

Д. В. Савчин¹, П. В. Кузмицкая¹, О. Ю. Урбанович¹, И. В. Федосеева², Г. Б. Боровский²

¹Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

²Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН, Иркутск, Российская Федерация

СОЗДАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *NICOTIANA TABACUM* С ГЕНОМ *NDB2 ARABIDOPSIS THALIANA* ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ОТВЕТА НА СТРЕСС

С целью изучения влияния измененного уровня экспрессии гена *ndb2* (NAD(P)H-дегидрогеназа B2, КФ 1.6.5.2) на активность других белков митохондриальной локализации и устойчивость растений к различным стрессам созданы трансгенные растения табака, экспрессирующие данный ген. Ген *ndb2* длиной 1749 п.н. выделен из суммарной матричной РНК *Arabidopsis thaliana* с помощью ОТ-ПЦР. Данный ген клонирован в плазмиду pBI121. На основе плазмиды pBI121 создана векторная конструкция pBI121_NDB2, содержащая ген *ndb2* под контролем 35S CaMV промотора. Показана эффективность pBI121_NDB2 для трансформации. Экспериментально подтверждены факты интеграции гена *ndb2* в геноме.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, *ndb2*, трансгенные растения, адаптация растений.

D. V. Sauchyn¹, P. V. Kuzmitskaya¹, O. Yu. Urbanovich¹, G. B. Borovskii², I. V. Fedoseeva²

¹Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

²Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

THE CREATION OF TRANSGENIC PLANTS *NICOTIANA TABACUM* WITH GENE *NDB2 ARABIDOPSIS THALIANA* TO STUDY RESPONSE TO STRESS

Transgenic tobacco plants that express the *ndb2* gene were obtained to study the influence of changed level of the *ndb2* gene (NAD(P)H dehydrogenase B2, EC 1.6.5.2) expression on the activity of the proteins of mitochondrial localization and stress resistance of plants. The *ndb2* gene of 1749 bp was isolated from *Arabidopsis thaliana* total messenger RNA using RT-PCR. This gene was cloned into the pBI121 plasmid. The pBI121_NDB2 vector construction containing the *ndb2* gene under the control of the 35S CaMV promoter was created on the basis of the pBI121 plasmid. The pBI121_NDB2 efficiency for transformation was demonstrated. The *ndb2* gene integration into the tobacco genome was confirmed experimentally. The tobacco lines expressing target *ndb2* gene were obtained.

Keywords: *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*, gene *ndb2*, transgenic plants, plant adaptations.

Введение. Реакция растений на стресс имеет адаптивное значение. Она может приводить к функциональной перестройке дыхательного метаболизма клетки, увеличению роли путей альтернативного транспорта электронов, изменению работы систем несопряженного и разобщенного дыхания. Одной из главных мишеней окислительного повреждения при стрессе являются митохондрии. При энергозапасующем окислении NADH митохондриями функционирует комплекс I дыхательной цепи, который является одной из точек генерации мембранного потенциала. В клетках растений, в отличие от клеток животных, функционируют альтернативные (второго типа, или NDII) внешние и внутренние NAD(P)H дегидрогеназы, которые поставляют восстановительные эквиваленты в дыхательную цепь, минуя комплекс I. У растений арабидопсиса обнаружены три группы таких NAD(P)H-дегидрогеназ: NDA (два гена), NDB (четыре гена) и NDC (один ген) [1]. Белки NDB1-NDB4 являются внешними и обращены на внешнюю сторону внутренней митохондриальной мембраны. Белки NDA1, NDA2 и NDC1 обращены на внутреннюю сторону митохондриальной мембраны [2]. Точные физиологические функции конкретных белков семейства NDII не определены. Считается, что последние вместе с альтернативной оксидазой (АОХ) участвуют в формировании нефосфорилирующей дыхательной цепи при окислительном стрессе и метаболическом дисбалансе. Поскольку активация альтернативных NAD(P)H-дегидрогеназ на внутренней митохондриальной мембране не способствует образованию потенциала на участке до убихинона, а также снижает степень восстановления комплекса I, одного из предполагаемых источников генерации активных форм кислорода (АФК) у растений, предполагается,

что роль внешних и внутренних NAD(P)H-дегидрогеназ заключается в подавлении генерации АФК [3]. В то же время, несмотря на то что экспрессия альтернативных дегидрогеназ при действии самых различных стрессовых воздействий повышается [4–6], экспериментальных подтверждений этого положения в случае с растениями недостаточно. Поскольку альтернативные NAD(P)H-дегидрогеназы растений содержат в качестве кофактора ФАД (флавинодениндинуклеотид), многие исследователи не исключают, что последние могут быть потенциальными сайтами генерации АФК у растений [3, 7].

В результате экспериментов по снижению уровня синтеза белка NDB4 с помощью RNAi выявлено значительное увеличение синтеза белков NDB2 и AOX1a, что привело к уменьшению образования АФК клетками, увеличению солеустойчивости, а также к некоторым изменениям в скорости развития и фенотипе растений [8]. Кроме того, показано участие «внешней» NADH-дегидрогеназы и некоторых других белков в развитии морозоустойчивости проростков озимой пшеницы [9, 10].

Особый интерес представляет изучение влияния измененного уровня экспрессии гена *ndb2* («внешней» нефосфорилирующей NADH-дегидрогеназы) на устойчивость клеток и растений к различным стрессам, а также влияния уровня экспрессии *ndb2* на экспрессию и активность работы других NDII, AOX и белков митохондриальной локализации. Предполагается, что у растений с измененным уровнем экспрессии *ndb2* изменен и уровень АФК, а соответственно, защитная система клетки работает в ином режиме.

Изменить экспрессию генов белков митохондриальной локализации, в частности *ndb2*, можно с помощью методов генетической инженерии. Создание трансгенных растений с гетерологичным геном *ndb2* позволит изучить влияние данного гена и роль АФК в развитии устойчивости растений к абиотическим и биотическим стрессам, а также механизмы адаптации растений. Предполагается, что изменение количества АФК влияет на функционирование митохондрий, экспрессию стрессовых генов, реализацию программы стресс-сигналинга и адаптации. Изучение данного процесса позволит предложить стратегию получения новых высокоустойчивых форм растений.

Цель данного исследования – создание векторной конструкции для трансформации, несущей ген «внешней» нефосфорилирующей NADH-дегидрогеназы (*ndb2*) из *Arabidopsis thaliana*, и получение генетически модифицированных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующих указанный ген.

Материалы и методы исследования. В качестве источника для клонирования нативного гена *ndb2* использованы растения *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia). В экспериментах по трансформации использована линия табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SRI*.

Выделение мРНК и синтез кДНК выполняли с помощью наборов GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit и RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, EU). Клонирование гена *ndb2* проводили с помощью ПЦР, используя *Pfu*-полимеразы и синтетические олигонуклеотиды NDB2-F и NDB2-R, представленные в таблице.

При создании векторных конструкций использовали методики ПЦР, рестрикции и лигирования фрагментов ДНК, выполненные по стандартным протоколам [14, 15] или с применением коммерческих наборов реагентов (Thermo Fisher Scientific, Qiagen).

Векторная конструкция для трансформации растений получена на основе вектора pBI121 [16], который эффективно используется для этих целей [17, 18]. Предварительно в данный вектор были введены дополнительные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I, что позволяло клонировать целевой ген между конститутивным промотором 35S РНК CaMV и терминатором нопалин-синтазы *nos*.

Корректность сборки векторных конструкций подтверждали методом NGS секвенирования на приборе Illumina MiSeq, используя набор Nextera XT DNA. Анализ данных NGS выполняли с помощью программ FastQC, Trimmomatic, SPAdes, UGENE, Vector NTI.

Для стабильной интеграции гена *ndb2* в геном растений *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SRI* использовали агробактериальный штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0. Трансформацию растений табака проводили методом сокультивации растительных эксплантов с агробактерией [19]. Для отбора первичных регенерантов использовали питательные среды CIM, SIM и T-med с селективирующим агентом канамицином в концентрации 50 мг/л.

**Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов,
использованных при создании векторной конструкции и анализе трансгенных растений**

**Sequence and temperature annealing of synthetic oligonucleotides
using to create a vector design and analysis of transgenic plants**

Название олигонуклеотида	Последовательность 5'-3'	Температура отжига, °С	Источник литературы
NDB2-F	ATGAGAAATTTTCAGTGTCTTC	48	Данная статья
NDB2-R	TCAGATGCTACTGGAATCTCT	48	Данная статья
NDB2-BamHI-F	ATGAGCTCGGATCCAACAATGGTTAGAAATTTTCAGTGTCTTCGAGAGATT	48	Данная статья
NDB2-KpnI-R	GAGCTCGGTACCTTAGATGCTACTGGAATCTCTACCAAAGAT	48	Данная статья
35SEF	CATCATTGCGATAAAGGAAAGGC	53	[11]
35SER	TGCTTTGAAGACGTGGTTGGA	53	[11]
Tnos-F	CATGTAATGCATGACGTTATTTATG	53	[12]
Tnos-R	GCTATATTTTGTCTTCTATCGCGTAT	53	[12]
QtRNALeuF	CGAAATCGGTAGACGCTACG	55	[13]
QtRNALeuR	TTCCATTGAGTCTCTGCACCT	55	[13]

Выделение растительной ДНК выполняли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Анализ регенерантов осуществляли методами ПЦР и ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией), используя синтетические олигонуклеотиды, представленные в таблице.

Результаты и их обсуждение. Подбор специфичных олигонуклеотидов к 5'- и 3'-концевым участкам гена *ndb2* проводили на основе нуклеотидной последовательности NM_116741.3, размещенной в базе данных NCBI [20]. Поскольку нативный ген *ndb2* содержит интроны, для клонирования его кодирующей последовательности использовали ОТ-ПЦР суммарной матричной РНК. Источником РНК служили листья и цветы растений *Arabidopsis thaliana*. В результате амплификации кДНК, синтезированной из мРНК листьев и цветов, с олигонуклеотидами NDB2-F и NDB2-R получен фрагмент ДНК размером 1749 п. н., что соответствует ожидаемому размеру целевой последовательности нативного гена *ndb2*.

Известно, что состав нуклеотидной последовательности гена влияет на эффективность его трансляции и количество синтезируемого белка [21]. Анализ нуклеотидной последовательности нативного гена *ndb2* выявил наличие на N-концевом участке кодона AGA, кодирующего дестабилизирующую аминокислоту аргинин. Наличие данной аминокислоты на N-концевом участке приводит к быстрому разрушению транслируемого белкового продукта [22]. Определено неоптимальное окружение стартового кодона, что также отрицательно влияет на эффективность экспрессии гетерологичного гена. Для повышения эффективности экспрессии последнего важно наличие нуклеотида А в положении -3 и нуклеотида G в положении +4 [23]. В связи с обозначенными фактами проведена модификация 5'-концевого участка последовательности нативного гена *ndb2* – добавлена последовательность Козак ААСА перед стартовым кодоном и кодон GGT, кодирующий стабилизирующую аминокислоту валин, после. Стоп-кодон TGA заменен на более предпочтительный для растений TAA. С целью обеспечения возможности клонирования модифицированной последовательности гена *ndb2* в вектор, с 5'- и 3'-концов введены дополнительные сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I. Подобранные олигонуклеотиды NDB2-BamHI-F и NDB2-KpnI-R (см. таблицу) использованы для проведения ПЦР с последовательностью клонированного ранее нативного гена *ndb2* в качестве матрицы. Данный этап позволил провести модификацию 5'- и 3'-концевых участков гена *ndb2* и добавить сайты узнавания требуемых эндонуклеаз рестрикции. Полученная последовательность гена *ndb2* перенесена в модифицированный вектор pBI121 по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Kpn*I. Созданный вектор получил название pBI121_NDB2 (рис. 1). Оценка корректности сборки векторной конструкции проведена с помощью метода секвенирования. Сравнительный анализ целевой нуклеотидной

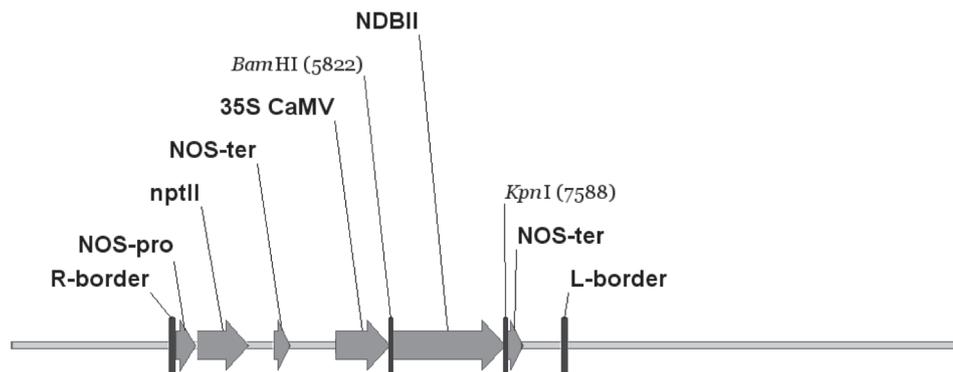


Рис. 1. Схема векторной конструкции pBI121_NDB2: R-border, L-border – правый и левый концевые повторы области Т-ДНК; NOS-pro – промотор нопалин-синтазы; *nptII* – ген неомицинфосфотрансферазы II типа; NOS-ter – терминатор нопалин-синтазы; 35S CaMV – 35S РНК CaMV промотор; *NDBII* – ген «внешней» нефосфорилирующей НАДФ-Н дегидрогеназы; *Bam*HI, *Kpn*I – сайты узнавания эндонуклеазами рестрикции

Fig. 1. Scheme pBI121_NDB2 vector construct: R-border, L-border – left and right terminal repeats of T-DNA region; NOS-pro – nopaline synthase promoter; *nptII* – neomycin phosphotransferase gene II type; NOS-ter – the terminator of the nopaline synthase; 35S CaMV – 35S RNA promoter of CaMV; *NDBII* – gene “external” non-phosphorylating NADP-H dehydrogenase; *Bam*HI, *Kpn*I – recognition sites for restriction endonucleases

последовательности векторной конструкции и референсной последовательности показал их полное соответствие и отсутствие нуклеотидных замен.

Выбор вектора pBI121 для переноса гетерологичного гена *ndb2* в растительный геном обусловлен рядом факторов. Данный вектор содержит LB и RB концевые повторы области Т-ДНК, по которым происходит интеграция области Т-ДНК в геном растений. Это делает его наиболее подходящим для проведения агробактериальной трансформации широкого ряда модельных и культурных растений с высокой эффективностью. Промотор 35S РНК CaMV обеспечивает конститутивную экспрессию гетерологичного гена во всех тканях растения, что должно привести к повышению общего содержания целевого фермента – «внешней» нефосфорилирующей NADH дегидрогеназы. Наличие гена *nptII* под контролем NOS-промотора обеспечивает устойчивость к антибиотику канамицину, что позволит проводить первичный отбор регенерантов на селективной питательной среде.

Создание и отбор трансгенных растений табака с геном ndb2. Для трансформации растений табака *Nicotiana tabacum* cv. *Petit Havana SR1* использована целевая векторная конструкция pBI121_NDB2, несущая ген *ndb2*, и исходный вектор pBI121 в качестве контроля. Рекомбинантные штаммы с векторными конструкциями pBI121_NDB2 и pBI121 получены на основе агробактериального штамма *A. tumefaciens* AGL0 методом трехродительского скрещивания. Отбор агробактериального клона с целевой векторной конструкцией проводили на питательной среде LB с добавлением селективирующих агентов канамицина и рифампицина. Наличие целевой векторной конструкции в агробактериальном штамме подтверждено методом ПЦР со специфичными праймерами. Полученные штаммы использованы затем в экспериментах по агробактериальной трансформации растений.

В результате эксперимента по агробактериальной трансформации растений табака вектором pBI121_NDB2 из каллусной культуры получено 57 регенерантов. При достижении размера 2–3 см регенеранты срезали с каллуса и переносили на среды с селективирующим агентом для укоренения. В процессе культивирования 28 регенерантов (49,1 % от общего количества полученных) образовывали корни и развивались на средах с селективным агентом канамицином. Отобранные регенеранты использовали для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

В результате контрольной трансформации с исходным вектором pBI121 из каллусной культуры получено 32 регенеранта, 18 (56,3 %) из которых укоренились на селективной среде с канамицином. Кроме того, в качестве контрольных получены регенеранты растений исходного сорта, которые прошли все этапы трансформации, исключая сокультивирование с агробактериями.

Регенеранты нетрансформированных контрольных растений и растения исходного сорта не образовывали корни на селективной среде и погибали.

Образование у регенерантов корней на средах с канамицином может свидетельствовать об интеграции в их геном целевой гетерологичной последовательности и экспрессии гена *nptII*. Однако это не позволяет считать их истинными трансгенными растениями, поскольку устойчивость к антибиотику может развиваться в результате соматической изменчивости или по иным причинам [24]. Для подтверждения интеграции гетерологичной вставки необходимо проведение молекулярно-генетического анализа.

Молекулярно-генетический анализ трансгенных растений с геном ndb2. Для молекулярно-генетического анализа использована ДНК отобранных первичных регенерантов. Наличие гетерологичной инсерции определяли методом ПЦР.

Первоначально для оценки качества выделенной ДНК регенерантов проводили ПЦР с олигонуклеотидами QtRNA_{LeuF} и QtRNA_{LeuR} (см. таблицу), специфичными к растительному гену, кодирующему лейциновую тРНК. Амплификация целевого фрагмента размером 192 п. н. свидетельствует о наличии необходимого количества и качества растительной ДНК для проведения ПЦР с олигонуклеотидами, специфичными к последовательности гетерологичной инсерции.

Для детекции последовательности промотора 35S РНК CaMV проведена ПЦР с олигонуклеотидами 35SEF и 35SER (см. таблицу). Амплификация фрагмента размером 125 п. н. свидетельствует о присутствии данной последовательности в исследуемой ДНК.

Для определения целостности перенесенной кассеты, несущей промотор 35S РНК CaMV, целевой ген *ndb2* и NOS-терминатор, проведена ПЦР с олигонуклеотидами 35SEF и Tnos-R (см. таблицу). Амплификация фрагмента размером 2234 п. н. подтверждает интеграцию гетерологичной ДНК в геном растений табака.

Таким образом, в результате проведенного молекулярно-генетического анализа установлено, что агробактериальная трансформация листовых эксплантов векторной конструкцией pBI121_NDB2 приводит к переносу целевой последовательности, несущей ген *ndb2* под контролем промотора 35S РНК CaMV, в геном растений табака.

Следует отметить, что наличие чужеродного гена в растительном геноме не означает, что гетерологичный ген будет функционировать или обеспечивать синтез белка в необходимом количестве. На эффективность экспрессии гена, кроме его нуклеотидного состава и регуляторных элементов, значительное влияние оказывает место интеграции Т-ДНК области в геном растений. В частности, интеграция гетерологичного гена в область гетерохроматина может привести к замолчанию трансгена. Кроме того, в процессе развития растений возможно изменение уровня экспрессии трансгена или полная инактивация гетерологичного гена [25, 26].

С целью подтверждения экспрессии гетерологичного гена в растениях проведена ОТ-ПЦР суммарной мРНК трансформантов. Полученную кДНК использовали при постановке ПЦР со специфичными олигонуклеотидами к гену *ndb2*. Присутствие целевого амплифицированного фрагмента подтверждает факт экспрессии гетерологичного гена в растительной ткани (рис. 2).



Рис. 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов (2234 п. н.), выявленных при амплификации кДНК регенерантов табака. М – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1–4 и 6–9 – анализируемые линии; 5 и 10 – исходные растения табака; 11 – плазмида pBI121_NDB2

Fig. 2. Electrophoregram PCR product (2234 bp) was identified by the amplification of cDNA of tobacco regenerants. M – molecular weight marker GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific); 1–4 and 6–9 – line analyzed; 5 and 10 – basic tobacco plants; 11 – plasmid pBI121_NDB2

Заклучение. Проведено клонирование и анализ нуклеотидной последовательности нативного гена *ndb2 Arabidopsis thaliana*, выполнена модификация его 5'- и 3'-концов с целью повышения уровня синтеза целевого белкового продукта. Создана векторная конструкция pBI121_NDB2, несущая ген *ndb2* под контролем промотора 35S РНК CaMV.

Показано, что перенос T-ДНК векторных конструкций pBI121_NDB2 и pBI121 приводит к формированию устойчивости к антибиотику канамицину и позволяет проводить селективный отбор первичных трансформантов растений. Установлено, что созданная векторная конструкция pBI121_NDB2 осуществляет перенос гетерологичной вставки в растительный геном и приводит к экспрессии целевого гена.

Дальнейший анализ созданных трансгенных растений позволит выявить влияние экспрессии гена *ndb2* на внутриклеточное содержание АФК, а также возможные изменения активности путей электронного транспорта митохондрий, генерацию ими мембранного потенциала, активность других альтернативных ферментов дыхательной цепи и цитохромного пути электронного транспорта. Не исключено влияние измененной экспрессии *ndb2* на экспрессию стрессовых генов и реализацию программы стресс-сигналинга и адаптации, а также на возможность повышения устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам.

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов БРФФИ Б16Р-050 и РФФИ № 16-54-00070.

Acknowledgement

The work was supported by grants of Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research B16R-050 and Russian Foundation for Basic Research no. 16-54-00070.

Список использованных источников

1. *Arabidopsis* genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light / A. M. Michalecka [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – Vol. 133. – P. 642–652.
2. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants / A. H. Millar [et al.] // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2011. – Vol. 62. – P. 79–104.
3. Moller, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species / I. M. Moller // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 2001. – Vol. 52. – P. 561–591.
4. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana* / R. Clifton [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – Vol. 58. – P. 193–212.
5. The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress / C. J. Baxter [et al.] // *Plant Physiol.* – 2007. – Vol. 143. – P. 312–325.
6. Yoshida, K. Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves / K. Yoshida, K. Noguchi // *Plant Cell Physiol.* – 2009. – Vol. 50. – P. 1449–1462.
7. The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress / S. Amirsadeghi [et al.] // *Physiol. Plant.* – 2007. – Vol. 129. – P. 253–266.
8. Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport / S. Wallström [et al.] // *Plant & Cell Physiol.* – 2014. – Vol. 55, N 5. – P. 881–896.
9. Митохондриальные энергорассеивающие системы (альтернативная оксидаза, разобщающие белки и «внешняя» NADH-дегидрогеназа) вовлечены в развитие морозостойкости проростков озимой пшеницы / О. И. Грабельных [и др.] // *Биохимия.* – 2014. – Т. 79, № 6. – С. 645–660.
10. Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress / C. Smith [et al.] // *Plant Cell Phys.* – 2011. – Vol. 52. – P. 1222–1237.
11. Development and validation of a 48-target analytical method for high-throughput monitoring of genetically modified organisms / Li Xiaofei [et al.] // *Sci. reports.* – 2015. – Vol. 5. – P. 1–11.
12. Collaborative study of a T-nos Real-Time PCR method for screening of genetically modified organisms in food products / R. Reiting [et al.] // *J. Verbr. Lebensm.* – 2007. – Vol. 2. – P. 116–121.
13. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA / P. Taberlet [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1991. – Vol. 17. – P. 1105–1109.
14. Sambrook, J. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook, D. W. Russell. – New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001. – 2344 p.
15. Current protocols in molecular biology / F. M. Ausubel [et al.]. – New York: Greene Pub. Assoc. and Wiley-Interscience, 2004. – 561 p.
16. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants / P.-Y. Chen [et al.] // *Mol. Breeding.* – 2003. – Vol. 11, N 4. – P. 287–293.
17. Картель, Н. А. Генетические основы селекции растений: в 4 т. Т. 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия / Н. А. Картель; науч. ред.: А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск: Беларус. навука, 2014. – 653 с.
18. Савчин, Д. В. Создание и анализ трансгенных растений картофеля и табака с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д. В. Савчин, А. С. Панюш, Н. А. Картель // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2012. – № 4. – С. 16–19.

19. Савчин, Д. В. Генетическая трансформация растений векторными конструкциями с геном *gox Penicillium funiculosum* / Д. В. Савчин, А. С. Панюш, Н. А. Картель // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2011. – Т. 12. – С. 49–55.
20. *Arabidopsis thaliana* gene NDB2 [Электронный ресурс] / NCBI. – 2016. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=ara&q=NDB2>. – Дата доступа: 25.10.2015.
21. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes / F. J. Perlak [et al.] // Proc. of the Nat. Acad. of Sciences of USA. – 1991. – Vol. 88, N 8. – P. 3324–3328.
22. Graciet E. Structure and evolutionary conservation of N-end rule pathway / E. Graciet, F. Mesiti and F. Wellmer // The Plant J. – 2010. – Vol. 61. – P. 741–751.
23. Kozak, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes / M. Kozak // Cell. – 1986. – Vol. 44. – P. 283–292.
24. Маренкова, Т. В. Мозаичный характер экспрессии трансгенов у растений / Т. В. Маренкова, Д. Б. Логинова, Е. В. Дейнеко // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 293–306.
25. Matzke, M. A. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates / M. A. Matzke, M. F. Mette, A. J. Matzke // Plant Mol. Biol. – 2000. – Vol. 43, N 2/3. – P. 401–415.
26. Дейнеко, Е. В. Изучение экспрессии гетерологичных и собственных генов у трансгенных растений: на примере *Nicotiana tabacum* L.: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.15 – кинетика и катализ / Е. В. Дейнеко. – Новосибирск, 2004. – 198 с.

References

1. Michalecka, A. M., Svensson, A. S., Johansson, F. I., Agius, S. C., Johanson, U., Brennicke, A., Binder, S. and Rasmusson, A. G. (2003), “Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light”, *Plant Physiology*, vol. 133, pp. 642–652.
2. Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L. and Day, D. A. (2011) “Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants”, *Annual Reviews Plant Biology*, vol. 62, pp. 79–104.
3. Moller, I. M. (2001), “Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species”, *Annual Reviews Plant Biology*, vol. 52, pp. 561–591.
4. Clifton, R., Lister, R., Parker, K. L., Sappl, P. G., Elhafez, D., Millar, A. H., Day, D. A. and Whelan, J. (2005), “Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in *Arabidopsis thaliana*”, *Plant Molecular Biology*, vol. 58, pp. 193–212.
5. Baxter, C. J., Redestig, H., Schauer, N., Rebers, D., Patil, K. R., Nielsen, J., Selbig, J., Liu, J., Fernie, A. R. and Sweetlove, L. J. (2007), “The metabolic response of heterotrophic *Arabidopsis* cells to oxidative stress”, *Plant Physiology*, vol. 143, pp. 312–325.
6. Yoshida, K. and Noguchi, K. (2009), “Differential gene expression profiles of the mitochondrial respiratory components in illuminated *Arabidopsis* leaves”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 50, pp. 1449–1462.
7. Amirsadeghi, S., Robson, C. A. and Vanlerberghe, G. C. (2007), “The role of the mitochondrion in plant responses to biotic stress”, *Physiologia Plantarum*, vol. 129, pp. 253–266.
8. Wallstrom, S. V., Florez-Sarasa, I., Araujo, W. L., Escobar, M. A., Geisler, D. A., Aidemark, M., Lager, I., Fernie, A. R., Ribas-Carbo, M. and Rasmusson A. G. (2014), “Suppression of NDA-type alternative mitochondrial NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis thaliana* modifies growth and metabolism, but not high light stimulation of mitochondrial electron transport”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 55, pp. 881–896.
9. Grabelnych, O. I., Borovik, O. A., Tauson, E. L., Pobezhimova, T. P., Katyshev, A. I., Pavlovskaya, N. S., Koroleva, N. A., Lyubushkina, I. V., Borovskii, G. B., Voinikov, V. K., Bashmakov, V. Yu. and Popov, V. N. (2014), “Mitochondrial energy-dissipating systems (alternative oxidase, uncoupling proteins, and external NADH dehydrogenase) are involved in development of frost-resistance of winter wheat seedlings”, *Biokhimiya* [Biochemistry], vol. 79, pp. 645–660.
10. Smith, C., Barther, M., Melino, V., Smith, P., Day, D. and Soole, K. (2001), “Alterations in the mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenase NDB4 lead to changes in mitochondrial electron transport chain composition, plant growth and response to oxidative stress”, *Plant and Cell Physiology*, vol. 52, pp. 1222–1237.
11. Li, X., Wu, Y., Li, J., Li, Y., Long, L., Li, F. and Wu, G. (2015), “Development and validation of a 48-target analytical method for high-throughput monitoring of genetically modified organisms”, *Scientific reports*, vol. 5, pp. 1–11.
12. Reiting, R., Broll, H., Waiblinger, H.-U. and Grohmann, L. (2007), “Collaborative Study of a T-nos Real-Time PCR Method for Screening of Genetically Modified Organisms in Food Products”, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, vol. 2, pp. 116–121.
13. Taberlet, P., Girelly, L., Pautou, G. and Bouvet, J. (1991), “Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA”, *Plant Molecular Biology*, vol. 17, pp. 1105–1109.
14. Sambrook, J. (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, US.
15. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. and Struhl, K. (2004), *Current protocols in molecular biology*, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience John Wiley and Sons, New York, US.
16. Chen, P. Y., Wang, C. K., Soong, S. C. and To, K. Y. (2003), “Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants”, *Molecular Breeding*, vol. 11, no. 4, pp. 287–293.

17. Kartel, N. A. *Geneticheskie osnovy seleksii rastenii. Tom 4. Biotekhnologiya v seleksii rastenii. Genomika i geneticheskaya inzheneriya* [Genetic basis of plant breeding: Biotechnology in plant breeding. Vol. 4. Genomics and genetic engineering], Belaruskaya navuka, Minsk, BY.
18. Sauchyn, D. V., Panush, A. S. and Kartel, N. A. (2012), “Transgenic potato and tobacco plants with *gox* gene of *Penicillium funiculosum* development and analysis”, *Vesti Natsyyanalnai Akademii Navuk Belarusi, Ser. Biyal. Navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, biological series], no. 4, pp. 16–19.
19. Sauchyn, D. V., Panush, A. S. and Kartel, N. A. (2011), “Genetic transformation of plants using vector constructions with *Penicillium funiculosum* GOX gene”, *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and Applied Genetics: collection of scientific works], Pravo i ekonomika, Minsk, BY, vol. 12, pp. 49–55.
20. NCBI (2016), *Arabidopsis thaliana* gene *NDB2*, Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=ara&q=NDB2> (Accessed 25.10.2015).
21. Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L. and Fischhoff, D. A. (1991), “Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 8, pp. 3324–3328.
22. Graciet, E., Mesiti, F. and Wellmer, F. (2010), “Structure and evolutionary conservation of N-end rule pathway”, *The Plant Journal*, vol. 61, pp. 741–751.
23. Kozak, M. (1986), “Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes”, *Cell*, vol. 44, pp. 283–292.
24. Marenkova, T. V., Loginova, D. B. and Deineko, E. V. (2012), “Mosaic patterns of transgene expression in plants”, *Genetika* [Genetics], vol. 48, no. 3, pp. 293–306.
25. Matzke, M. A., Mette, M. F. and Matzke, A. J. (2000), “Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates”, *Plant Molecular Biology*, vol. 43, no. 2/3, pp. 401–415.
26. Deineko, E. V. (2004) “Study of the expression of heterologous genes and their own transgenic plants: for example, *Nicotiana tabacum* L.”, Ph. D. Thesis, Kinetics and Catalysis, Institut tsitologii i genetiki Sibirskogo otdeleniya Rossiikoi akademii nauk, Novosibirsk, RU.

Информация об авторах

Савчин Дмитрий Васильевич – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: sauchyndzmitry@gmail.com

Кузмицкая Полина Викторовна – науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: 1401polina@gmail.com

Урбанович Оксана Юрьевна – д-р биол. наук, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Федосеева Ирина Владимировна – канд. биол. наук, науч. сотрудник. Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН (ул. Лермонтова, 132, 664033, г. Иркутск, Российская Федерация)

Боровский Геннадий Борисович – д-р биол. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения РАН (ул. Лермонтова, 132, 664033, г. Иркутск, Российская Федерация). E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

Для цитирования

Создание трансгенных растений *Nicotiana tabacum* с геном *ndb2 Arabidopsis thaliana* для изучения ответа на стресс / Д. В. Савчин [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. біял. навук. – 2017. – № 1. – С. 54–61.

Information about the authors

Sauchyn Dzmitry Vasilievich – Ph. D. (Biol.), Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sauchyndzmitry@gmail.com

Kuzmitskaya Polina Viktorovna – Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: 1401polina@gmail.com

Urbanovich Oksana Yurevna – D. Sc. (Biol.), the Head of the laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Science of Belarus (27, Akademicheskaya Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Fedoseeva Irina Vladimirovna – Ph. D. (Biol.), Researcher. Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (132, Lermontov Str., 664033, Irkutsk, Russian Federation)

Borovskiy Genadiy Borisovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Chief researcher. Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (132, Ler-montov Str., 664033, Irkutsk, Russian Federation). E-mail: borovskii@sifibr.irk.ru

For citation

Sauchyn, D. V., Kuzmitskaya, P. V., Urbanovich, O. Yu., Borovskii, G. B. and Fedoseeva, I. V. (2017), “The creation of transgenic plants *Nicotiana tabacum* with gene *ndb2 Arabidopsis thaliana* to study response to stress”, *Proceedings of the National Academy of Science of Belarus, biological series*, 2017, no. 1, pp. 54–61.