



УДК 576.315

Трансформация митохондрий табака генетической конструкцией с интегративными свойствами и отбор клеточных линий с трансгенными митохондриями по устойчивости к антимицину А

А. И. Катышев¹, В. Н. Шмаков¹, В. В. Черникова¹, Ю. В. Сидорчук²,
Е. В. Дейнеко², Ю. М. Константинов¹

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

²Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск

E-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Аннотация. Получены трансформированные митохондрии табака путем введения *in vivo* методом биобаллистической трансформации ДНК митохондриального генетического вектора, несущего ген устойчивости к антимицину А. Путем отбора клеточных линий табака по устойчивости к ингибитору дыхательного комплекса III антимицину А получены каллусные линии, сохраняющие высокую скорость роста в присутствии этого ингибитора в отличие от контрольных нетрансформированных линий. Предполагается, что ростовые характеристики отобранных каллусных линий обусловлены экспрессией трансгена в митохондриях этих линий.

Ключевые слова: *Nicotiana tabacum*, каллусные линии, митохондриальный генетический вектор, модифицированный ген *cob*, биобаллистическая трансформация, устойчивость к антимицину А.

Введение

До настоящего времени как фундаментальные исследования структурно-функциональной организации генома митохондрий с применением современных подходов молекулярной генетики и молекулярной биологии, так и прикладные работы по переносу генов в геном этих органелл с целью решения конкретных задач биотехнологии и биомедицины пока не могут быть реализованы (за исключением дрожжей [5]) в связи с отсутствием системы генетической трансформации митохондрий. Однако решением данной проблемы может стать разработка системы генетической трансформации растительных митохондрий, основанная на использовании генетического вектора с геном устойчивости к ингибиторам дыхания, действующим на уровне дыхательного комплекса III растительных митохондрий: антимицину А и миксотиазола [6; 8].

Потенциальная система трансформации митохондриального генома растений табака на основе применения в качестве селективного гена разных мутационных вариантов гена апоцитохрома *b* (*cob*), обеспечивающих устойчивость клеток с трансформированными митохондриями к действию ингибиторов дыхания – антимицина А или миксотиазола, предложена в

работе [8]. При этом для более эффективной селекции предложено использовать дополнительно ингибитор альтернативной оксидазы – салицилгидроксамовую кислоту (СГК) для усиления эффекта антимицина А или миксотиазола [8]. Возможность получения устойчивых к действию миксотиазола организмов за счет биобаллистической трансформации митохондриального генома ранее продемонстрирована на примере одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas* в работе [6]. Тем не менее, проблема генетической трансформации митохондрий высших растений остается пока нерешенной.

Целью настоящей работы было исследование возможности получения трансформированных митохондрий табака в системе *in vivo* путем введения методом биобаллистической трансформации ДНК митохондриального генетического вектора, несущего в качестве селективного гена ген устойчивости к антимицину А.

Материалы и методы

Получение генетической конструкции *NtPcob-sod3.1-IGr-cob** для трансформации митохондрий. Схема используемого в работе митохондриального генетического вектора с интегративными свойствами представлена на

рис. 1. Для получения кДНК гена *sod3.1* *Zea mays* выделяли тотальную РНК из 5-дневных этиолированных проростков кукурузы с использованием набора RNeasy (QIAGEN, США) согласно инструкции производителя. Обработку ДНКазой (Fermentas, Литва) препаратов РНК кукурузы и синтез первой цепи кДНК с использованием в качестве затравки праймера олиго(dT)₁₈ с помощью обратной транскриптазы RevertAid H-Minus (Fermentas, Литва) осуществляли аналогично [2].

Для амплификации кДНК гена *cob* табака гена *sod3.1* кукурузы, геномных последовательностей 5'-области гена *cob* табака и межгенного участка *atp9/orf262* митохондриального генома арабидопсиса использовали праймеры, представленные в табл. 1. Выделение ДНК из 7-дневных зеленых растений *Arabidopsis thaliana* и каллусов *Nicotiana tabacum* var. SR1 осуществляли по методу Devey с соавт. [4].

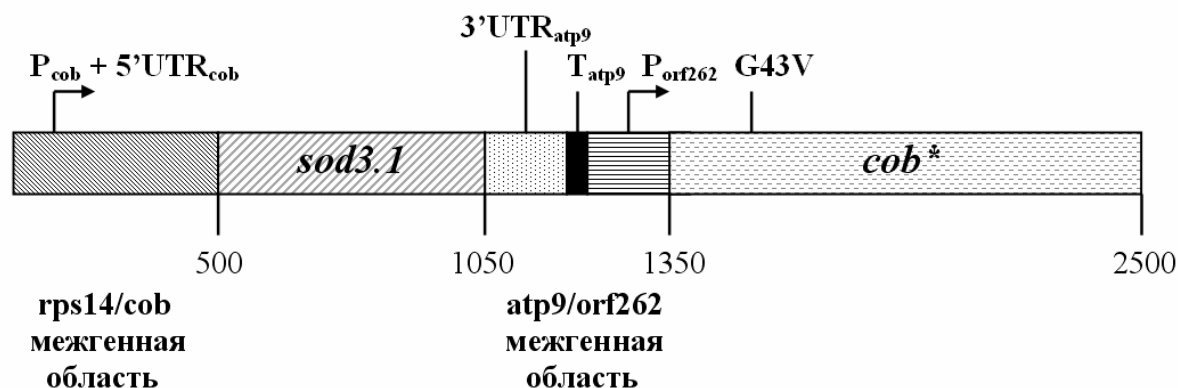


Рис. 1. Схема использованной в работе генетической конструкции *NtPcob-sod3.1-IGr-cob**. Обозначения: *cob* – ген апоцитохрома в *Nicotiana tabacum*; *cob** – модифицированный ген *cob*; *sod3.1* – ген Mn-содержащей супероксиддисмутазы кукурузы; *IGR* – межгенный участок *atp9-orf262* *A. thaliana*

Таблица 1
Олигонуклеотиды, использованные для создания генетической конструкции *NtPcob-sod-IGR-cob**

| Название | Последовательность олигонуклеотида (5'→3') | Ожидаемый ПЦР-продукт |
|----------|--|--|
| Zm1CL | ATGGGGGTGACGACGGTCACA | sod3.1 кукурузы |
| Zm1CR | TCAAGCAAGAACATTTTCGTACACCT | |
| ricL | TCAGGGCGCAGCGAAGCCA | 5'-область гена <i>cob</i> табака |
| ricR | TTATTTATTTATCTTTTCTATCGTGACA | |
| 3IRaL | TCGAAGAAAGAAGGTTTCCATTCA | <i>atp9/orf262</i> межгенный участок митохондриального генома арабидопсиса |
| 3IRaR | AATTTAATTTTCGAGTGTGATCAAA | |
| cobL | ATGACTATAAGGAACCAACGACTCTCT | Транслируемая последовательность кДНК гена <i>cob</i> табака |
| cobR | TCAGGTGTGATCAGTCTCATCCGT | |
| GtoVdir | TCGTTAGCTGTTATTTGTTTAGT | Участок гена <i>cob</i> табака с мутацией (G43V) |
| GtoVcom | ACTAAACAAATAACAGCTAACGA | |

Амплификацию ДНК (36 циклов) проводили с помощью *Pfu*-ДНК-полимеразы (Fermentas, Литва) в буфере производителя в следующем режиме: денатурация – 40 с при 94 °С; отжиг – 1 мин при 55 °С, элонгация – 1 мин при 72 °С.

Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле при напряжении 100 В. Окрашенные бромистым этидием и визуализированные в УФ-свете соответствующие требуемому размеру ПЦР-

продукты вырезали из геля и элюировали с помощью набора Illustra (GE Healthcare, США) согласно инструкции производителя. Элюированные ПЦР-продукты лигировали с помощью Т4-ДНК-лигазы (Fermentas, Литва) в составе плазмиды pBlueScript KS(+) (Invitrogen, США), предварительно расщепленной эндонуклеазой рестрикции EcoRV (СибЭнзим, Новосибирск). Реакции рестрикции и лигирования осуществляли согласно протоколам производителей ферментов. Лигазные смеси использовали для трансформации клеток *Escherichia coli*, штамм XL1 Blue (Fermentas, Литва) с помощью набора TransformAid (Fermentas, Литва). Отбор рекомбинантных клонов осуществляли с помощью фенотипической селекции на агаризованной среде LB, содержащей IPTG (5 мМ) и X-gal (1 %) с последующим ПЦР-анализом ДНК-клонов. Соответствие клонированных фрагментов искомым последовательностям подтверждали секвенированием по методу Сэнгера на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Получение последовательности модифицированного гена *cob* *N. tabacum*, детерминирующего по данным V. M. Ortega и соавторов [8] устойчивость к антимичину А, осуществляли с помощью метода перекрывающихся праймеров. Для этого сначала с применением Pfu-ДНК-полимеразы амплифицировали левую и правую части гена *cob* с использованием пар праймеров *cobL-GtoVcom* *GtoVdir-cobR* (см. табл. 1). В структуру олигонуклеотидов *GtoVdir* и *GtoVcom* введена замена одного из нуклеотидов, определяющая замену триплета GGT, кодирующего аминокислоту глицин в структуре гена *cob* табака на триплет GTT, кодирующий аминокислоту валин. Продукты амплификации очищали от олигонуклеотидов с помощью набора Illustra (GE Healthcare, США) согласно инструкции производителя. После очистки продукты обеих реакций смешивали в эквимольном количестве (около 100 нг) в реакционной смеси для ПЦР с Pfu-ДНК-полимеразой, не содержащей праймеров, проводили один цикл амплификации в стандартных условиях, после чего добавляли в реакционную смесь олигонуклеотиды *cobL* и *cobR* до итоговой концентрации 0,4 нМ каждого и осуществляли амплификацию по стандартной программе. После электрофоретического разделения продуктов ПЦР и визуализации в УФ свете ПЦР-продукт соответствующего размера элюировали из геля с помощью набора Illustra

(GE Healthcare, США), клонировали в составе плазмиды pBlueScript KS(+) и секвенировали.

Вырезание клонированных элементов конструкций для трансформации митохондрий табака *in vivo* осуществляли с помощью эндонуклеаз рестрикции *XhoI* и *XbaI* (СибЭнзим, Новосибирск) согласно инструкции производителя. Лигирование фрагментов после рестрикции проводили с помощью Т4 ДНК-лигазы (СибЭнзим, Новосибирск) согласно инструкции производителя.

Растительный материал. В качестве растительного материала использовали каллусную культуру табака, растущую на среде следующего состава – основные неорганические соли по Мурашиге и Скугу (MS) [7], 80 г/л мезоинозитола, 1 мг/л тиамина, 0,5 мг/л пиридоксина, 20 г/л сахарозы, 1 мг/г НУК (α -нафтилуксусная кислота), 0,1 мг/л кинетина, 7 г/л агара. Период субкультивирования составлял 28 дней. Культура поддерживалась в темноте при температуре 24 °С.

Генетическая трансформация N. tabacum. Трансформацию клеточной культуры проводили с помощью генной пушки PDS-1000/He System (BioRad). Кусочки каллуса диаметром примерно 2 см помещали на агаризованную среду MS основного состава и через 2 дня культивирования подвергали обстрелу золотыми микрочастицами с нанесенной на них ДНК генетической конструкции *NtPcob-sod3.1-IGr-cob**. Обстрелянную культуру оставляли на той же среде на 2 недели. Далее каждый экземпляр каллуса разделялся на 3–4 участка. Каждый участок нумеровался и культивировался отдельно.

Селекция каллусных линий табака по устойчивости к антимичину А и салицилгидроксамовой кислоте. Селекцию проводили на чашках Петри. Селективная среда помимо обычных питательных компонентов содержала дополнительно 20 мкМ антимичина А и 0,25 мМ салицилгидроксамовой кислоты. Участки каллусной культуры помещали на чашку с селективной средой и аналогичный по размеру участок каллуса – на чашку со средой без селективных агентов с соблюдением взаиморасположения каллусов на каждой чашке. Визуальную оценку состояния каллусов и их ростовой активности проводили в конце периода субкультивирования.

Результаты и обсуждение

Поскольку возможность интеграции экзогенной ДНК в митохондриальный геном по принципу гомологической рекомбинации пока-

зана ранее для дрожжей [5] и изолированных митохондрий картофеля [1], нами для генетической трансформации митохондрий табака *in vivo* было решено также использовать генетическую конструкцию с интегративными свойствами (см. рис. 1). В данной конструкции в качестве селективного гена использован модифицированный ген апоцитохрома *b* (*cob*^{*}) табака, единичная нуклеотидная замена в структуре которого согласно данным V. M. Ortega и соавторов [8] обеспечивает устойчивость клеток к действию ингибитора митохондриального дыхания антимицина *A*. Последовательность гена *cob*^{*} также выполняет функцию одного из сайтов, по которому предполагается рекомбинация конструкции с митохондриальным геномом табака и ее интеграция в митохондриальный геном. В митохондриях табака *in vivo* транскрипт гена *cob*, как и транскрипты многих других митохондриальных генов, при созревании подвергается редактированию [8]. При этом наблюдаемое *in vivo* неполное редактирование мРНК гена *cob* влияет на количество функционального белкового продукта этого гена [8]. В связи с этим при создании конструкции *NtPcob-sod3.1-IGr-cob*^{*} использовали не геномную модифицированную последовательность гена *cob*, а последовательность кДНК этого гена. Для этого с помощью ПЦР амплифицирована последовательность кДНК гена апоцитохрома *b* (*cob*) табака, в которую с использованием метода перекрывающихся праймеров введена нуклеотидная замена (G->T), приводящая к замене аминокислоты глицин на аминокислоту валин (G43V) (см. рис. 1). Наличие измененного аминокислотного триплета подтверждено секвенированием клонированных модифицированных последовательностей.

В качестве целевого гена для трансформации митохондрий табака *in vivo* нами использован ген антиоксидантной защиты митохондрий кукурузы – Mn-содержащей супероксиддисмутазы *sod3.1* (см. рис. 1), последовательность кДНК которого была предварительно клонирована и секвенирована [9]. Данная кДНК затем клонирована нами в экспрессирующем векторе pQE60 в культуре клеток *E. coli* (штамм XL1-Blue). С помощью электрофоретического анализа полипептидного состава экстрактов трансформированных бактерий и определения супероксиддисмутазной активности в геле показано образование белкового продукта гена *sod3.1* кукурузы. Данный полипептид формирует характерную для на-

тивного белка тетрамерную структуру и проявляет супероксиддисмутазную активность.

Для экспрессии гена *sod3.1* кукурузы в митохондриях табака в качестве промоторной области нами использована 5'-область гена *cob*, содержащая промоторный участок этого гена (см. рис. 1). Эта область наряду с собственно геном *cob* выполняет функцию сайта, по которому должна осуществляться ее интеграция в митохондриальный геном путем гомологической рекомбинации. В связи с тем, что терминирующие транскрипционные элементы в митохондриальных геномах растений пока не охарактеризованы, для терминации транскрипции целевого гена *sod3.1* и инициации транскрипции селективного гена *cob*^{*} нами использован один из сравнительно небольших (300 п. н.) межгенных участков митохондриальных геномов растений. Наиболее подходящим для этих целей оказался межгенный участок *atp9/orf262* из митохондриального генома *Arabidopsis thaliana* (GenBank/EMBL Acc.No. Y08501). Использование в данном случае экзогенной генетической последовательности продиктовано необходимостью снижения риска случайной рекомбинации конструкции с различными участками генома митохондрий табака.

Вышеперечисленные элементы генетических конструкций (5'- область гена *cob* табака и межгенный участок *atp9/orf262* арабидопсиса) получены нами с помощью ПЦР с использованием в качестве матрицы тотальной ДНК табака и арабидопсиса, а затем клонированы. Соответствие этих полинуклеотидных последовательностей требуемым было подтверждено секвенированием. На следующем этапе произведено поэтапное лигирование необходимых элементов генетических конструкций. Отбор корректных вариантов после лигирования осуществлялся с помощью ПЦР. Полученные таким образом генетические конструкции также были клонированы, и соответствие их структуры требуемой также подтверждено секвенированием.

В экспериментах по биобаллистической трансформации каллусной культуры табака ДНК полученной конструкции наносили на золотые микрочастицы диаметром 0,6 мкм. Участки каллуса диаметром около 2 см, предварительно культивированные на среде MS основного состава, подвергали двукратному обстрелу с последующей инкубацией в течение двух недель на основной питательной среде MS. Полученные в трех сериях экспериментов по биобаллистической трансформации 18 кал-

лусных линий были подвергнуты селекции по признаку устойчивости к антимичину А.

Селекцию трансформированных клеток табака проводили на основе системы, предложенной в работе V. M. Ortega и соавторов [8], и модифицированной нами [3]. Для этого кусочки каллуса примерно одного размера от каждого образца, подвергнутого биобаллистической трансформации, параллельно помещали на селективную и контрольную среду (рис. 2, А). В конце периода культивирования, составляюще-

го 28 дней, проводили оценку ростовой активности каллуса на селективной и контрольной средах (рис. 2, Б). Как видно из представленных рисунков, скорость роста отдельных каллусных линий на используемых средах различна. Сравнительно одинаковая ростовая активность каллуса на селективной и нормальной средах является, вероятно, результатом экспрессии модифицированного гена *cob* (*cob**) в составе используемой нами генетической конструкции.

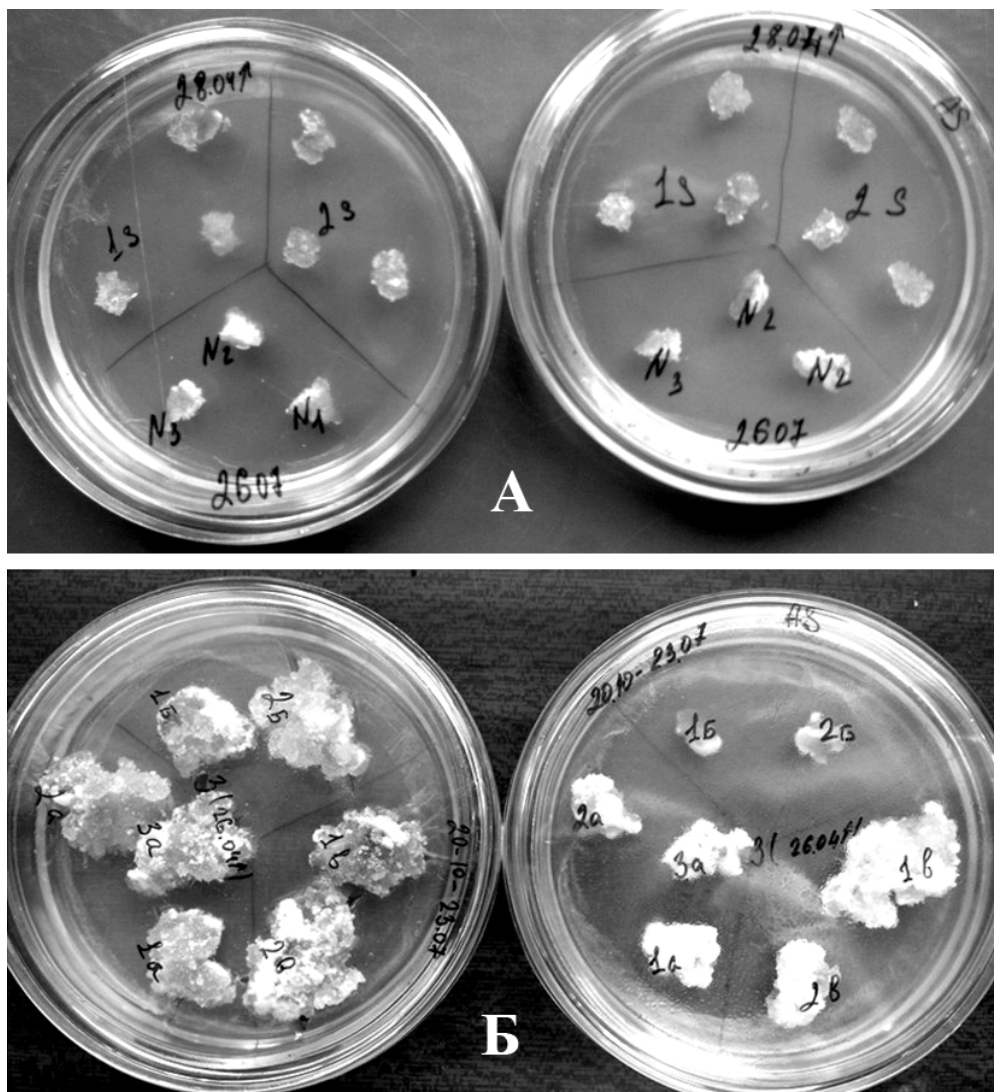


Рис. 2. Селекция трансформированных каллусных культур табака генетической конструкцией *NiPcob-sod3.1-IGr-cob**. Каллусная культура табака N (контроль) и S (получена из листовых высевок, подвергшихся биобаллистической трансформации) на среде Мурашиге-Скуга (МС) (левый образец) и МС + антимичин А 20 мкМ + салицилгидроксамовая кислота 0,25 мМ (правый образец) в начале эксперимента (А) и спустя 1 месяц после начала культивирования (Б). Видны различия в ростовой активности каллусов на селективной среде

Таким образом, путем биобаллистической трансформации каллусной культуры табака митохондриальной генетической конструкцией *NtPcob-sod3.1-IGr-cob** и последующего отбора клеточных линий по устойчивости к ингибитору дыхательного комплекса III антимицину А получены линии, сохраняющие высокую скорость роста в присутствии этого антибиотика в отличие от контрольных нетрансформированных линий. Предполагается, что ростовые характеристики отобранных каллусных линий обусловлены экспрессией трансгена *cob** в митохондриях этих линий. В настоящее время нами проводится молекулярно-биологический анализ с целью получения доказательств экспрессии гена *cob** и гена *sod3.1* в митохондриях каллусов табака. В случае, если удастся достигнуть эффективной экспрессии гена *sod3.1* в полученных нами каллусных линиях, последние будут возможно использовать в качестве информативной модельной системы для исследований роли антиоксидантной системы митохондрий в биогенезе клетки и всего организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 09-04-00992) и междисциплинарных интеграционных проектов СО РАН №№ 7, 83, 98.

Литература

1. Милешина (Непомнящих) Д. В. Интеграция чужеродных последовательностей ДНК в митохондриальный геном растений / Д. В. Милешина (Непомнящих), Ф. Диетриш, Ю. М. Константинов // Изв. Иркут. гос. ун-та. Сер.: Биология. Экология. – 2008. – Т. 1, № 2. – С. 62–66.

2. Сравнительная характеристика ядерной и митохондриальной ДНК-топоизомеразы I кукурузы / В. И. Тарасенко [и др.] // Молекулярная биология. – 2008. – Т. 42. – С. 88–95.

3. Шмаков В. Н. Изучение возможности использования антимицина А при селекции растительных клеток, несущих трансформированные митохондрии / В. Н. Шмаков, Ю. М. Константинов // Устойчивость организмов к неблагоприятным факторам внешней среды : материалы. Всерос. науч. конф (24–28 августа 2009 г.). – Иркутск, 2009. – С. 530–533.

4. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers / M. E. Devey [et al.] // Theoretical and Applied Genetics. – 1996. – Vol. 92. – P. 673–679.

5. Bonnefoy N. Directed alteration of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA by biolistic transformation and homologous recombination / N. Bonnefoy, Th. D. Fox // Methods Mol. Biol. – 2007. – Vol. 372. – P. 153–166.

6. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes / C. Remacle [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103. – P. 473–497.

7. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Scoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

8. Ortega V. M. The tobacco apocytochrome b gene predicts sensitivity to the respiratory inhibitors antimycin A and myxothiazol / V. M. Ortega, J. G. Bohner, C. D. Chase // Curr. Genet. – 2000. – Vol. 37. – P. 315–321.

9. *Zea mays* L. mitochondrial Mn-superoxide dismutase: evidence in favour of potential DNA protective function / A. I. Katyshev [et al.] // Maize Genet. Coop. Newslett. – 2010. – Vol. 84. – P. 76.

Transformation of tobacco mitochondria by genetic construct with integrative properties and selection of cell lines with transgenic mitochondria based on resistance to antimycin A

A. I. Katyshev¹, V. N. Shmakov¹, V. V. Chernikova¹, Yu. V. Sidorchuk², E. V. Deineko², Yu. M. Konstantinov¹

¹Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, SB RAS, Irkutsk

²Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk

Abstract: The delivery by biolistic method of mitochondrial genetic vector conferring resistance to antimycin A to get tobacco transformed mitochondria *in vivo* was investigated. Callus lines which are resistant to respiratory complex III inhibitor antimycin A were obtained. These cell lines demonstrate high growth rate in the presence of this respiratory inhibitor in comparison with non-transformed lines. We suggest that growth characteristics of selected callus lines are explained by transgene expression in mitochondria of these lines.

Key words: *Nicotiana tabacum*, callus lines, mitochondrial genetic vector with integrative properties, modified *cob* gene, biolistic transformation, resistance to antimycin A.

Катышев Александр Игоревич
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
научный сотрудник
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: alex@sifibr.irk.ru

Шмаков Владимир Николаевич
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru

Черникова Валентина Владимировна
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
ведущий инженер
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: berta_V@list.ru

Сидорчук Юрий Владимирович
Институт цитологии и генетики СО РАН
630090 г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10
кандидат биологических наук, научный сотрудник
тел. (383) 330-15-79; факс: (383) 333-12-78
E-mail: sidorchuk@bionet.nsc.ru

Дейнеко Елена Викторовна
Институт цитологии и генетики СО РАН
630090 г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10
доктор биологических наук, зав. лабораторией биоинженерии растений
тел. (383) 330-15-79; факс: (383) 333-12-78
E-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Константинов Юрий Михайлович
Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН
664033 г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132
доктор биологических наук, профессор, зав. лабораторией генетической инженерии растений
тел. (3952) 42-49-03; факс: (3952) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru

Katyshev Alexander Igorevitch
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph.D. of Biology,
research scientist
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: alex@sifibr.irk.ru

Shmakov Vladimir Nikolaevitch
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
Ph. D. of Biology
senior research scientist
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru

Chernikova Valentina Vladimirovna
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
leading engineer
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: berta_V@list.ru

Sidorchuk Yuri Vladimirovitch
Institute of Cytology and Genetics SB RAS
10 Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090
Ph.D. of Biology, research scientist
phone: (383) 330-15-79; fax: (383) 333-12-78
E-mail: sidorchuk@bionet.nsc.ru

Deyneko Elena Viktorovna
Institute of Cytology and Genetics SB RAS
10 Lavrentiev Ave., Novosibirsk, 630090
D.Sc. in Biology, Head of Laboratory of Plant Bioengineering
phone: (383) 330-15-79; fax: (383) 333-12-78
E-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Konstantinov Yuri Mikhailovitch
Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS
132 Lermontov St., Irkutsk, 664033
D.Sc. in Biology, Prof., Head of Laboratory of Plant Genetic Engineering
phone: (3952) 42-49-03, fax: (3952) 51-07-54
E-mail: yukon@sifibr.irk.ru