Содержание

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ...5

ВВЕДЕНИЕ...6

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ...14

1.1 Получение трансгенных растений: общие сведения...14

1.2 Наследование чужеродных генов и вариабельность их экспрессии у

трансгенных растений...20

1.3 Инактивация чужеродных генов в растительном геноме...24

1.4 Молекулярно-генетические механизмы инактивации чужеродной ДНК в ядерном геноме трансгенных растений...32

1.4.1 Структура и местоположение экзогенной ДНК в растительном геноме...32

1.4.2 Замолкание экспрессии трансгена и модификация ДНК...34

1.4.3 Мутации растительных генов, влияющих на процесс инактивации экспрессии чужеродной ДНК...40

1.5 Примеры инактивации экспрессии множественных копий собственных • растительных генов...50

1.6 Инактивация экспрессии множественных копий генов у грибов-аскомицетов...52

1.7 Использование феномена инактивации экспрессии множественных копий генов для целенаправленного выключения экспрессии растительных генов...54

1.8 Стратегия предотвращения инактивации целевых генов в трансформированных растениях...56

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ...62

ф. 2.1 Получение трансгенных растений табака...62

2.2 Типы генетических конструкций...63

2.3 Гибридологический анализ трансгенных растений табака...65

3

2.4 Определение активности неомицинфосфотрансферазы II in situ...67

2.5 Флуориметрическое определение активности р-глюкуронидазы в листьях трансгенных растений табака...68

2.6 Выделение геномной ДНК из листьев табака...69

2.7 Саузерн блот гибридизация геномной ДНК трансгенных растений

табака...70

2.8 Выделение РНК из растительной ткани и точечный Нозерн блоттинг...70

2.9 Подтверждение наличия дупликаций в области инсерции Т-ДНК с помощью метода ПЦР...71

2.10 Проверка исходных трансформантов на присутствие в растительном геноме векторных последовательностей с помощью метода ПЦР...72

2.11 Элекгрофоретический анализ ДНК...73

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ...74

3.1 Стабильность экспрессии маркерного гена nptll у гибридов от скрещивания

трансгенных растений табака с одной инсерцией Т-ДНК...74

3.2 Анализ стабильности наследования гена nptll у трансгенных растений табака со

множественными инсерциями Т-ДНК...81

3.3 Моделирование влияния дупликации в структуре Т-ДНК на стабильность экспрессии маркерных генов nptll и uidA в трансгенных растениях табака...87

3.3.1 Сравнительный анализ стабильности экспрессии гена nptll в первом и втором поколениях от самоопыления трансгенных растений табака (с одной копией гена uidA и с дупликациями данного гена в составе Т-области)...87

3.3.2 Анализ активности ферментов (5-глюкуронидазы и NPTII в двух группах трансгенных растений табака (с одной копией гена uidA и прямой дупликацией данного гена)...92

3.3.3 Анализ стабильности экспрессии гена nptll у гибридов Fi от различных типов скрещиваний...98

4

3.3.4 Встраивание векторных последовательностей в растительный геном

исходных трансгенных растений табака...ПО

3.4 Мозаичный характер проявления экспрессии гена nptll в трансгенных растениях табака модельной линии Nu 21...113

ЗАКЛЮЧЕНИЕ...144

ВЫВОДЫ...148