

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

*На правах рукописи*

ПАВЛОВА Ольга Андреевна

**НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ *LINARIA DALMATICA*  
(L.) P. MILL, ПРИОБРЕТЕННЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ  
ГОРИЗОНТАЛЬНОГО ПЕРЕНОСА.**

03.02.07 Генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ  
2013

Работа выполнена в Санкт-Петербургском Государственном университете на кафедре генетики и биотехнологии в лаборатории геномной и клеточной инженерии растений

Научный руководитель: ..... доктор биологических наук,  
профессор Лутова Людмила Алексеевна

Официальные оппоненты: ..... доктор биологических наук,  
заведующий лабораторией Борисов Алексей Юрьевич,  
Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский  
институт сельскохозяйственной микробиологии РАСХН

..... доктор биологических наук,  
профессор Ермилова Елена Викторовна,  
Санкт-Петербургский государственный университет

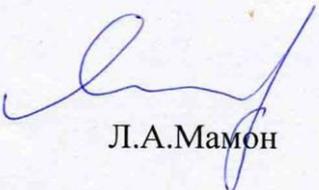
Ведущая организация: ..... Государственное научное  
учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений  
РАСХН.

Защита состоится ”\_\_”\_\_\_\_\_2013 г. в \_\_\_\_ часов на заседании совета  
Д.212.232.12 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Санкт-  
Петербургском Государственном университете по адресу: 199034 Санкт-  
Петербург, Университетская наб. 7/9, СПбГУ, биолого-почвенный факультет,  
кафедра генетики и биотехнологии, аудитория 1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. М. Горького  
Санкт-Петербургского Государственного университета.

Автореферат разослан ”\_\_”\_\_\_\_\_2013 г.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета  
Доктор биологических наук



Л.А.Мамон

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время вопросы эволюционного происхождения и родства организмов становятся все более актуальными. Установление вертикальных связей (от родителей к потомкам) не представляется сложным. Однако, помимо вертикальных связей существуют еще и горизонтальные (латеральные). Горизонтальный перенос генов (ГПГ) – явление передачи генетической информации между организмами, которые не соотносятся как родитель и потомок. Способностью к латеральной передаче обладают многие организмы, например: бактерии, вирусы и некоторые виды грибов. Активный перенос генов может происходить в симбиотических, паразитарных или ассоциативных системах, где осуществляется физический контакт клеток. У прокариотов латеральный обмен широко распространен и является одним из механизмов комбинативной изменчивости. В царстве эукариотов в силу более сложной организации генетического аппарата горизонтальные переносы редки. ГПГ может происходить как между близкородственными, так и между филогенетически отдалёнными видами, например, между агробактериями и высшими растениями.

Агробактерии способны передавать и встраивать в геном растительной клетки фрагмент своей плазмиды. Передаваемый участок называется Т-ДНК (от англ. «transferred DNA») и клТДНК (клеточная Т-ДНК) – Т-ДНК в составе генома растения. Агробактерии являются патогенными по отношению к растениям, и в природе в зависимости от штамма вызывают заболевания «корончатый галл» или «бородатый корень». За развитие заболевания отвечают гены, входящие в состав переносимой Т-ДНК. Опухоли (корончатый галл или бородачатые корни) формируются на прикорневой шейке растения. Важно отметить, что в природе агроинфекция не приводит к закреплению Т-ДНК и к ее передаче половому потомству. Однако, было показано, что в геномах некоторых видов растений родов *Nicotiana* и *Linaria*, не подвергавшихся агроинфекции, содержатся последовательности, гомологичные Т-ДНК *Agrobacterium rhizogenes*. (White et al., 1983, Matveeva et al., 2012). Было показано, что актов трансформации в эволюции рода *Nicotiana* было несколько (Suzuki et al., 2002). Последовательности, входящие в состав клТ-ДНК *Nicotiana glauca* и *Linaria vulgaris*, детально изучены, определено, что у данных видов Т-ДНК организована в виде повтора из двух копий и содержит гомологичные гены синтеза опинов. Некоторые из генов в составе клТ-ДНК *Nicotiana glauca* функционально активны (Aoki, Syono, 1994, Meyer A. et al., 1995). У нескольких исследованных видов *Nicotiana* и *L. vulgaris* наиболее консервативным является ген *rolC* (Intrieri, Vuiatti, 2001; Suzuki et al., 2002, Matveeva et al., 2012). Эти факты говорят о том, что при становлении данных родов происходили неоднократные акты агротрансформации, и агробактериальные последовательности закрепились в геномах и были подхвачены в ходе эволюции. Изучение клТ-ДНК в геноме растений представляет собой фундаментальный интерес, поскольку поможет понять не только некоторые аспекты растительно-микробного взаимодействия, но и выяснить происхождение отдельных генов, организмов или видов, а также понять общие закономерности совместного эволюционирования организмов.

С практической точки зрения изучение горизонтального переноса генов между агробактериями и растениями также представляет несомненный интерес. Факт обнаружение новых примеров ГПГ (т.е. «природно-трансгенных» организмов) может быть востребован в качестве контраргумента при критике генно-модифицированных культур, используемых в современном сельском хозяйстве, медицине, ветеринарии.

**Степень разработанности проблемы.** До недавнего времени примеры горизонтального переноса генов между агробактериями и высшими растениями были известны для некоторых видов *Nicotiana* и для *Linaria vulgaris*. Последовательности клТ-ДНК детально изучены. Для части генов клТ-ДНК у видов *Nicotiana* показана экспрессия. Выявлено, что в эволюции рода *Nicotiana* было несколько независимых актов интеграций Т-ДНК. В пределах рода *Linaria* распространенность данного явления

еще не изучена. Представленное исследование посвящено изучению последовательности клТ-ДНК у вида *L. dalmatica*.

**Цель и задачи работы.** Целью работы является – изучение агробактериальных нуклеотидных последовательностей, обнаруженных у *Linaria dalmatica* (L.) P. Mill. В работе были поставлены следующие задачи:

1. Характеристика нуклеотидных последовательностей (*rol*-генов и гена опин-синтазы), в составе вставки клТ-ДНК *L. dalmatica*.
2. Создание генетических конструкций с геном *LdrolC* для последующего изучения его функции.
3. Определение структуры вставки клТ-ДНК у *L. dalmatica*.
4. Идентификация точки инсерции клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica*.
5. Поиск новых примеров горизонтального переноса в природе между агробактериями и высшими растениями.

**Научная новизна диссертационной работы.** В ходе выполнения работы впервые были описаны полноразмерные последовательности генов, входящих в клТ-ДНК *L. dalmatica*: гены, гомологичные *rol*-генам *Agrobacterium rhizogenes* и гену микимопин-синтазы. Идентифицирована точка интеграции клТ-ДНК в геном растения. Определена структура вставки. Проведен массовый скрининг видов двудольных растений на наличие Т-ДНК-подобных последовательностей. Созданы генетические конструкции для изучения функций гена *LdrolC*.

**Теоретическая и практическая ценность.** Показано, что в эволюции растений горизонтальный перенос генов протекал неоднократно. Установлено, что у разных видов район интеграции совпадает. Этот факт указывает на то, что акт переноса Т-ДНК эволюционно более раннее событие, чем расхождение видов. В составе клТ-ДНК выявлены консервативные последовательности, дошедшие до наших дней без изменений, что может указывать на их значимость для растения. Полученные в работе генетические конструкции для трансформации растений могут быть использованы на практике широким кругом исследователей.

Результаты данной работы могут быть использованы в материалах курсов лекций «Генетика развития растений», «Симбиогенетика», «Экологическая генетика», читаемых на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ. Методические подходы, примененные в работе, могут быть использованы в курсе инструментального практикума по «Генной инженерии».

**Основные положения, выносимые на защиту.** Для вновь описанного примера горизонтального переноса генов между агробактериями и растениям у *L. dalmatica* изучены нуклеотидные последовательности генов, входящих в Т-ДНК: *LdrolC*, *LdrolB*, *LdORF13-1*, *LdORF13-2*, *LdORF14* и *Ldmis*. Показано, что вставка клТ-ДНК организована в виде прямого повтора. Определен район интеграции клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica*, который имеет сходство с *Ty3-gypsy-like* транспозоном и соответствует месту интеграции у вида *L. vulgaris*.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Степень достоверности результатов высокая. По результатам работы были сделаны сообщения на российских и зарубежных конференциях: 33rd Annual International Crown Gall (*Agrobacterium*) Conference, December 1-2, 2012, Hiram, Ohio, USA., II(X) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге 11 – 16 ноября 2012 года., «Достижения и перспективы развития биотехнологии» г. Саранск, 3-5 октября 2012 г., XVIII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB) Book of Abstracts 4-9 July 2010 Valencia, Spain, Adaptation to Climate Change in the Baltic Sea Region: Contributions from Plant and Microbial Biotechnology July 12-17, 2010 Mikkeli, Finland., "III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов "Симбиоз - Россия 2010", Нижний Новгород, 24-29 мая 2010г. The International Conference "Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology, Novosibirsk, June 7-

10, 2010, Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина, 5 съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, Москва, 21-28 июня 2009 г., Пятый Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва, 16-20 марта 2009 г., V Съезд Общества Биотехнологов России. Москва, 2-4 декабря 2008 г., Международная научная школа-конференция молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях», Москва, 8-12 декабря 2008 г., 12-я Международная Пушинская школа-конференция для молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 10-14 ноября 2008 г., The international scientific conference «S.P.Kostychev and modern agricultural microbiology» Yalta, Ukraine, October 8-12, 2007, 11-ая Международная Пушинская школа-конференция для молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пушкино, 29 октября - 2 ноября 2007 г., «Современная биотехнология – защите окружающей среды», Пушкино, 11-13 сентября 2006 г., Пушкино, Международная конференция «Генетика в России и мире», посвященная 40-летию Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, 28 июня - 2 июля 2006 г., 10-я Пушинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пушинского научного РАН, Пушкино, 17-21 апреля 2006, 4-й съезд общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Пушкино, 6-7 декабря 2006 г.

По результатам работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых журналах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

### 1.1 Растительный материал.

*Linaria dalmatica* (L.) P. Mill, семена были приобретены в компании «Secret Seeds» (Великобритания). Вегетативный материал *L. dalmatica* собран на территории Краснодарского края с индивидуальных растений. Вегетативный материал 90 видов двудольных растений собран на территории Ленинградской области и Краснодарского края. Семена *Nicotiana tabacum* L. были любезно предоставлены Институтом табака и махорки и табачных изделий г. Краснодара. Асептические растения *Linaria vulgaris* предоставлены Матвеевой Т.В.

### 1.2. Бактериальный материал.

Культуры *Agrobacterium rhizogenes* *Agrobacterium tumefaciens* (штамм 8196, штамм C58 из коллекции Freie Universität Berlin, Берлин, Германия) были любезно предоставлены проф. Т. Schmulling

Культура *Agrobacterium tumefaciens* (штамм EHA105 из коллекции University of Washington, Сиэтл, США) была любезно предоставлена проф. E. Nester.

Компетентные клетки *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

### 1.3. Вектора.

pJET 1.2 («Thermo Fisher Scientific, Inc.», Уолтем, США), pENTR-D/ТОРО («Life Technologies», США), pB7WG2D,1 (VIB, UGent, Бельгия)

### 1.4. Питательные среды.

Растения культивировали на среде Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Среда Лурия-Бертрани (LB) (Sambrook, Russell, 2001) использовалась для культивирования бактерий. Антибиотики для отбора трансформантов: ампициллин («Синтез», Россия) для селекции бактерий, содержащих вектор pJET1.2, канамицин («Синтез», Россия) и спектиномицин («Sigma», США) для селекции бактерий, содержащих вектор pENTR-D/ТОРО.

2. Молекулярно-биологические процедуры. Для выделения ДНК использовали стандартные методики Деллапорта (Dellaporta, et al., 1983), Мюррея (Murray, Thompson, 1980), Дрейпера (Дрейпер и др., 1991). Метод ПЦР в реальном времени применяли для оценки качества растительной ДНК (моноплекс) и для выявления последовательностей, гомологичных агробактериальным генам *rolB*, *rolC*, ORF13, ORF14, *tms1* и *tmr* (*ipt*)

(мультиплекс). Классический вариант ПЦР использовали для наработки полноразмерных ампликонов генов, установления точки интеграции клТ-ДНК и определения структуры вставки клТ-ДНК в растительный геном у *L. dalmatica*. Результаты классических вариантов ПЦР визуализировали посредством электрофоретического разделения в агарозной матрице. Для последующего секвенирования фрагменты клонировали при помощи набора “Clone JET™ CloningKit” (“Fermentas”, США). Полученной генетической конструкцией трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* DH5a. Фрагменты *LdrolCreal* и *LdrolCstrong* клонировали в вектор pENTR-D/TOPO с последующим переклонированием в вектор pB7WG2D,1 с помощью фермента LR-клоназы (Invitrogen, США). Полученными конструкциями был трансформирован штамм ЕНА105 *A. tumefaciens*. Анализ последовательностей ДНК проводили с помощью автоматического секвенатора АBiPrizm™ 310 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation, США)

3. Интернет-ресурсы, используемые в работе. База данных BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/> и алгоритм Clustal W <http://align.genome.jp/>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Ранее нашей исследовательской группой было показано при помощи ПЦР в режиме реального времени наличие последовательностей, гомологичных агробактериальным *rolB*, *rolC*, ORF13, ORF14 и гену микинопин-синтазы (*mis*) в геноме вида *L. dalmatica*. Этот вид льнянки был использован в нашей работе для характеристики Т-ДНК.

Из вегетативного материала *L. dalmatica* и *L. vulgaris* была выделена ДНК, ее пригодность для дальнейших работ оценена методом ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров и зонда к референсному гену *gadph*. (рис. 1).

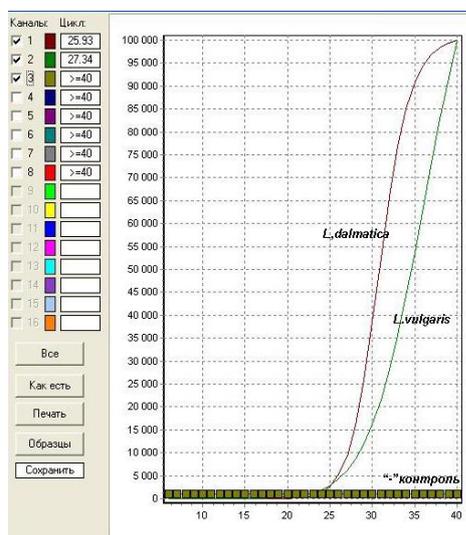


Рис. № 1. Рост флуоресценции при прохождении реакции с праймерами к гену *gadph* на разных матрицах: *L. dalmatica* – *Linaria dalmatica* (L.) P. Mill. *L. vulgaris* – *Linaria vulgaris* (L.) «-» контроль – негативный контроль (в реакционной смеси вместо матрицы - вода).

Кинетика флуоресценции, имеющая на графике форму сигмовидной кривой, свидетельствует о прохождении реакции с исследуемой матрицей. Ген *gadph*, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу. Прохождение реакции с праймерами к этому гену говорит о том, что качество матрицы пригодно для дальнейшего анализа, с ее использованием могут быть амплифицированы другие уникальные последовательности.

### 1. Характеристика нуклеотидных последовательностей клТ-ДНК *L. dalmatica*.

Поскольку в ранних исследованиях при проведении ПЦР в режиме реального времени использовались праймеры, ограничивающие консервативные участки генов клТ-ДНК, а не всю длину гена, то для характеристики последовательностей нами были наработаны полноразмерные фрагменты каждого из генов. Для получения полноразмерных ампликонов нами были сконструированы праймеры, фланкирующие соответствующие участки. Конструирование олигонуклеотидов проводили, опираясь на последовательность из базы данных GenBank (acc. No EU735069.2).

Полноразмерный фрагмент каждого гена был клонирован в вектор pJET («Thermo Fisher Scientific, Inc.», Уолтем, США) и секвенирован. Полученные нуклеотидные

последовательности названы *LdroI*B, *LdroI*C, два варианта последовательностей гена ORF13: *LdORF13-1* и *LdORF13-2*, *LdORF14*, *Ldmis*.

#### Ген *LdroI*B.

Ген *rolB* при агроинфекции предположительно выполняет функции вторичного мессенджера при проведении ауксинового сигнала (Moriuchi et al., 2004). Мотив *LdroI*B на 86% сходен с *rolB* *A. rhizogenes* штамма A4, на 79% сходен с *NgrolB* *N. glauca* и на 87% сходен с *LvrolB* *L. vulgaris*. Мы сравнили последовательность гена *LdroI*B с агробактериальным гомологом (рис. 2).

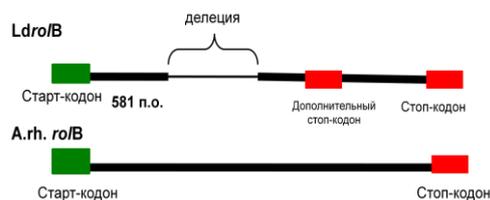


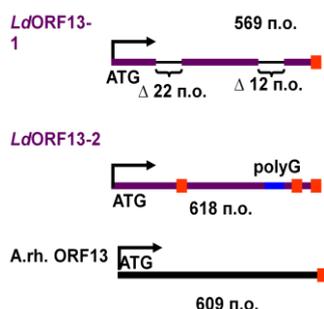
Рис. № 2. Схема сравнения генов *rolB* *A. rhizogenes* и *L. dalmatica*.

Нами установлено, что у *L. dalmatica* выявленная последовательность короче бактериального гомолога за счет протяженной делеции в проксимальной части гена. Делеция нарушает рамку считывания. В пределах последовательности *LdroI*B обнаружен дополнительный терминирующий кодон в положении 195 и множественные несинонимичные точковые замены. Данные факты позволяют предположить, что ген *LdroI*B не функционирует.

#### Гены *LdORF13-1* и *LdORF13-2*.

При трансформации растений агробактериальный ген ORF13 индуцирует экспрессию транскрипционных факторов семейства KNOX (от англ. KNOTTED1-like homeobox), тем самым запускает дедифференцировку инфицированных клеток и обеспечивает переход от фазы G<sub>1</sub> к S в клеточном цикле (Stieger, et.al., 2004).

Нами показано, что в геноме *L. dalmatica* содержится две последовательности, гомологичные гену ORF13 агробактерий: *LdORF13-1* и *LdORF13-2*. Выявленные последовательности отличаются друг от друга по протяженности и структуре. Длина *LdORF13-1* составляет 569 п.н., *LdORF13-2* – 618 п.н. В середине части *LdORF13-1* обнаружены две делеции по 22 и 11 нуклеотидов (в позициях 171 – 193 п.о. и 550-562 п.о. соответственно), а также точковые замены. Фрагмент *LdORF13-2* содержит два дополнительных стоп-кодона, прерывающих рамку считывания, в позициях 246 и 500 что, по-видимому, приводит к отсутствию функционального продукта. В пределах



последовательности *LdORF13-1* обнаружены две делеции, причем первая из них не нарушает рамки считывания, а вторая вызывает сдвиг рамки. У *LdORF13-2* выявлен polyG-тракт в той области, где у *LdORF13-1* находится вторая делеция. В *LdORF13-2* случае также, вероятно, не образуется функционального продукта. На рисунке № 3 схематично изображены последовательности генов *LdORF13-1*, *LdORF13-2* и ORF13 *A. rhizogenes*.

Рис. № 3. Схема сравнения генов ORF13 *A. rhizogenes* и *L. dalmatica*

Нуклеотидный состав *LdORF13-1* на 82 % сходен с последовательностью гомолога *N. glauca* (acc. No: AB071334) (Suzuki, 2002), и на 87% с мотивом штамма 2659 *A. rhizogenes* (acc.No: EF433766). Последовательность *LdORF13-2* на 88% идентична гену ORF13 штамма 2659 (acc.No: EF433766) и на 84% *NgORF13* *N. glauca* (acc.No: AB071334). Мы сравнили последовательности генов *LdORF13-1* и *LdORF13-2* друг с другом. Результат выравнивания двух последовательностей друг относительно друга приведен на рисунке 4. По оси ординат отложена в нуклеотидах последовательность гена *LdORF13-1*, по оси

абсцисс - *LdORF13-2*. Непрерывные части графика отражают места совпадений двух последовательностей, разрывы – места делеций и полиG-тракта (на рисунке отмечены стрелками).



Рис. № 4. Выравнивания последовательностей *LdORF13-1* и *LdORF13-2* друг относительно друга. Пояснения в тексте.

Полученные данные можно интерпретировать следующим образом: в геноме *L. dalmatica* присутствуют несколько копий клТ-ДНК и обнаруженные *LdORF13-1* и *LdORF13-2* относятся к разным копиям вставок. На данном этапе работы невозможно сказать точнее, поскольку требуется более детальный анализ структуры всей интегрированной последовательности клТ-ДНК *L. dalmatica*.

#### Ген *LdORF14*.

Биохимическая функция локуса ORF14 (478 п.н.) еще не известна. Предполагается его участие в негативной регуляции патогенеза при колонизации растения агробактерией, (Lemcke, Schmulling, 1996, Hansen, et. al., 1994) и индукция корнеобразования в культуре тканей табака и моркови при действии совместно с генами ORF13 и ORF13a (Aoki, Syono, 1999, Capone et al., 1989).

Секвенированный нами мотив гена *LdORF14* льнянки состоит из 478 нуклеотидов. Степень сходства с последовательностью агробактерий равна 88% (асс. No: M60490.1) и 83% с геном *NgORF14 N.glauca* (асс. No: AB071334.1). На рис. 5 схематично изображены гены ORF14 агробактерий и льнянки.

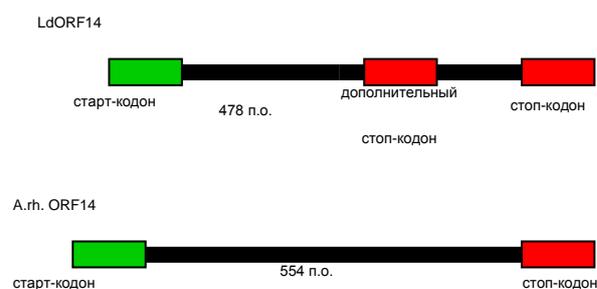


Рис. № 5. Схема сравнения последовательностей генов ORF14 *A. rhizogenes* и *L. dalmatica*.

При сравнении последовательности гена *LdORF14* с геном *ORF14 A. rhizogenes*, в изучаемом нами фрагменте обнаружен преждевременный терминирующий кодон. Данный факт указывает на то, что рамка считывания гена *LdORF14* прервана, и вероятно, ген не экспрессируется.

#### Ген *Ldmis*.

Ген *mis* кодирует микимопин-синтазу, которая контролирует образование микимопина из l-гистидина и α-кетоглутаровой кислоты (Isogai et.al., 1990). Выявленный у *L. dalmatica* участок содержит 906 п.н. Нуклеотидный состав на 82.2% сходен с последовательностью такого же гена, ранее обнаруженного в геноме *N. glauca* (acc. No: AB071335.1) (Suzuki et al., 2002), и на 82,6% с мотивом агробактериального гена (acc. No: AP002086.1) (Maeda Y, 1999). Мы сравнили структуру генов агробактериального гена *mis* и его гомолога у льнянки (рис. 6).

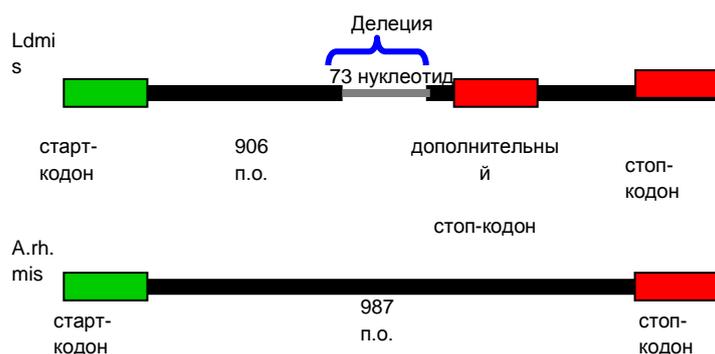


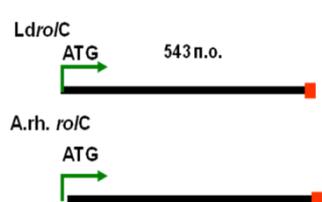
Рис. № 6 Схема сравнения последовательности генов *mis* *A. rhizogenes* и *L. dalmatica*.

В середине части исследуемого фрагмента нами обнаружена делеция протяженностью 73 п.н. Внутри рамки считывания выявлен дополнительный терминирующий кодон. Этот факт позволяет предположить, что функциональный белок не образуется. Интересно отметить, что у *L. vulgaris* и *N. glauca* последовательность этого гена не нарушена (Suzuki et al., 2002; Matveeva et al., 2012). В литературе описано, что *mis*-гомолог *N. glauca* экспрессируется и образуется функциональный продукт (328 аминокислот), который может синтезировать микимопин из предшественников (Suzuki, 2002).

#### Ген *LdrolC*.

Предполагается, что белковый продукт этого гена участвует в поддержании углеводного баланса и опосредованно может влиять на многие метаболические пути растительной клетки, в том числе на уровень свободных цитокининов (Yokoyama et al., 1994; Faiss et al., 1996; Mohajjel-Shoja et al., 2011).

Нуклеотидная последовательность *LdrolC* депонирована нами в базу данных GenBank (acc.No. KC309424). Последовательность этого гена у *L. dalmatica* на 94% сходна с *rolC A. rhizogenes*, шт. A4, на 80% - с *NgrolC N. glauca*, на 94% сходна с *LvrolC L. vulgaris*. При сравнении гена *LdrolC* с гомологичными генами у *A. rhizogenes* и *L. vulgaris*, мы установили, что открытая рамка считывания *LdrolC* не прервана преждевременными терминирующими кодонами, не несет мутаций, делеций и сдвига



рамки считывания и, по-видимому, может кодировать функциональный продукт. На рисунке № 7 схематично изображены последовательности гена *rolC* у *L. dalmatica* и *A. rhizogenes*.

Рис. № 7. Схема сравнения генов *rolC* *A. rhizogenes* и *L. dalmatica*.



похожим на штамм 1724 *A. rhizogenes* (Рис. № 9 В), поскольку данная опин-синтаза присутствует только у этого штамма (Moriguchi et al., 1998; Maeda et al., 1999).

## 2. Создание генетических конструкций для изучения функции гена *LdrolC*.

При сравнении секвенированных последовательностей генов *LdrolB*, *LdrolC*, двух вариантов последовательностей гена ORF13: *LdORF13-1* и *LdORF13-2*, *LdORF14*, *Ldmis* нами было показано, что открытая рамка считывания сохранилась не нарушенной только у гена *LdrolC*. Последовательность гена *rolC* самая консервативная в пределах Т-ДНК. Этот ген сохранился без изменений у широкого спектра видов. Данный факт может указывать на его потенциальную функциональность. Можно предположить, что этот ген мог играть ключевую роль при закреплении Т-ДНК в геномах растений, поскольку его последовательность сохранилась интактной до настоящего времени.

Для эффективной работы транскрипционного и трансляционного аппаратов клетки требуются определенные регуляторные последовательности. Одной из таких последовательностей является мотив Козак, которая в составе мРНК окружает старт-кодон (в положении -4-6 – +2). С этой последовательностью связывается фактор инициации трансляции eIF1 (Kozak, 1984). Мотив Козак высоко консервативен у каждого таксона. Для высших растений он представлен последовательностью аасаАТGgc (Lütcke et al., 1987). Старт-кодон в пределах мотива выделен заглавными буквами. Нами было установлено, что у гена *LdrolC* *L. dalmitica* регуляторная последовательность – мотив Козак отклоняется от канонической, а именно обнаружено выпадение одного нуклеотида перед иницирующим кодоном. В связи с этим, для наработки полноразмерного фрагмента гена мы сконструировали два варианта прямого праймера: «real» и «strong». В праймере «real» был использован нативный мотив Козак, в праймере «strong» - консервативный мотив. Помимо последовательности Козак в праймеры с 5'-конца был включен мотив для связывания топоизомеразы (САСС). Благодаря этому мотиву фрагмент при клонировании ориентируется определенным образом. С использованием данных праймеров мы получили два варианта полноразмерных фрагментов гена *LdrolC*. На рисунке 10 приведена схема организации ампликонов.

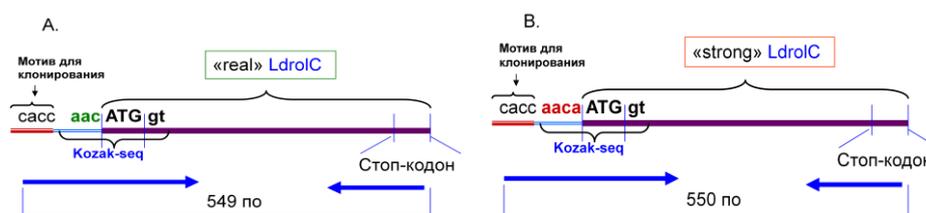


Рис. № 10. Схема организации полноразмерных фрагментов *LdrolC* А. «real», В. «strong».

Два варианта полноразмерных ампликонов были использованы для создания генетических конструкции двух типов: «real» и «strong». Сначала наработанные фрагменты были клонированы в вектор pENTR-D/ТОРО с последующим переклонированием в вектор pB7WG2D,1. Полученными конструкциями был трансформирован штамм ЕНА105 *A. tumefaciens*. В дальнейшем созданные конструкции могут быть использованы для трансформации растений для изучения функциональной роли гена *LdrolC*, а также сравнения работы этого гена в случае, если она будет регулироваться нативной или консервативной последовательностью Козак.

## 3. Определение структуры вставки клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica*.

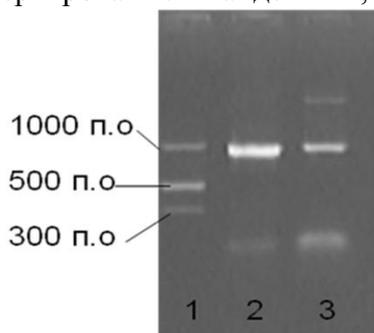
На данном этапе работы нам предстояло определить структуру вставки клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica*. Из данных литературы известно, что клТ-ДНК у разных видов может быть представлена единичной копией (*N. tabacum*), инвертированного повтора (*N. glauca*) (Suzuki et.al., 2001, 2002), в виде прямого повтора (*L. vulgaris*) (Matveeva et

al., 2012). Поскольку, вид *L. dalmatica* является близкородственным виду *L. vulgaris* Mill., что было показано на основании анализа нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров, используемых в филогении: ITS, AGT1 и rpl32-trnLUAG, trnS-trnG (Blanco-Pastor et al., 2012), мы предположили, что структура вставки клТ-ДНК *L. dalmatica* может быть схожей со структурой вставки *L. vulgaris*. Эксперимент был спланирован следующим образом. На основании последовательностей, депонированных в базу данных GenBank (асс. No EU735069.2), были сконструированы праймеры, позволяющие нарабатывать фрагмент, содержащий точку соединения двух копий клТ-ДНК. Праймеры располагались следующим образом: прямой (mis3a) гомологичен правому краю вставки и направлен наружу, а обратный (orf2) отжигается на левый край и также «смотрит» наружу. На схеме (рис. 11) праймеры обозначены стрелками.



Рис. № 11. Схема организации вставки клТ-ДНК *L. dalmatica*.

В случае организации вставки в виде тандемного повтора с использованием данных праймеров будет нарабатываться ПЦР-продукт, содержащий точку соединения вставок. Если вставка в геноме одна, или их несколько, но они организованы иначе (повтор инвертирован или тандемный, но несовершенный), то синтез ПЦР-продукта не будет.



При проведении ПЦР-анализа нами было показано, что на матрице *L. dalmatica* нарабатывается ампликон размером около 900 п.н. Размер ПЦР-продукта *L. dalmatica* соответствует таковому же у *L. vulgaris*. На рис. № 12 представлена электрофореграмма.

Рис. №12 Электрофореграмма: № 1 маркер молекулярного веса, №2 – ПЦР продукт на матрице *L. vulgaris*, №3 – ПЦР продукт на матрице *L. dalmatica*.

Нами было установлено, что у *L. dalmatica* клТ-ДНК организована в виде прямого тандемного повтора. Организация клТ-ДНК у *L. dalmatica* и у *L. vulgaris* совпадает. Схожая организация вставки может указывать на то, что привнесение и закрепление клТ-ДНК в пределах рода *Linaria* состоялось в геном общего предка для этих двух видов льнянок.

#### 4. Определение точки инсерции клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica*.

На предыдущем этапе работы нами было выявлено, что клТ-ДНК у *L. dalmatica* организована так же, как у *L. vulgaris*. Ранее нашей исследовательской группой была секвенирована область, захватывающая правую границу клТ-ДНК и растительную ДНК, примыкающую к сайту интеграции у вида *L. vulgaris* (Matveeva et al., 2012). Фрагмент растительной ДНК демонстрирует сходство с Ty3-gypsy-like транспозоном. Также было показано, что правая граница существует в двух вариантах: полноразмерном и укороченном - с делецией в приграничной части клТ-ДНК (Matveeva et al., 2012). Структура места стыковки клТ-ДНК с растительной ДНК отражена на схеме (Рис. 13). Мы решили определить точку интеграции клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica* и сравнить ее с точкой интеграции в геноме *L. vulgaris*.

На основании последовательности (асс. No EU735069.2) из базы данных GenBank, были сконструированы праймеры, позволяющие нарабатывать фрагмент, содержащий

точку соединения бактериальной и растительной последовательностей. Один из пары праймеров отжигается на клТ-ДНК (он направлен наружу), а встречный праймер гомологичен ДНК растения, расположенной справа относительно клТ-ДНК (рис. 13).

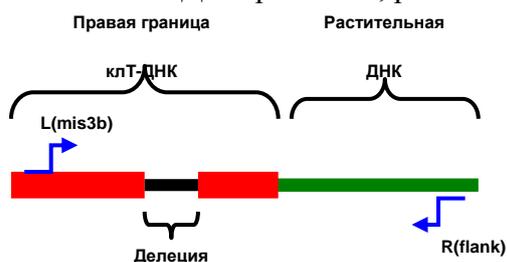
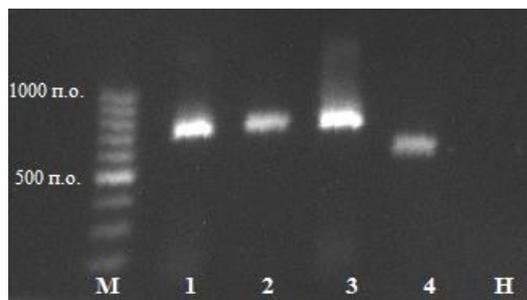


Рис. № 13. Схема расположения праймеров для детекции точки интеграции клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica*. Голубыми стрелками обозначены праймеры.

Нами был проведен ПЦР-анализ при жестких условиях с подобранными праймерами на матрицах *L. dalmatica* (различные генотипы) и на матрице *L. vulgaris* в качестве контроля. На рисунке 14 приведены результаты: образец № 1 *L. dalmatica* (семена приобретены в Великобритании), образцы № 2 и № 3 *L. dalmatica* (листовой материал собран на территории Краснодарского края с разных индивидуальных растений). Образец № 4 *L. vulgaris*. У образцов №№ 1 - 3 нарабатывается полноразмерный ампликон - делеция отсутствует, у образца № 4 ПЦР-продукт укорочен, т.к. содержит делецию.



У образцов №№ 1 - 3 нарабатывается полноразмерный ампликон - делеция отсутствует, у образца № 4 ПЦР-продукт укорочен, т.к. содержит делецию.

Рис. № 14. Электрофореграмма: «М» маркер молекулярного веса 100 bp + 1,5 kb («Сибэнзим»), № 1, № 2, № 3 – ПЦР – продукты, полученные на матрицах различных генотипы *L. dalmatica*, № 4 – ПЦР – продукт, полученный на матрице *L. vulgaris*, «Н» - негативный контроль (вместо матрицы в реакцию добавляли воду)

Целевой фрагмент клонирован в вектор pJET 1.2 и секвенирован. Анализ нуклеотидной последовательности показал, что область интеграции клТ-ДНК имеет сходство с последовательностью Ty3-gypsy-like транспозона так же, как у вида *L. vulgaris*. Последовательность области правой границы клТ-ДНК *L. dalmatica*, ограниченной используемыми праймерами, составляет 525 п.н.

Нами был описан район правой границы клТ-ДНК *L. dalmatica*. Точка интеграции клТ-ДНК *L. dalmatica* совпадает с точкой интеграции у *L. vulgaris*. Изучаемая область у исследованных образцов *L. dalmatica* не содержит делеции, т.е. представлена полноразмерным вариантом, в отличие от образца *L. vulgaris*. Т.е. у двух видов льнянок (*L. dalmatica* и *L. vulgaris*) точка интеграции клТДНК совпадает. На основании этого факта, а также того факта, что структура клТ-ДНК обеих льнянок одинакова, можно предположить, что трансформации подвергался общий предок для обоих видов и акт агротрансформации и закрепления Т-ДНК является эволюционно более древним событием, чем «расхождение» этих видов льнянок. Интересно отметить, на основании анализа последовательностей молекулярных маркеров, используемых для прояснения филогенетических отношений (ITS, AGT1 и rpl32-trnLUAG, trnS-trnG), виды *L. dalmatica* и *L. vulgaris* являются не самыми близкими друг другу, примерное время «расхождения» этих видов около 1 млн лет назад. (Blanco-Pastor et al., 2012). На рисунке 15 показано их взаимное расположение, стрелкой отмечена точка «расхождения».

Поскольку сайты интеграции клТДНК, структура вставки и последовательности консервативных участков (например, ген *rolC*) совпадают, то можно предположить, что у льнянок вставка клТДНК является монофилетичной.

В противоположность этому в работах Сузуки показано, что в эволюции рода *Nicotiana* было несколько независимых актов трансформации и закрепления клТ-ДНК. Также авторы показали, что акты трансформации были осуществлены разными штаммами агробактерий (Suzuki et al., 2002).

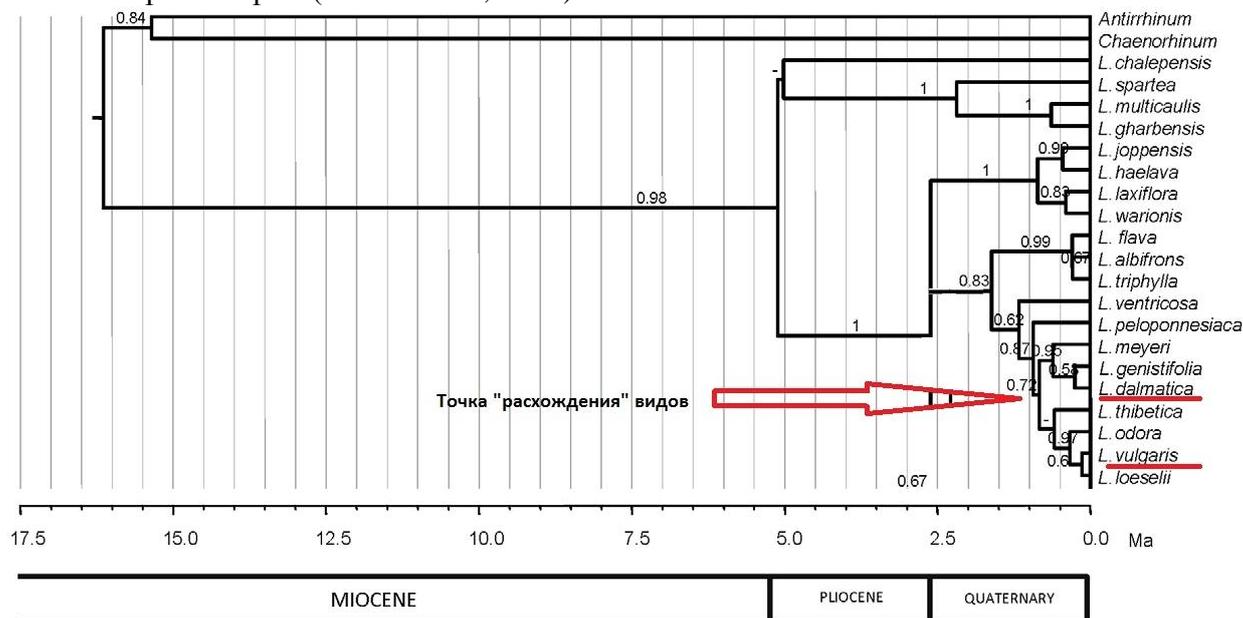


Рис. № 15. Филогенетическое древо рода *Linaria*. (модифицировано по Blanco-Pastor et al., 2012)

На сегодняшний день в литературе активно обсуждается роль агробактериальных последовательностей, привнесенных в геном растений. Кратко остановимся на гипотезах, объясняющих этот феномен. 1. «Фитормональная гипотеза». 2. «Опиновая гипотеза». 3. «Иммунная гипотеза».

Согласно «фитогормональной» гипотезе в определенный момент времени в ходе эволюции скачкообразное изменение гормонального баланса растений (связанное с захватом Т-ДНК и ее передачей в половых поколениях) привело к повышению адаптационного потенциала трансформированных растений. Такой сценарий мог разворачиваться, например, при резком изменении водного баланса или при обеднении почв, а также при переходе в другие экологические ниши. «Иммунная гипотеза» объясняет феномен закрепления Т-ДНК тем, что растение уже имеющее вставку, устойчиво к агроинфекции родственными штаммами, т.е. формируется своеобразный механизм защиты от множественной трансформации. «Опиновая гипотеза» связана не с *rol*-генами, а с геном синтеза опинов. Растение, трансформированное определенным штаммом, нарабатывает и выделяет в ризосферу определенный тип опинов. Таким способом растение может контролировать и изменять состав ризосферы, привлекая определенных бактерий и подавляя других. В данном случае можно говорить о начальных этапах симбиотического взаимодействия на генетическом уровне. Фактически, бактерия, колонизовавшая растение, сама оказывается колонизованной растением.

Вставка клТ-ДНК сыграла определенную роль в эволюции Т-ДНК-содержащих растений. Доказательством этому могут послужить некоторые факты. Показано, что клТ-ДНК закрепилась у разных родов растений (*Nicotiana* и *Linaria*) (White et al., 1983; Matveeva et al., 2012). Причем, у видов табака показано несколько независимых актов переноса (Suzuki et al., 2002). Доказательством значимости вставки является тот факт, что к настоящему времени в пределах Т-ДНК-содержащих видов не найдено индивидуумов без вставки (Matveeva et al., 2012, Павлова и др., 2012 (тезисы конференции)). Скорость накопления мутаций в последовательностях клТ-ДНК не

линейна. В этой связи доказательством может послужить открытый Матвеевой Т.В. факт присутствия тандемной вставки клТ-ДНК в геноме *L. vulgaris*. Изначально (после акта трансформации) копии Т-ДНК были идентичны (их идентичность обусловлена механизмами формирования двойных вставок – работой молекулярной машины одного из минорных путей рекомбинационной репарации). К настоящему времени мы наблюдаем дивергенцию копий Т-ДНК внутри одной тандемной вставки, причем значащие области (последовательности генов) отличаются друг от друга в значительно меньшей степени, чем межгенные пространства (Matveeva et al., 2012). Этот факт может свидетельствовать о том, что в пределах клТ-ДНК растений кодирующие последовательности подвергались отбору. В работах Сузуки с соавторами показана функциональная активность гена микимопин-синтазы в настоящее время (Suzuki et al., 2002). Наиболее консервативной последовательностью в разных родах (*Nicotiana* и *Linaria*) клТ-ДНК является последовательность гена *rolC*, наименее всего подверженная мутационным изменениям. Хотя, отсутствие активности генов клТ-ДНК в наше время не противоречит их важной роли на более ранних этапах эволюции вида растения. Таким образом, можно предположить, что последовательности клТ-ДНК уже сыграли определенную роль для растения.

##### **5. Поиск новых примеров горизонтального переноса генов между агробактериями и высшими растениями.**

К настоящему времени в литературе описаны примеры горизонтального переноса генов между агробактериями и высшими растениями в пределах рода *Nicotiana* (White et al., 1983) и в пределах рода *Linaria* (Matveeva et al., 2012). Эти два рода характеризуются обилием родов и распространенностью в местах произрастания. В этой связи нами был предпринят поиск новых примеров горизонтального переноса среди наиболее распространенных видов.

Нами были исследованы 90 видов двудольных растений на наличие в их геномах последовательностей, гомологичных агробактериальным онкогенам *rolB*, *rolC*, ORF13, ORF14 (*A. rhizogenes*), *tms1*, *tmr* (*A. tumefaciens*). Поиск проводили при помощи метода ПЦР в режиме реального времени.

При анализе образцов ни в одном нами не была зафиксирована репортерная флуоресценция, которая могла указывать на присутствие агробактериальных последовательностей в геноме растения. Данный факт свидетельствует о том, что в геномах исследованных видов не содержатся последовательности, гомологичные Т-ДНК агробактерий. Либо эти последовательности настолько сильно дивергировали, что их невозможно детектировать использованными праймерами и зондами, что видится маловероятным, поскольку праймеры и зонды были подобраны к консервативным частям генов интереса с учетом всех известных последовательностей Т-ДНК, доступных в базе данных GenBank. Для более эффективного отжига праймеров и зондов на широком спектре родственных мотивов, последовательности праймеров и зондов содержат вырожденные позиции. Данный подход был предложен в нашей лаборатории Матвеевой Т.В. (Matveeva et al., 2006). Адекватность использования праймеров и зондов с вырожденными позициями подтверждается при проведении контрольных реакций на матрице ДНК агробактерий и табака. Во всех случаях была детектирована репортерная флуоресценция.

Нами было показано, что ни один из 90 проанализированных видов двудольных растений не содержит последовательностей, гомологичных агробактериальным генам *rolB*, *rolC*, ORF13, ORF14 (*A. rhizogenes*), *tms1*, *tmr* (*A. tumefaciens*). Данный факт может свидетельствовать о низкой распространенности явления горизонтального переноса генов между агробактериями и высшими растениями.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В рамках данной работы, которая является частью большого исследования, посвященного изучению горизонтального переноса генов между агробактериями и растениями, были охарактеризованы последовательности клТ-ДНК, обнаруженных в геноме *L. dalmatica*.

Мы определили нуклеотидные последовательности генов, входящих в состав клТ-ДНК *L. dalmatica*: *LdrolB*, *LdrolC*, *LdORF13-1*, *LdORF13-2*, *LdORF14* и *Ldmis*. Анализ нуклеотидной последовательности *in silico* показал, что у генов *LdORF13-1*, *LdORF13-2*, *LdORF14*, *LdrolB* и *Ldmis* рамки считывания прерываются дополнительными стоп-кодонами, содержат делеции и точковые замены, что свидетельствует о том, что функциональные белковые продукты не могут образовываться.

Для гена *LdrolC* показано, что его рамка считывания сохранилась интактной. Данный факт может говорить о его потенциальной функциональности. Важно отметить, что ген *rolC* является самым консервативным у всех изученных видов *Nicotiana* и *Linaria*. Можно предположить, этот ген оказался одним из ключевых для закрепления Т-ДНК у растений. Мы показали, что его регуляторные мотивы (мотив Козак) отличаются от канонических. Для изучения функций этого гена (и его возможной роли) нами были созданы генетические конструкции для трансформации растений, каждая из которых несет один из вариантов гена («real» «strong») под контролем конститутивного промотора и репортерный ген зеленого флуоресцентного белка. В дальнейшем эти конструкции могут быть использованы для трансформации растений.

Мы определили структуру вставки клТ-ДНК: копий не менее двух и они организованы в виде тандемного повтора. Присутствие двух копий, по-видимому, обусловлено механизмами интеграции.

Мы установили локализацию клТ-ДНК в растительном геноме, а также показали совпадение сайтов интеграции у разных видов (*L. dalmatica* и *L. vulgaris*). Данный факт указывает на то, что клТ-ДНК была подхвачена их общим предком. В пользу этих утверждений свидетельствуют и те факты, что уровень сходства нуклеотидных последовательностей онкогенов и гена синтеза опинов выше между льнянками (*L. dalmatica* и *L. vulgaris*) и чем между льнянками и соответствующими последовательностями у табака и агробактерий.

Для оценки распространенности ГПГ между агробактериями и высшими растениями нами был проведен скрининг 90 в отношении мотивов, гомологичных генам *rolC*, *rolB*, *ORF13*, *ORF14* *A. rhizogenes* и *tms*, *tmr* (*ipt*) *A. tumefaciens*. Среди проанализированных 90 видов новых примеров ГПГ не обнаружено. Всего нашей группой проанализировано более 200 видов двудольных растений на наличие в их геномах последовательностей, гомологичных агробактериальным онкогенам и среди всех изученных только у некоторых льнянок обнаружены искомые последовательности (Matveeva et al., 2012). Явление ГПГ редко встречается в природе (помимо льнянок, известны примеры только у некоторых видов табака (White et al., 1983). Однако, не смотря на редкость, горизонтальный перенос играл (и, возможно, играет до сих пор) важную роль в эволюции растений, поскольку акты переноса зарегистрированы и встречаются у филогенетически отдаленных видов..

## ВЫВОДЫ.

1. Показано, что последовательность клТ-ДНК *L. dalmatica* содержит последовательности генов *LdrolC*, *LdrolB*, *LdORF13-1*, *LdORF13-2*, *LdORF14* и *Ldmis*.
2. Созданы генетические конструкции для изучения функции гена *LdrolC*.
3. Установлено, что вставка клТ-ДНК вида *L. dalmatica* организована в виде прямого тандемного повтора.

4. Определена точка интеграции клТ-ДНК в геноме *L. dalmatica*, район интеграции имеет сходство с Ty3-gypsy-like транспозоном и совпадает с районом интеграции у вида *L. vulgaris*.

5. Осуществлен поиск новых примеров горизонтального переноса генов между агробактериями и высшими растениями. Среди изученных в рамках работы 90 видов не выявлено новых примеров ГПГ

### Список публикаций по теме диссертации:

статьи:

1. Матвеева Т.В., **Павлова О.А.**, Иваницкий К.И., Лутова Л.А. Горизонтальный перенос генов от агробактерий к растениям рода *Nicotiana*: эволюционные предпосылки и последствия. Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3: Биология, 2009, №4. С. 58-65.
2. Матвеева Т.В., **Павлова О.А.**, Богомаз Д.И., Демкович Е.А., Лутова Л.А. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений. Экологическая генетика, 2011, Т.IX, вып.1. - С.32-43
3. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., **Pavlova O.A.**, Nester E.W., Lutova L.A. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012 Dec;25(12):1542-51.
4. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. *Rol*-гены *Agrobacterium rhizogenes*. Экологическая генетика, – 2013. – Т. XI. – Вып.1. – С. 59-68.

тезисы конференций:

1. **Павлова О.И. (Павлова О.А.)**, Пигичка Т.Ю., Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Сравнительная характеристика регенерационной способности у *Nicotiana rustica* и *Nicotiana langsdorffii*. Материалы Международной конференции «Генетика в России и мире», посвященной 400-летию Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, 2006. с. 147.
2. Пигичка Т.Ю., **Павлова О.И. (Павлова О.А.)**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Характеристика способности *Nicotiana langsdorffii* к регенерации и трансформации *in vitro*. 10-я Пущинская школа-конференция молодых ученых, посвященная 50-летию Пущинского научного РАН, сборник тезисов, Пущино, 2006. с.389.
3. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Характеристика способности к агротрансформации *Nicotiana rustica*. Материалы конференции «Современная биотехнология – защите окружающей среды», электронная публикация, Пущино, 2006.
4. Матвеева Т.В., Пигичка Т.Ю., **Павлова О.А.**, Лутова Л.А. Характеристика *Nicotiana langsdorffii* и *Nicotiana rustica* по способности к трансформации штаммами агробактерий дикого типа. Материалы четвертого съезда общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Пущино, 2006, с. 155-156.
5. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Поиск примеров горизонтального переноса генов от агробактерий к древесным формам растений. 11-я международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, сборник тезисов, Пущино, 2007, с. 212.
6. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В. Характеристика способности *Nicotiana suaveolens* к регенерации и агротрансформации *in vitro*. Сборник тезисов 12-й Международной Пущинской школы-конференции для молодых ученых «Биология – наука XXI века» 10 - 14 ноября 2008 года, Пущино, 2008. с.217
7. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Характеристика способности *Nicotiana gossei* к регенерации и агротрансформации *in vitro*. Сборник тезисов Международной научной школы-конференции молодых ученых «Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях», Москва, 8-12 декабря 2008 года.

8. Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., **Павлова О.А.** Иваницкий К.И., Лутова Л.А. Горизонтальный перенос генов от агробактерий в эволюции растений сем. *Solanaceae* и *Scrophulariaceae*. Материалы конгресса. Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития», Москва 16-20 марта 2009 г., с. 281
9. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Характеристика способности представителей рода *Linaria* к агротрансформации. Сборник тезисов Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина, 5 съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, часть I, Москва, 21-28 июня 2009 г., с. 553.
10. Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., **Павлова О.А.**, Иваницкий К.И. Горизонтальный перенос генов от агробактерий к растениям: экологический аспект. Сборник тезисов Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина, 5 съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, часть II, Москва, 21-28 июня 2009 г., с. 213.
11. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Характеристика представителей рода *Nicotiana* по способностям к регенерации и трансформации. // Сборник тезисов "III Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов "Симбиоз - Россия 2010", Нижний Новгород, 24-29 мая 2010 г., с.108
12. **Pavlova O.A.**, Matveeva T.V. and Lutova L.A. Study of the regenerative ability of plants of the genera, which were found sequences homologous to the T-DNA of agrobacteria. // Abstract Book: Adaptation to Climate Change in the Baltic Sea Region: Contributions from Plant and Microbial Biotechnology July 1217, 2010 Mikkeli, Finland., P.67.
13. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., **Pavlova O.A.**, Nester E.W., Lutova L.A. Sequences, homologous to T-DNA of agrobacterium in plant genomes //Plant Genetics, Genomics, and Biotechnology". Novosibirsk, 2010. P. 27
14. Matveeva T.; Bogomaz D., **Pavlova O.**, Lutova L. Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to plant during their evolution // Abstracts of XVII Congress of FESPB Valencia, Spain, 2010, P. 195
15. Andreeva E., Matveeva T., Bogomaz D., **Pavlova O.**, Lutova L. Genetic engineering approaches for silencing of plant genes of different evolution origins // Abstracts of XVII Congress of FESPB Valencia, Spain, 2010, p. 163-164.
16. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., Лутова Л.А. *Linaria dalmatica*(L.) Mill. Содержит Т-ДНК подобные последовательности агробактерий. // Сборник тезисов «Достижения и перспективы развития биотехнологии» г. Саранск, 3-5 октября 2012 г., с. 80.
17. **Павлова О.А.**, Матвеева Т.В., Лутова Л.А. Новый молекулярный маркер для филогенетических исследований рода *Linaria*. // Сборник тезисов П(Х) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге 11 – 16 ноября 2012 года, с. 20-21.
18. Matveeva T.V., Bogomaz D.I., **Pavlova O.A.**, Nester E.W., Lutova L.A. *Linaria vulgaris* L. contains T-DNA Genes of *Agrobacterium rhizogenes*. // Abstracts of 33th International Crown Gall Conference, Decemder 1-2, 2012, Hiram College, Hiram, OH, USA.