка. Наши исследования свидетельствуют в пользу данного факта. Практически все использованные в работе MADS-гены, за исключением *CDM77*, показали свою способность инициировать переход к цветению.

#### **Влияние конститутивной экспрессии генов Астровых на развитие трансгенных растений табака поколения T1**

При анализе функциональной активности исследуемых MADS-белков Астровых мы учитывали постулат о консервативности происходящих в растениях процессов. Считается, что при экспрессии в гетерологичной системе белки сохраняют свои основные свойства, при этом гомологичные белки проявляют, в основном, одинаковое действие. Поэтому для определения функции генов тех растений, для которых нет соответствующих мутантных форм, или трансформация которых затруднена, экспрессия этих генов в

модельных растениях выходит на первый план. Одинаковые изменения в развитии трансгенных растений, вызванные гомологичными белками, указывают на сходство их функций.

Влияние экспрессии MADS-белков оценивали по срокам цветения, длине стебля, количеству листьев, цветков и плодов трансгенных растений в сравнении с нетрансгенными. Большинство исследованных линий имели достоверные отличия по этим признакам (табл. 2). Наибольшее влияние на развитие растений оказала экспрессия генов *HAM75*, *CDM111* и *HAM92*: цветение запускалось значительно раньше, чем у контрольных растений, сопровождаясь укорочением стебля и уменьшением числа листьев.

**Таблица 2.** Влияние экспрессии интегрированных MADS-генов Астровых на вегетативное развитие трансгенных растений табака поколения T1

Растения	Δср./ НСР <sub>05</sub> , дни до цветения	Δср./ НСР <sub>05</sub> , шт. листья	Δср./ НСР <sub>05</sub> , см стебель	Δср./ НСР <sub>05</sub> , см междоузлие
HAM75-16	34,7/7,4	16,3/3,7	60,65/13,7	-0,5/0,6
HAM75-2	32,8/7,4	8,7/3,7	44,33/13,7	0,3/0,6
HAM75-1	29,7/7,4	9,6/3,7	51,63/13,7	0,6/0,6
CDM111-5	24,4/7,4	8,6/3,7	31,4/13,7	-0,4/0,6
HAM92-12	15,9/5,12	7,4/7	29,7/18,2	0,1/0,5
HAM92-20	12,1/5,12	4,8/7	28,5/18,2	0,3/0,5
HAM92-16	1,5/15,8	2,4/5,6	28,9/15,1	0,7/0,6
HAM92-3	24,1/7,4	6,5/3,7	29/13,7	0,1/0,6
CDM8-5	27,7/5,4	16/2,4	32,6/12,4	-1,4/0,4
CDM8-1	14,4/5,4	7,8/2,4	23,4/12,4	-0,2/0,4
CDM8-2	6,8/5,4	7,6/2,4	7,2/12,4	0,1/0,4
CDM41-12	19,9/5,4	16,2/2,4	36,7/12,4	-1,3/0,4
CDM44-2	20,3/7,4	1,5/3,7	-0,8/13,7	-0,3/0,6
CDM44-1	8,1/7,4	0,2/3,7	-7,8/13,7	-0,3/0,6
CDM77-2	0,3/7,4	-2,6/3,7	3,85/13,7	0,6/0,6
CDM77-1	-2,4/7,4	-1,3/3,7	-2,14/13,7	0,1/0,6
HAM75-4	3,7/7,4	-11,6/3,7	-13,65/13,7	0,8/0,6
HAM75-8	4,7/7,4	-10,4/3,7	-16,1/13,7	0,7/0,6

Примечание: Δср.=Хср.к.-Хср.тр., где Хср.тр. - средняя 10 трансгенных растений, Хср.к. - средняя 10 контрольных растений; НСР<sub>05</sub> - наименьшая существенная разность.

Растения 35S::*HAM75* зацвели в среднем на 32 дня раньше контрольных, формировали на 11 листьев меньше и были короче на 52,2 см. Растения 35S::*CDM111* цвели раньше контроля в среднем на 24 дня, имели на 9 листьев меньше и были короче на 31,4 см. Растения HAM92-12 и HAM92-20 цвели раньше контроля в среднем на 14 дней и были короче на 29 см, число листьев не менялось. Растения HAM92-16 при таких же вегетативных характеристиках зацвели одновременно с контролем. Тогда как растения

линии NAM92-3 (расщепление 15:1, предполагаемая двухлокусная интеграция трансгена) зацветали раньше контрольных в среднем на 24 дня, образуя на 7 листьев меньше и на 29 см короче стебель. Закономерностей в изменении длины междоузлий у трансгенных растений не выявлено (табл. 2). В растениях NAM75-16 и NAM75-2, несмотря на укороченный стебель, средняя длина междоузлий не менялась. В NAM75-1 и NAM92-16 укорачивались и стебель, и междоузлия. Толщина стебля трансгенных растений сильно не отличалась от контроля, за исключением линий с сильно измененными сроками инициации цветения (табл. 3). Нарушений морфогенеза цветков не наблюдалось, но их количество увеличилось. В растениях NAM75-1 и NAM75-2 было в среднем на 40 цветков и плодов больше, чем в контроле, за счёт дополнительных цветоносов (табл. 3).

Таблица 3. Влияние конститутивной экспрессии MADS-генов Астровых на толщину стебля, количество цветков и плодов растений табака поколения T1

Растения	Δср./НСР <sub>05</sub> , см окружность основания стебля	Δср./НСР <sub>05</sub> , см окружность середины стебля	Δср./НСР <sub>05</sub> , см окр. стебля у соцветия	Δср./НСР <sub>05</sub> , шт. цветки, шт.	Δср./НСР <sub>05</sub> , шт. плоды, шт.
NAM75-16	1,0/0,4	0,5/0,4	0,5/0,4	-14,4/14,7	-7,5/36,5
NAM75-2	0,5/0,4	0,1/0,4	-0,5/0,4	-31,4/14,7	-37,1/36,5
NAM75-1	0,4/0,4	0,2/0,4	0,2/0,4	-17,9/14,7	-41,9/36,5
NAM75-4	-0,1/0,4	-0,6/0,4	-0,6/0,4	0,3/14,7	-34,2/36,5
NAM75-8	-0,1/0,4	-0,4/0,4	-0,4/0,4	5,5/14,7	-14,1/36,5
CDM111-5	0,7/0,4	-0,2/0,4	-0,2/0,4	-14,6/14,7	-33,9/36,5
NAM92-12	0,4/0,4	0,2/0,3	0,3/0,2	-39/16,7	-9,9/15,7
NAM92-20	0,13/0,4	-0,1/0,3	0,1/0,2	-24,1/16,7	-13,2/15,7
NAM92-16	0,4/0,26	0,2/0,2	0,1/0,2	-3,6/14,6	-0,7/7,41
NAM92-3	0,6/0,4	0,1/0,4	-0,1/0,4	-11,7/14,7	-41,6/36,5
CDM8-5	0,7/0,3	0,2/0,3	0,3/0,3	-2,2/12,4	0,4/12,9
CDM8-1	0,1/0,3	0,1/0,3	0,3/0,3	-3,8/12,4	-2,3/12,9
CDM8-2	0,2/0,3	-0,1/0,3	0,1/0,3	-1,3/12,4	5,3/12,9
CDM41-12	0,7/0,3	0,1/0,3	0,7/0,3	-21,6/12,4	-19,1/12,9
CDM44-2	-0,1/0,4	-0,3/0,4	-0,3/0,4	-11,8/14,7	-41,9/36,5
CDM44-1	-0,8/0,4	-0,8/0,4	-0,4/0,4	-20/14,7	-18,8/36,5
CDM77-2	-0,5/0,4	-0,6/0,4	-0,4/0,4	-19,6/14,7	-36,9/36,5
CDM77-1	-0,5/0,4	-0,5/0,4	-0,4/0,4	-11,2/14,7	-23,8/36,5

Примечание: Δср.=Хср.к.-Хср.тр., где Хср.тр. – средняя 10 трансгенных растений, Хср.к. – средняя 10 контрольных растений.

Описанные изменения развития трансгенных растений похожи на эффект от эктопической экспрессии гена *API* в *A. thaliana*, приводящей к раннему цветению, уменьшению числа розеточных листьев, укорочению стебля, конверсии меристемы соцветия в цветковые меристемы и формированию терминального сложного цветка (Mandel et al., 1995). Механизм такого воздействия включает преждевременное подавление транскрипции генов

репрессоров цветения *SVP*, *AGL24*, *SOC1* и *TFL1* с последующей активацией *LFY* и генов идентичности цветковых органов (*AP2*, *AP3* и *SEP3*) (Kaufmann et al., 2010). Аналогичное влияние оказывала эктопическая экспрессия генов *CDM111* и *HAM75* в *A. thaliana* (Shchennikova et al., 2004; Шульга О.А., не опубликовано). Однако, конститутивная экспрессия в табаке генов *VpMADS3* и *PEAM4*, гомологичных *AP1*, только ускоряла цветение, не меняя соцветие (Verbel et al., 2001; Elo et al., 2001). Поскольку анализируемые MADS-белки Астровых ближе к *VpMADS3* и *PEAM4*, чем к *AP1* (рис. 3), а табак и Астровые являются растениями одного порядка Астроцветные, это может объяснить разное воздействие генов на развитие модельных растений. Мы считаем, что *CDM111*, *HAM92* и *HAM75* являются функциональными гомологами *AP1*, но у Астровых определяют только идентичность цветковой меристемы.

Линии *HAM75-4* и *HAM75-8*, где не было синтеза мРНК гена *HAM75*, цвели практически одновременно с контролем, но были выше его в среднем на 15 см, имели на 11 листьев больше, толще стебель и короче междоузлия, что говорит об удлинении вегетативной фазы. Похожий фенотип описан для трансгенных растений *Arabidopsis* с конститутивной экспрессией гена *TFL1* (Hanzawa et al., 2005), которые цвели позже растений дикого типа, формировали больше розеточных и стеблевых листьев, а также имели боковые побеги 2-го порядка без стеблевых листьев. Известно, что инактивированными могут быть не только трансгены, но и гены самого растения, гомологичные трансгену, что получило название косупрессии (Vaucheret and Fagard, 2001). Вероятно, в линиях *HAM75-4* и *HAM75-8* произошло частичное замалчивание генов табака, гомологичных трансгену, что усилило экспрессию табачного гена, гомологичного *TFL1*. Это еще одно свидетельство роли *HAM75* в определении закладки цветковой меристемы.

Конститутивная экспрессия генов *CDM8* и *CDM41*, гомологичных *FUL*, также вызывала раннее цветение трансгенных растений табака (табл. 2): в среднем на 16 и 20 дней раньше контроля с образованием на 9 и 16 листьев меньше. У большинства линий укорачивался стебель, удлинялись междоузлия (табл. 2), а толщина стебля не отличалась от контроля (табл. 3). Линии *35S::CDM41* имели больше цветков и плодов, чем контроль (табл. 3).

Согласно литературе, повсеместная экспрессия гена *FUL* и гомологичных ему *MADSB* и *DEFH28* в *A. thaliana* вызывала раннее цветение и отсутствие раскрытия стручков (Fertández et al., 2000; Müller et al., 2001; Liljegren et al., 2004; Chandler et al., 2005). Конститутивная экспрессия *FUL* в *Brassica napus* не влияла на время цветения, но сохраняла устойчивость стручков к растрескиванию (Ostergaard et al., 2006). Эктопическая экспрессия *VpMADS5*, *MdMADS2* и *NiFUL* вызывала только раннее цветение *A. thaliana* (Sung et al.

1999; Elo et al. 2001; Smykal et al. 2007), а конститутивная экспрессия *GSQUA2* в гербере меняла вегетативную морфологию и время цветения (Ruokolainen et al., 2010). Наши исследования подтверждают функциональное сходство CDM8 и CDM41 с FUL и сохранение белком CDM41 свойств белка-предшественника AP1/FUL, что отразилось в увеличении плодовитости трансгенных растений, как и в случае конститутивной экспрессии AP1-гомологов Астровых.

MADS-факторы транскрипции SEP1, 2, 3 и 4 в комбинации с другими MADS белками участвуют в дифференцировке всех органов цветка *A.thaliana* (Honma et al., 2001; Kaufmann et al., 2009). Конститутивная экспрессия *SEP3* и гомологичного ему *FBP2* в *A.thaliana* вызывает раннее цветение, укорочение стебля, снижение числа розеточных листьев и трансформацию боковых побегов и главного цветonoса в терминальный сложный цветок (Pelaz et al., 2001; Fettario et al., 2004). Повсеместная экспрессия *NsMADS3* приводила к очень раннему зацветанию растений табака (Jang et al., 1999). Для конститутивной экспрессии *CDM44* и *CDM77* мы наблюдали разный эффект (табл. 2, 3). Ген *CDM44* инициировал цветение растений раньше контроля в среднем на 14 дней, не меняя количество листьев и длину стебля. Экспрессия *CDM77* не влияла на время цветения. Экспрессия обоих генов повышала урожайность.

#### Трансгенные растения табака 35S::HAM75 поколений T2 и T3

При создании трансгенных растений в коммерческих целях одним из необходимых условий является стабильный уровень экспрессии перенесенных генов в поколениях. Для изучения был выбран ген *HAM75*, как наиболее перспективный кандидат для биотехнологии растений с измененными сроками цветения. Его влияние на развитие трансгенных растений в поколениях наблюдали на линии HAM75-1 и ее потомках: гомозиготных линиях HAM75-1/6 и HAM75-1/7 и гетерозиготной HAM75-1/3 (табл. 4). Растения цвели раньше контроля в среднем на 30 дней. Гомозиготные линии имели на 24 листа меньше и были короче контроля на 90 см, а гетерозиготная дала на 26 листьев меньше и была короче контроля на 66 см (табл. 5). Основание и середина стебля растений были тоньше контроля (табл. 6). Гомозиготные растения формировали в среднем на 33 цветка и 25 плодов больше контроля, в то время как растения гетерозиготной линии не отличалась от контроля по количеству цветков и плодов.

Наступление фазы цветения в растениях поколения T3 (гомозиготная линия HAM75-1/3/1 и гетерозиготная – HAM75-1/3/5) ускорялось, причем в гомозиготной линии эффект был сильнее (табл. 5, 6). Растения HAM75-1/3/1 цвели раньше контроля в среднем на 36 дней, образуя на 31 лист меньше и больше цветков и плодов. Растения HAM75-1/3/5 цвели раньше контроля на 30 дней, образуя на 27 листьев меньше и цветков и плодов больше на 25 и 24

соответственно. Основание и середина стебля всех растений были тоньше контроля, сами растения имели от 1 до 4 продуктивных боковых побегов. Изучение потомков линии *HAM75-1* показало, что ген *HAM75* стабильно наследовался в трех поколениях трансгенных растений с сохранением влияния на время цветения. Гомозиготное состояние *HAM75* усиливало это влияние, при этом повышалось количество образуемых плодов.

Таблица 4. Расщепление трансгенной линии *HAM75-1* в поколениях T2 и T3

Растения	Км <sup>8</sup> , шт.	Км <sup>9</sup> , шт.	взошли, шт.	H <sub>0</sub>	χ <sup>2</sup> факт.	χ <sup>2</sup> теор.
<i>HAM75-1/1</i> (T2)	297	0	297	—	—	—
<i>HAM75-1/2</i> (T2)	299	0	299	—	—	—
<i>HAM75-1/3</i> (T2)	230	72	300	3:1	0,20	3,84
<i>HAM75-1/4</i> (T2)	300	0	300	—	—	—
<i>HAM75-1/5</i> (T2)	220	80	300	3:1	0,42	3,84
<i>HAM75-1/6</i> (T2)	300	0	300	—	—	—
<i>HAM75-1/7</i> (T2)	300	0	300	—	—	—
<i>HAM75-1/8</i> (T2)	239	61	300	3:1	3,43	3,84
<i>HAM75-1/9</i> (T2)	215	85	300	3:1	1,77	3,84
<i>HAM75-1/10</i> (T2)	220	75	295	3:1	0,01	3,84
<i>HAM75-1/3/1</i> (T3)	300	0	300	—	—	—
<i>HAM75-1/3/2</i> (T3)	222	77	299	3:1	0,08	3,84
<i>HAM75-1/3/3</i> (T3)	297	0	297	—	—	—
<i>HAM75-1/3/4</i> (T3)	300	0	300	—	—	—
<i>HAM75-1/3/5</i> (T3)	225	75	300	3:1	0	3,84
<i>HAM75-1/3/6</i> (T3)	220	80	300	3:1	0,4	3,84
<i>HAM75-1/3/7</i> (T3)	298	0	298	—	—	—
<i>HAM75-1/3/8</i> (T3)	300	0	300	—	—	—
<i>HAM75-1/3/9</i> (T3)	217	83	300	3:1	1,2	3,84
<i>HAM75-1/3/10</i> (T3)	295	0	295	—	—	—

Таблица 5. Вегетативное развитие растений 35S:: *HAM75* поколений T2 и T3

Растения	Δср./НСР <sub>05</sub> , дни до цветения	Δср./НСР <sub>05</sub> , шт. листья	Δср./НСР <sub>05</sub> , см длина побега	Δср./НСР <sub>05</sub> , см длина междоузлия
<i>HAM75-1</i> (T1)	29,7/7,4	9,6/3,7	51,63/13,7	0,6/0,6
<i>HAM75-1/6*</i> (T2)	29,5/8,71	23,2/2,3	84/9,9	-0,6/0,5
<i>HAM75-1/7*</i> (T2)	30,1/8,71	23,9/2,3	93,9/9,9	-0,1/0,5
<i>HAM75-1/3**</i> (T2)	29,5/7,9	26,1/10,5	66,33/34,7	-1,2/4,0
<i>HAM75-135**</i> (T3)	30/3,9	26,6/3,2	81,8/20,9	-0,5/0,6
<i>HAM75-131*</i> (T3)	36,1/3,9	30,7/3,2	90,8/20,9	-0,93/0,6

Таблица 6. Толщина побега и урожайность T2- и T3-поколений 35S::*HAM75*

Растения	Δср./НСР <sub>05</sub> , см окружность стебля у основания	Δср./НСР <sub>05</sub> , см окружность стебля в середине	Δср./НСР <sub>05</sub> , см окружность стебля у соцветия	Δср./НСР <sub>05</sub> цветки, шт	Δср./НСР <sub>05</sub> плоды, шт.
HAM75-1/6* (T2)	1,5/0,3	1,0/0,28	0,1/0,2	-29,7/21	-17,6/17,4
HAM75-1/7* (T2)	1,6/0,3	1,2/0,28	0,2/0,2	-36,9/21	-32,2/17,4
HAM75-1/3** (T2)	1,4/0,5	0,6/0,6	-0,14/1,2	27/37,8	12/35,9
HAM75-1/3/5** (T3)	1,03/0,3	0,8/0,4	0,3/0,3	-24,9/16,2	-23,7/14,4
HAM75- 1/3/1* (T3)	1,35/0,3	1,2/0,4	0,1/0,3	-32,9/16,2	-33,6/14,4

Примечание к таб.5, 6: Δср.=Хср.к.-Хср.тр., где Хср.тр. – средняя 10 трансгенных растений, Хср.к. – средняя 10 контролей. \* - гомозиготное состояние трансгена. \*\* - гетерозиготное состояние.

#### Предполагаемая модель действия анализируемых генов

Ускорение цветения трансгенных растений табака в ответ на конститутивную экспрессию генов *HAM75*, *HAM92*, *CDM111*, *CDM41* и *CDM8* свидетельствует о функциональной гомологии кодируемых ими факторов белкам *API/FUL*. По аналогии с моделью действия *API* можно предположить, что *CDM111*, *HAM75* и *HAM92* преждевременно подавляют транскрипцию генов репрессоров цветения табака (гомологов *SVP*, *AGL24*, *SOC1* и *TFL1*), активируют гены *NFL*, *NLAP2* и гены, гомологичные *AP3* и *SEP3*. Так же они могут функционировать в хризантеме и подсолнечнике. Белки *CDM41* и *CDM8* могут участвовать в опосредованной активации *CDM111*, развитии стебля, листьев и плода хризантемы.

Характер воздействия эктопической экспрессии *CDM44* на онтогенез растений табака предполагает, что *CDM44* контролирует мишени табачного гомолога *SEP3* аналогично поведению *SEP3* в *A. thaliana* (Kaufmann et al., 2009). То есть, преждевременно подавляет транскрипцию генов репрессоров цветения табака (гомологов *SOC1*, *AGL24* и *SVP*) и активирует гены идентичности цветковой меристемы и цветковых органов *NAPI-2*, *NAG1* и гены, гомологичные *SHP1*, *SHP2*, *AP3* и *SEP3*. Влияние *SEP3* на гормональные пути, и, как следствие, на рост цветковых органов (Kaufmann et al., 2009), делает вероятным воздействие *CDM44* на рост стебля и листьев через регуляцию скорости клеточного деления. В совокупности все приводит к ускорению цветения с сохранением длины стебля и количества листьев. Сходство сетей белковых взаимодействий *CDM44* (Shchennikova et al., 2004) и *SEP3* (Honma et al., 2001) подтверждает функциональное сходство белков.

Отсутствие эффекта от эктопической экспрессии *CDM77* можно объяснить высокой специализацией гена, обнаружить которую при гетерологичной экспрессии в растениях табака маловероятно. Учитывая структурную гомологию *CDM77* и *GRCD1* (рис. 3), а также сходство их



белковых взаимодействий (Goloveshkina et al., 2011; Ruokolainen et al., 2010), можно предположить, что CDM77 играет уникальную роль партнера С-функции, специфичную к определенному кругу и виду цветков хризантемы.

#### Возможное применение MADS-факторов Астровых в биотехнологии

Как видно из диаграммы (рис. 4), на развитие модельных растений в поколении T1 наиболее сильно повлияла экспрессия гена *HAM75*. Период от высадки до цветения этих растений по сравнению с контролем сократился на месяц, значительно уменьшились число листьев и длина стебля, а количество плодов увеличилось. Однако значительное истончение стебля в T1-растениях с сильным проявлением трансгена и в гомозиготных T2- и T3-растениях (табл. 3, б) может ограничить использование данного гена при создании скороспелых растений, для которых прочность стебля является необходимым свойством. С другой стороны, *HAM75* можно применять для ускорения процесса скрещивания в селекции древесных, где главный лимитирующий фактор – позднее цветение (Weigel and Nilsson, 1995; Flachowsky et al., 2007). Применение других генов кланды *API/FUL* (*CDM111*, *HAM92* и *CDM41*) возможно в селекции декоративных культур, так как ускорение зацветания растений при конститутивной экспрессии этих генов сопровождается сокращением количества листьев и длины стебля и увеличением количества цветков.

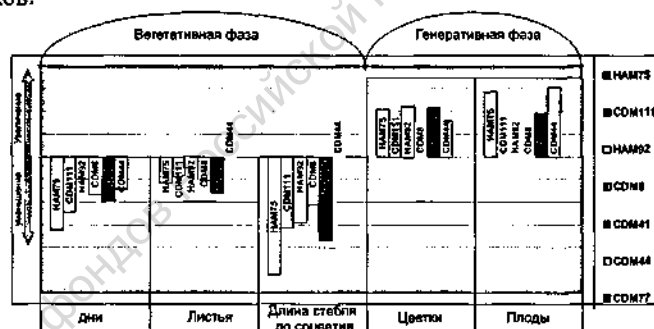


Рисунок 4. Влияние экспрессии генов MADS-факторов Астровых на развитие модельных растений табака T1

Мы показали, что экспрессия гена *CDM44* ускоряет переход к цветению не так значительно, как экспрессия других исследуемых нами генов. Тем не менее, отсутствие влияния на вегетативные органы и стимуляция генеративных (увеличение количества цветков и плодов) делает *CDM44* универсальным для создания скороспелых форм растений. Однако необходимо дополнительное

изучение возможного участия *CDM44* в гормональных путях растения, что может влиять на вкусовые качества плода.

#### Заключение

Конститутивная экспрессия генов *HAM75*, *CDM111*, *HAM92*, *CDM8*, *CDM41* и *CDM44* в гетерологичной системе ускоряет переход растений табака от вегетативной к репродуктивной стадии развития без изменения морфологии цветка. Полученные нами данные позволяют сделать заключение о ключевой роли этих генов в определении идентичности цветковой меристемы, о консервативности этого свойства среди генов, гомологичных *API/FUL* и *SEP3*, а также механизма запуска цветения в цветковых растениях разных видов. Для генов, гомологичных *API*, показана прямая зависимость силы функционального проявления от уровня их экспрессии, а для гомологов *FUL* – отсутствие влияния на развитие плода в гетерологичной системе экспрессии. Анализ факторов транскрипции хризантемы клады *SEP* показал наличие среди них функционального гомолога *SEP3* – *CDM44*, и представителя кластера *AST.SEP3* – *CDM77*, имеющего, вероятно, узкую специализацию.

Отсутствие негативного влияния на продуктивность трансгенных растений открывает возможность использования данных факторов в биотехнологии хозяйственно-ценных растений. Полученные данные подтверждают консервативность общепринятой схемы онтогенеза растений для Астровых с одновременным наличием некоторых особенностей.

#### ВЫВОДЫ

1. Получены трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* сорта *Samsun NN* с конститутивной экспрессией генов, кодирующих MADS-факторы транскрипции Астровых: *CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM77*, *CDM44*, *HAM92*, *HAM75*.
2. Конститутивная экспрессия MADS-генов *CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM44*, *HAM92* и *HAM75* ускоряет зацветание растений табака, что свидетельствует о роли данных генов в инициации цветения.
3. Продемонстрировано, что гены Астровых, гомологичные *API*, стабильно наследуются и при увеличении количества копий в геноме трансгенных растений вызывают ещё более раннее зацветание.
4. Конститутивная экспрессия MADS-генов *CDM111*, *CDM41*, *CDM8*, *CDM44*, *HAM92*, *HAM75* и *CDM77* не оказывает негативного влияния на количество формируемых цветков и плодов в трансгенных растениях табака.
5. Раннее зацветание растений с конститутивной экспрессией MADS-гена *CDM44* сопровождается ускорением роста трансгенных растений табака.

6. AP1-подобные белки Астровых (CDM111, HAM75 и HAM92) не влияют на закладку органов околоцветника трансгенных растений табака.

7. Белки Астровых, подобные FUL (CDM8, CDM41) и SEP (CDM44, CDM77), не влияют на закладку цветковых органов в трансгенных растениях табака.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Головешкина Е.Н., Шульга О.А., Щенникова А.В., Камионская А.М., академик Скрыбин К.Г. Конститутивная экспрессия генов подсолнечника и хризантемы группы *AP1/FUL* вызывает изменение сроков цветения у трансгенных растений табака. // Доклады Академии Наук, 2010, том 434, № 2, С. 275–278.

2. Goloveshkina E.N., Shchennikova A.V., Kamionskaya A.M., Skryabin K.G., Shulga O.A. Influence of ectopic expression of *Asteraceae* MADS box genes on plant ontogeny in tobacco. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. DOI 10.1007/s11240-011-0074-9.

3. Головешкина Е.Н., Камионская А.М., Щенникова А.В., Шульга О.А. Получение трансгенных растений табака с укороченной фазой вегетативного развития за счет экспрессии МАДС-факторов транскрипции // Международная научно-практическая конференция «Инновационные технологии в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур». Москва, 2006 г., С. 71-72.

4. Головешкина Е.Н., Камионская А.М., Щенникова А.В., Шульга О.А. Получение трансгенных растений *NICOTIANA TABACUM* с укороченной фазой вегетативного развития // 10-я Международная Пушкинская школа- конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пушкинского научного центра РАН. Пушкино, 2006 г., С. 364-365.

5. Головешкина Е.Н., Камионская А.М., Щенникова А.В., Шульга О.А. Получение модельных трансгенных растений табака, несущих MADS-гены хризантемы (*CDM*) и подсолнечника (*HAM*) //Международная конференция «Генетика в России и в мире». Москва, 2006 г., С. 48.

6. Головешкина Е.Н., Камионская А.М., Щенникова А.В., Шульга О.А. Получение генетически модифицированных линий овощных культур с укороченной фазой вегетативного развития. // VII Молодежная научная школа-конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва, 2007 г., С. 16-17.

7. Головешкина Е.Н., Камионская А.М., Щенникова А.В., Шульга О.А. Получение трансгенных линий овощных культур с измененными сроками цветения. // Четвертый Московский Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2007 г., С. 270.

8. Головешкина Е.Н. Получение трансгенных растений *Nicotiana tabacum* с конститутивной экспрессией гетерологичных MADS – генов // 11-я Международная Пущинская школа- конференция молодых ученых «Биология наука XXI века». Пущино, 2007 г., С. 192-193.

9. Головешкина Е.Н., Камионская А.М., Щенникова А.В., Шульга О.А. Изучение влияния эктопической экспрессии MADS-генов сложноцветных на вегетативное и генеративное развитие трансгенных растений табака. // Вторая международная Школа для молодых ученых «Эмбриология, генетика и биотехнология». Уфа, 2007 г., С. 37-39.

10. Головешкина Е.Н. Влияние эктопической экспрессии генов сложноцветных, участвующих в процессе формирования и развития соцветий, на вегетативное и генеративное развитие растений табака. // IX Международная конференция «Биология клеток растений in vitro и биотехнология». Звенигород, 2008 г., С. 98.

11. Головешкина Е.Н., Щенникова А.В., Камионская А.М., Шульга О.А. Оценка влияния конститутивной экспрессии генов-гомологов *API*, *SEPI*, *2* и *FUL* из сложноцветных на вегетативное и генеративное развитие табака. // XV Школа по биологии развития. Звенигород, 2008 г., С. 36

12. Головешкина Е.Н., Щенникова А.В., Камионская А.М., Шульга О.А. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* экспрессирующие гетерологичные MADS-гены сложноцветных с измененной длиной вегетативной фазы развития. // Международная научная школа-конференция молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях». Звенигород, 2008г., С. 17

13. Головешкина Е.Н., Щенникова А.В., Камионская А.М., Шульга О.А. Изменение сроков цветения у растений табака, экспрессирующих гены сложноцветных, участвующих в процессе формирования и развития соцветий // Пятый Московский Международный Конгресс «БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития». Москва, 2009 г., С. 314.

14. Головешкина Е.Н., Щенникова А.В., Камионская А.М., Шульга О.А. Эктопическая экспрессия MADS-генов сложноцветных вызывает преждевременное цветение у растений табака. // Всероссийская научная школа для молодежи «Горизонты нанобиотехнологии». Москва, 2009г., С. 26-28.

15. Goloveshkina E.N., Shchennikova A.V., Kamionskaya A.M., Shulga O.A. Overexpression MADS-genes of *Asteraceae* in transgenic tobacco plants // Международная конференция «Plant Gene Discovery Technologies». Вена, 2011г., С. 43.

Из фондов Российской национальной библиотеки

Из фондов Российской национальной библиотеки

---

Из фондов Российской национальной библиотеки

---

12 - 1318

2012A  
1318

Из фондов Российской национальной библиотеки

Подписано в печать 27.12.2011 г.  
Печать лазерная цифровая  
Тираж 100 экз.