

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Вятский государственный университет»
Биологический факультет
Кафедра микробиологии

Рекомендовано к использованию
в учебном процессе
Протокол заседания кафедры
№ _____ от _____
Заведующий кафедрой
доктор медицинских наук, профессор
_____ И.В. Дармов

И.А. Лундовских, Е.А. Бессолицына

Генетическая инженерия растений

Учебное пособие

Киров 2011

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебного пособия для студентов направлений 020400 «Биология» и 240700 «Биотехнология» всех уровней подготовки, всех профилей подготовки, всех форм обучения

Лундовских И.А., Бессолицына Е.А.

Генетическая инженерия растений. / И.А. Лундовских,
Е.А. Бессолицына. – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 95 с.

Учебное пособие предназначено для студентов направлений 020400 «Биология» и 240700 «Биотехнология» всех уровней подготовки, всех профилей подготовки, всех форм обучения для самостоятельной работы и подготовки к практическим занятиям по курсам «Генная инженерия», «Современные проблемы биологии».

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

Содержание

Содержание	3
Введение	4
1 Методы трансформации растений для получения трансгенных культур	7
1.1 Использование <i>Ti</i> -плазмид <i>Agrobacterium tumefaciens</i> и <i>Ri</i> -плазмид <i>A. rhizogenes</i> для создания трансгенных растений	7
1.2 Перенос генов в растения с помощью вирусов	20
1.3 Прямые методы введения трансгена в клетки растений	24
2 Трансгенная система хлоропластов	31
3 Применение маркерных генов при трансформации клеток растений	43
3.1 Системы позитивной селекции с использованием антибиотиков	45
3.2 Системы позитивной селекции с использованием гербицидов	52
3.3 Системы позитивной селекции с использованием токсичных селективных агентов	56
3.4 Системы позитивной селекции с использованием нетоксичных субстратов	58
3.5 Системы позитивной селекции, не использующие внешних селективных агентов	61
3.6 Системы негативной селекции	63
3.7 Системы визуальной селекции на основе репортерных генов	64
Список использованных источников	68

Введение

Организмы, каждая клетка которых содержит чужеродный генетический материал, называются трансгенными. Они обладают способностью передавать приданные им новые признаки своему потомству.

Создание трансгенных растений основано на тотипотентности растительных клеток – из единичных дифференцированных соматических клеток или их протопластов возможна регенерация *in vitro* полноценных фертильных растений. Разработка простых и надежных систем трансформации (введения чужеродных генов в клетки) растений, технологий регенерации растений из трансформированных клеток и эффективных методов селекции трансформантов, содержащих целевой трансген, открыли широкие возможности для изменения целевых признаков растений. Большинство ранних исследований было направлено на получение высокоурожайных сортов сельскохозяйственных культур. В растения вводили гены, обеспечивающие их устойчивость к неблагоприятным условиям среды, вирусам, гербицидам, насекомым-вредителям, а также гены, замедляющие старение и улучшающие питательные свойства [1-3]. На современном этапе развития генетической инженерии растений ставится задача не только улучшать те или иные имеющиеся качества растения, как при традиционных методах селекции, но и создавать на основе растений «биореакторы» для крупномасштабного синтеза новых соединений, используемых в медицине, химическом производстве и других областях. Такими соединениями могут быть особые жирные кислоты, новые полимеры, полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела и другие белки медицинского назначения [1-].

Производство рекомбинантных белков в трансгенных растениях имеет ряд преимуществ перед другими системами экспрессии чужеродных генов:

– растительные системы более доступны и дешевы по сравнению с культивированием в биореакторах (ферментерах) и имеют потенциальную возможность быстрого увеличения масштабов производства;

– в растениях возможны правильный фолдинг и сборка мультимерных белковых комплексов, а также посттрансляционная модификация синтезируемых чужеродных полипептидов;

– растительные клетки не содержат вирусов, патогенных для человека и животных, прионов и т.п., что обеспечивает большую степень безопасности продуктов, выделенных из растений;

– соединения (в том числе, белки), продуцируемые в клубнях, семенах, плодах, обладают высокой стабильностью и могут сохраняться в них длительное время без выделения; возможно введение данных соединений в организм с пищей без предварительной очистки, что значительно снижает стоимость таких препаратов [1, 4-5].

Генетическая конструкция, вводимая в растительную клетку при создании трансгенных культур, обычно содержит экспрессионную кассету целевого гена, включающую белок-кодирующую структурную последовательность и регуляторные элементы транскрипции и трансляции; а также маркерный ген и участки, направляющие интеграцию трансгенной конструкции в геном растительной клетки. Экспрессия маркерного гена в растительных клетках позволяет проводить идентификацию и отбор трансформированных клеток, тканей, проростков и регенерированных трансгенных растений. В качестве маркерных генов при создании трансгенных растений наиболее часто используют гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам, гены синтеза фитогормонов или гидролиза особых форм полисахаридов при культивировании растений на соответствующих селективных средах; а также репортерные гены β -D-глюкуронидазы, люциферазы, зеленого флуоресцентного белка и др. [2-3, 9].

Наиболее важными регуляторными элементами в составе экспрессионной кассеты целевых генов являются: полноразмерные промоторы, включающие энхансеры (усилители) и фактор-зависимые цис-элементы; 5'- и 3'-нетранслируемые области мРНК, эукариотический сигнал полиаденилирования на 3'-конце мРНК. Для эффективной экспрессии гена на уровне трансляции мРНК желательно приблизить набор кодонов в структурной последовательности гена к типичному для растений [10].

Набор известных к настоящему времени промоторов, обеспечивающих эффективную экспрессию трансгенов в растительных клетках, достаточно разнообразен и постоянно пополняется. Для наработки существенных количеств продукта гена во всех клетках растения применяют конститутивные промоторы. Для двудольных растений эффективными промоторами являются 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты и *nos*-промотор гена нопалинсинтазы агробактерий [1, 3]; для однодольных растений – промотор гена убихитина 1 (λ *Ubi-1*) кукурузы [11-12]. Помимо конститутивных промоторов для регуляции экспрессии трансгенов в клетках растений активно используют специфические промоторы, действующие лишь в отдельных органах, тканях, клетках, либо на отдельных стадиях онтогенеза растения; а также индуцибельные промоторы, активируемые в ответ на внешние и внутренние стимулы: температуру, освещение, концентрацию фитогормонов и других эффекторов, часто не свойственных растениям. В качестве индукторов могут выступать антибиотик тетрациклин, стероиды дексаметазон и β -эстрадиол, этанол, ионы меди и др. [13-15]. Регулируемые индуцибельные промоторы открывают широкие возможности для исследования биологических функций изучаемого гена, а также позволяют индуцировать экспрессию трансгена в заданный период, когда она не препятствует нормальному росту и развитию растения и не вызывает иных отрицательных последствий.

Процедура создания трансгенных растений является многостадийным процессом, включающим следующие этапы: перенос трансгенной

генетической конструкции, несущей целевой ген, в растительные клетки (трансформация); стабильная интеграция чужеродного материала в геном растительной клетки, обеспечивающая достаточный уровень экспрессии трансгена; отбор трансформантов и регенерация полноценных трансгенных растений. Для трансформации растений применяют как биологические системы доставки трансгенных конструкций (векторы на основе плазмид агробактерий и вирусов растений), так и методы прямого введения трансгенов в растительные клетки. Наиболее широко используемыми технологиями переноса генетических конструкций при создании трансгенных растений являются трансформация с применением векторов на основе плазмид грамотрицательных почвенных бактерий рода *Agrobacterium* и бомбардировка растительных клеток микрочастицами (биологическая баллистика, биолистика) [3, 8-9, 15-21].

1 Методы трансформации растений для получения трансгенных культур

1.1 Использование Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и Ri-плазмид *A. rhizogenes* для создания трансгенных растений

Трансформация растений агробактериями

Почвенные грамотрицательные бактерии рода *Agrobacterium* обладают природной способностью в местах поранения двудольных растений переносить в растительные клетки определенный сегмент ДНК (Т-ДНК, от англ. transferred DNA) своих мегаплазмид с последующей интеграцией данного сегмента в геном растительных клеток [22]. Клетки, трансформированные Т-ДНК, приобретают способность к неограниченному, нерегулируемому росту, что вызывает формирование опухолевых заболеваний, называемых «корончатым галлом» (в случае индукции опухоли

Agrobacterium tumefaciens) и «косматым корнем» (в случае индукции опухоли *A. rhizogenes*) [2-3, 8, 19, 21-23].

Трансформированные растительные клетки синтезируют новые производные аминокислот и сахаров, известные как опины. Тип опиона, синтезируемого опухолевыми клетками (нопалин, октопин, агроцинопин, маннопин, агропин), зависит от штамма агробактерий, индуцировавшего формирование опухоли. Октопин и нопалин – опины, образующиеся из аргинина; их легче всего обнаружить в клетках корончатых галлов. В соответствии с этим многие широко распространенные штаммы *A. tumefaciens* классифицируют как штаммы октопинового или нопалинового типа. В опухолях косматого корня, вызываемых *A. rhizogenes*, как правило, обнаруживается агропин – производное одного из сахаров. Штаммы агробактерий, вызывающие формирование опухолей, способны к избирательному катаболизму опинов того типа, синтез которых в растительных клетках индуцируют, используя опины в качестве источников углерода и азота [24].

Как индукция опухолей, так и синтез опинов обусловлены бактериальными мегаплазмидами – Ti-плазмидами (от англ. tumor inducing) в случае *A. tumefaciens* и Ri-плазмидами (от англ. root inducing) в случае *A. rhizogenes*.

Ti-плазмиды (рис. 1), обнаруженные во всех вирулентных штаммах *A. tumefaciens*, имеют размер 200-250 т.п.н. и содержат следующие структурно-функциональные области: T-ДНК, переносимая в растительную клетку с последующей интеграцией в хромосомы ядра; *vir*-область, гены в составе которой отвечают за перенос T-ДНК в клетки растений; гены катаболизма опинов; а также локусы, контролирующие репликацию плазмиды в бактериальной клетке (сайт *ori V*) и ее перенос при бактериальной конъюгации [3, 8, 24].

Сегмент T-ДНК в составе Ti-плазмид *A. tumefaciens* содержит гены, кодирующие ферменты синтеза фитогормонов, индуцирующих опухолевое

разрастание трансформированных тканей растения, а также ферменты синтеза опинов. Гены в составе Т-ДНК, хотя и принадлежат бактериальным плазмидам, эволюционно адаптированы для экспрессии только в растительных клетках. Т-ДНК ограничена с обеих сторон несовершенными прямыми повторами длиной 25 пар нуклеотидов, называемых правой и левой границами (right и left borders, RB и LB) [22]. Несмотря на то, что RB и LB схожи по последовательности нуклеотидов, их роль в переносе Т-ДНК различна – делеция правой границы приводит к прекращению переноса Т-ДНК, тогда как делеция левой границы практически не влияет на этот процесс.

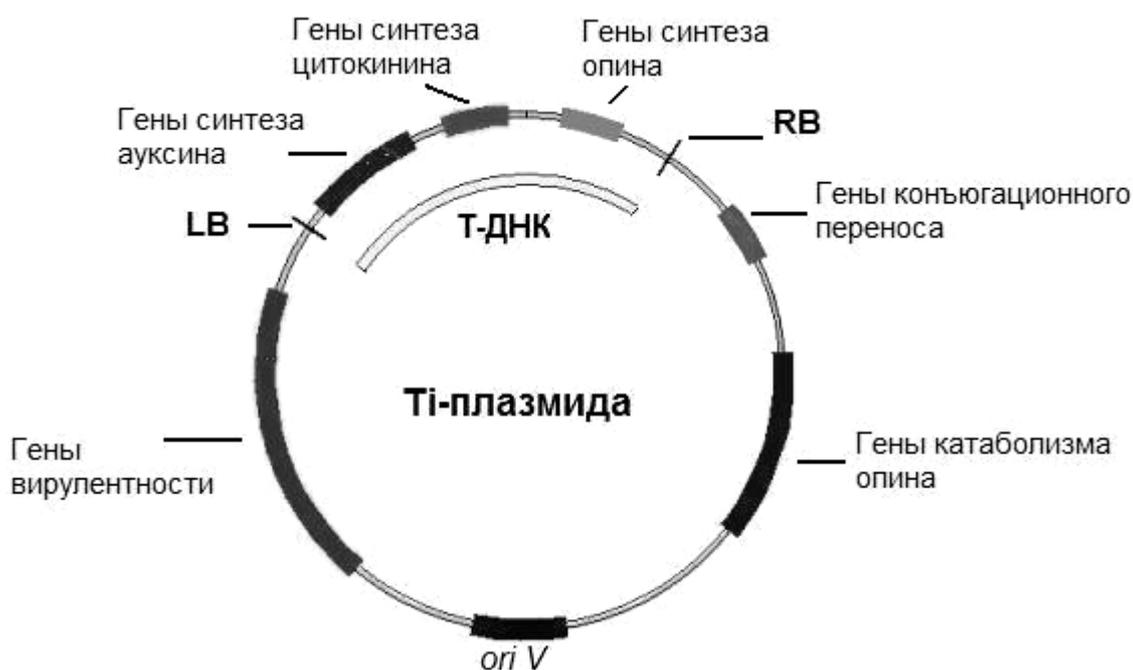


Рис. 1. Структура Ti-плазмиды нопалинового типа *A. tumefaciens*
 RB, LB – правая и левая границы Т-ДНК, *ori V* – сайт инициации репликации Ti-плазмиды

В процессе агробактериальной трансформации Т-ДНК переносится в клетки растения и стабильно встраивается в ядерный геном [21-24]. В геноме растения могут включаться одна и более копий Т-ДНК. Множественные копии Т-ДНК способны образовывать тандемные повторы либо быть интегрированными в различные, преимущественно активно

транскрибируемые участки генома растения; при этом сайты интеграции неспецифичны по отношению к нуклеотидным последовательностям. Нопалиновая T-ДНК в растительном геноме представляет собой непрерывную последовательность нуклеотидов размером порядка 24 т.п.н. Октопиновая T-ДНК состоит из сегментов T_L (14 т.п.н., функционально эквивалентна T-ДНК нопалинового типа) и T_R (7 т.п.н., число ее копий может отличаться от числа копий T_L).

Трансформация растительных клеток и индукция заболевания косматого корня бактериями *A. rhizogenes* аналогична трансформирующему действию *A. tumefaciens*. Под контролем *vir*-области две отдельные области T-ДНК (T_L и T_R) Ri-плазмиды переносятся в растительный геном [24-26]. T-ДНК Ri-плазмид содержит гены, кодирующие ферменты синтеза опинов (маннопина или агропина). T_R-сегмент T-ДНК, кроме того, содержит два гена, кодирующие ферменты синтеза ауксина.

Исследование механизма переноса T-ДНК из *A. tumefaciens* в растительные клетки показало, что трансформация растений агробактериями определяется тремя генетическими элементами: генами вирулентности *chv* в составе хромосомы *Agrobacterium*; областью T-ДНК, окруженной правой (RB) и левой (LB) границами, и генами вирулентности *vir* в составе агробактериальных Ti-плазмид [27-32].

Индукция начальных этапов трансформации происходит в местах раневого повреждения растения, где из растительной ткани выделяется сок с рН=5,0-5,8 и высокой концентрацией углеводов (например, глюкозы и глюкуроновой кислоты) и низкомолекулярных фенольных соединений, предшественников лигнина и флавоноидов. Эти условия специфически стимулируют присоединение агробактерий к рецепторам клеточной стенки растений при участии белков, кодируемых генами в составе хромосомы *Agrobacterium* (*chvA*, *chvB*, *chvE*, *pacA* and *att*) [29, 31], и индуцируют экспрессию генов *vir* в составе бактериальной Ti-плазмиды [27, 30, 32, 33]. Наиболее эффективным индуктором процесса переноса T-ДНК в

растительную клетку является моноциклическое производное фенола – ацетосирингон, с которым взаимодействует продукт гена *virA*, передавая сигнал внутрь бактериальной клетки (рис. 2) [34].

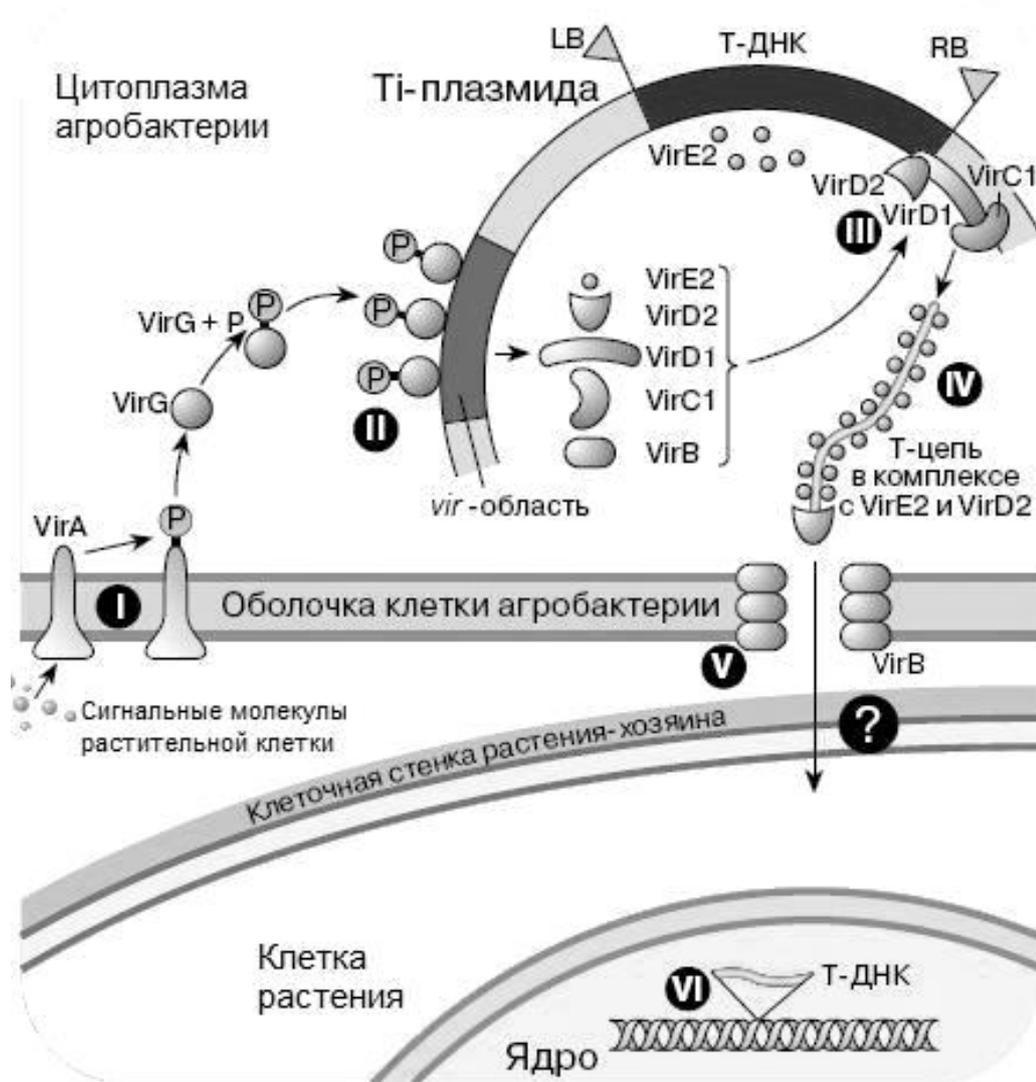


Рис. 2. Основные этапы агробактериальной трансформации [3, 35]:

I – активация хеморецептора *VirA*; II – фосфорилирование фактора транскрипции *VirG*, экспрессия генов *vir*-области; III – внесение одностороннего разрыва в районе правой границы (RB) T-ДНК, репликация с вытеснением T-цепи; IV – связывание с T-цепью *VirE2* и транспорт комплекса T-цепи к поре; V – прохождение T-цепи в комплексе с белками в растительную клетку; VI – интеграция T-ДНК в хромосому растительной клетки.

RB, LB – правая и левая границы T-ДНК

Белок VirA вместе с белком VirG составляют двухкомпонентную регуляторную систему, контролирующую экспрессию генов вирулентности *vir* в составе Ti-плазмиды *A. tumefaciens*. 6 оперонов *vir*-области: *virA* (1 цистрон), *virB* (11 цистронов), *virC* (2 цистрона), *virD* (4 цистрона), *virE* (2 цистрона) и *virG* (1 цистрон) кодируют белки, обеспечивающие перенос T-ДНК в растительные клетки [30, 33-34]. Взаимодействие с ацетосирингоном инициирует аутофосфорилирование располагающейся в цитоплазматической мембране агробактерий протеинкиназы VirA, которая в фосфорилированном состоянии приобретает способность взаимодействовать с белком VirG и активировать его путем фосфорилирования. VirG является фактором транскрипции, активирующим экспрессию генов *vir*-области Ti-плазмиды [30, 34].

Белок VirD2 в комплексе с белками VirD1 и VirC1 узнает несовершенные прямые концевые повторы RB и LB, фланкирующие T-ДНК сегмент в составе Ti-плазмиды, и вносит одноцепочечные разрывы между 3 и 4 основаниями в «нижней цепи» ДНК в составе данных повторов [27, 34] (рис. 3). После этого происходит синтез новой цепи T-ДНК, а старая T-цепь между разрывами с присоединенным к 5'-концу белком VirD2 вытесняется. Процесс повторяется, в результате чего в бактериальной клетке накапливается одноцепочечная T-ДНК, готовая к переносу. Белок VirE2 покрывает T-цепь с белком VirD2, образуя T-комплекс. Затем комплекс T-ДНК с белками VirD2 и VirE2 направлен (от правой границы к левой) переносится в растительные клетки с помощью процесса, сходного с бактериальной конъюгацией. Перенос происходит через пили, сформированные полипептидом VirD4 и белковыми продуктами оперона *virB*, а затем через канал в клеточной мембране растения [30, 36]. Перенос T-ДНК в ядро растительной клетки опосредованно белками VirD2 и VirE2, содержащими сигнальные последовательности, направляющие транспорт T-комплекса через ядерные поры [29].

Вскоре после переноса T-комплекса в ядро растительной клетки происходит синтез комплементарной T-цепи с образованием двухцепочечной формы T-ДНК, что инициирует экспрессию генов в составе свободного T-ДНК сегмента, неинтегрированного в хромосомы растения. Данное явление получило название «*временная экспрессия*». Точный механизм встраивания T-ДНК в ядерный геном растений не выяснен. Предполагается, что стабильная интеграция T-ДНК в хромосомы растения происходит в ходе негомологичной (незаконной) рекомбинации при участии ферментов систем репликации и репарации растительной клетки, а также белков VirD2 и VirE2 [37-39].

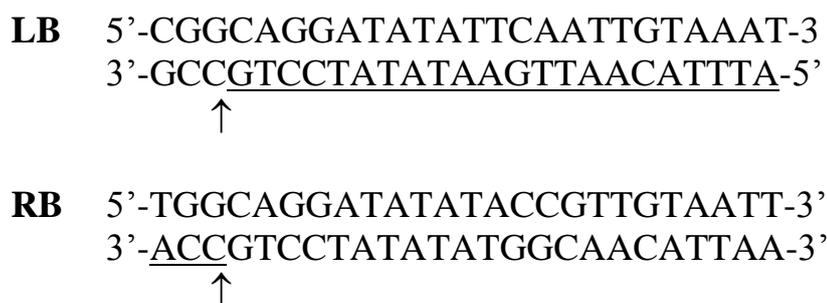


Рис. 3. Участки расщепления T-ДНК в районе правой и левой границ [3]
 RB, LB – правая и левая границы T-ДНК. Подчеркнуты последовательности, входящие в T-цепь.

Экспериментально установлено, что последовательность нуклеотидов фрагмента, заключенного между правой (RB) и левой (LB) границами T-ДНК, не влияет на эффективность переноса T-ДНК из агробактерии в клетку растения. Это позволило предположить, что T-ДНК, окруженную концевыми повторами, можно использовать для переноса чужеродных генов из *A. tumefaciens* в геном растительной клетки.

Векторные системы на основе Ti-плазмид

Ti-плазмиды агробактерий имеют очень большой размер, не содержат в районе T-ДНК уникальных участков гидролиза рестриктазами и не реплицируются в *E. coli*. Прямое встраивание целевого гена в T-ДНК сегмент в составе Ti-плазмиды практически невозможно. Разработаны два подхода к созданию T-ДНК векторов на основе Ti-плазмид.

В первом случае, T-ДНК фрагмент с уникальным участком гидролиза какой-либо рестриктазой клонируют в составе плазмидного вектора, содержащего бактериальный селективный маркерный ген, в клетках *E. coli*. По уникальному сайту рестрикции встраивают целевой ген, предназначенный для интеграции в геном растения. В данный промежуточный вектор между границами T-ДНК встраивают также селективный маркерный ген для работы с растительными клетками (не нарушая целевой ген). Полученный рекомбинантный промежуточный вектор путем конъюгации или трансформации вводят в клетки *A. tumefaciens*, содержащие Ti-плазмиду, в составе которой есть участки, гомологичные по последовательности нуклеотидов участкам промежуточного вектора (в качестве таких участков используют второй бактериальный ген устойчивости к другому антибиотику). Затем проводят отбор клонов агробактерий на селективной среде в присутствии антибиотика, ген устойчивости к которому входил в состав рекомбинантного промежуточного вектора. Данный промежуточный вектор не способен реплицироваться в клетках агробактерий, поэтому отобранные клоны *A. tumefaciens* содержат коинтеграта Ti-плазмиды с промежуточным вектором, образовавшиеся в ходе рекомбинации по областям гомологии. Целевые гены переносятся затем в растительные клетки в составе рекомбинантной T-ДНК. Сходный подход используется при создании коинтегративных векторов с применением Cre/loxP системы сайт-специфической рекомбинации фага P1. Данные **коинтегративные векторные системы** вследствие сложности анализа

получаемых *in vivo* рекомбинантных Ti-плазмид не нашли широкого применения [3, 40].

Второй подход к созданию векторных систем для трансформации растений основан на том, что T-ДНК, фланкированная правым и левым концевыми повторами, и гены вирулентности *vir* могут находиться в агробактерии на двух разных совместимых плаزمидах (в *транс*-положении), и при этом эффективность переноса T-ДНК в растительные клетки не нарушается [41-42]. В этом случае рекомбинантную неонкогенную (не содержащую генов ферментов синтеза фитогормонов и опинов) T-ДНК, в составе которой экспрессионные кассеты целевого и селективного маркерного генов окружены концевыми повторами RB и LB, конструируют и клонируют в клетках *E. coli* в составе небольших плазмидных векторов с широким кругом хозяев, что позволяет манипулировать данными векторами в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*. Затем полученный T-ДНК-вектор вводят в клетки *A. tumefaciens*, несущие Ti-плазмиду с делецией всей T-ДНК или ее части. Такая Ti-плазида, содержащая гены вирулентности *vir*, обеспечивает все функции переноса рекомбинантной T-ДНК, но собственной T-ДНК не содержит и потому называется «обезоруженной». Штаммы *A. tumefaciens*, несущие Ti-плазмиды с делециями T-ДНК, также называются «обезоруженными». Совместимые T-ДНК вектор и «обезоруженная» Ti-плазида составляют **бинарную векторную систему**: плазмиду, содержащую рекомбинантную T-ДНК, называют бинарным вектором, а «обезоруженную» Ti-плазмиду, несущую гены *vir*, – помощником (хелпером). Бинарные T-ДНК-векторы более просты и эффективны, поэтому большинство генно-инженерных экспериментов на растениях выполнено с использованием бинарных векторных систем.

Структура бинарного вектора представлена на рисунке 4. Обязательными элементами бинарного вектора являются: последовательности правой (RB) и левой (LB) границ T-ДНК, ограничивающие сегмент бинарного вектора, содержащий полилинкер

(MCS) с уникальными участками гидролиза рестриктазами для встраивания целевого гена и экспрессионные кассеты репортерного или селективного маркерного гена с регуляторными элементами, обеспечивающими экспрессию данных генов в клетках растений; а также сайты инициации репликации, узнаваемые белками систем репликации *E. coli* (*oriE*) и *A. tumefaciens* (*oriA*), и селективный маркерный ген для отбора трансформированных клеток бактерий. Участки RB и LB представляют собой клонированные фрагменты правой и левой границ T-ДНК нопалиновой либо октопиновой Ti-плазмиды, включающие прилегающие снаружи к концевым повторам T-ДНК последовательности нуклеотидов длиной в несколько сотен пар нуклеотидов, повышающие эффективность переноса T-ДНК в клетки растений [43].

Поскольку интеграция T-ДНК в геном растения происходит с большой точностью по правой границе и с меньшей – по левой, целевой ген чаще располагают у правой (RB) границы T-ДНК, а селективный маркерный ген – ближе к левой границе (LB). Такое расположение значительно повышает надежность отбора трансгенных растений, содержащих интегрированную T-ДНК, на соответствующей селективной среде [3]. Для отбора трансформированных растений чаще всего используют гены устойчивости к канамицину и гигромицину, реже – блеомицину, метатрексату, гентамицину, фосфинотрицину и др. [43-44]. Экспрессия селективных маркерных генов в растительных клетках регулируется, как правило, конститутивными промоторами: 35S промотором вируса мозаики цветной капусты [45] и промотором гена *nos* нопалинсинтетазы *A. tumefaciens* [46] при трансформации двудольных растений, а также промоторами гена убихитина кукурузы [11] и гена актина риса [47] при получении трансгенных культур однодольных. В качестве эукариотического сигнала полиаденилирования на 3'-конце мРНК используют соответствующие участки гена 35S рРНК вируса мозаики цветной капусты и гена *nos* нопалинсинтетазы *A. tumefaciens* [43].

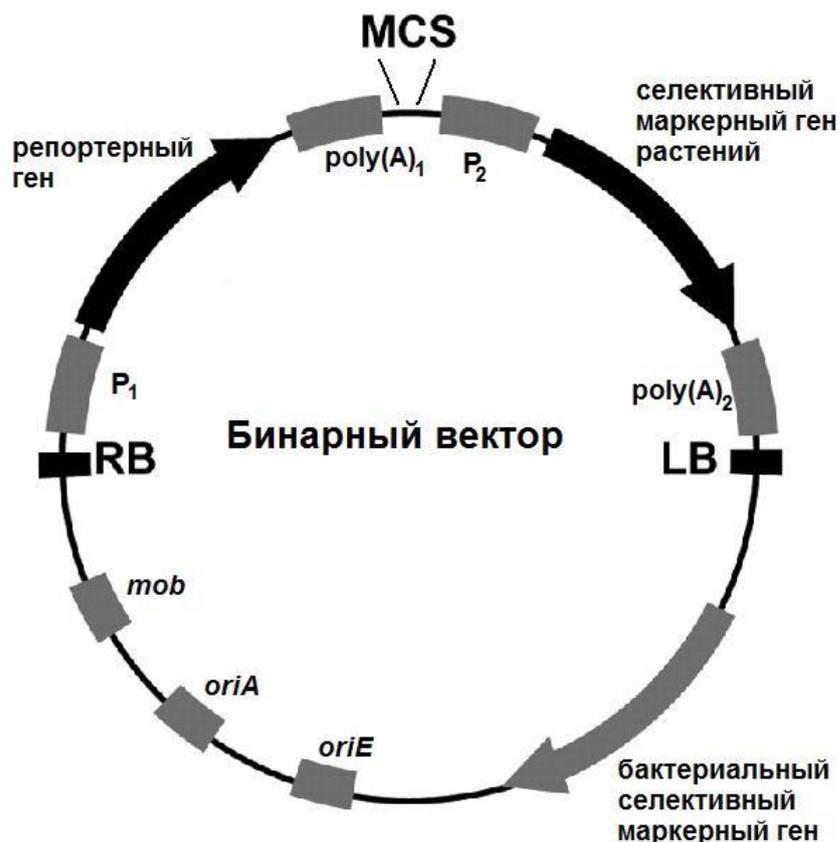


Рис. 4. Структура бинарного вектора для трансформации растений
 RB, LB – правая и левая границы T-ДНК; MCS – полилинкер; P₁, P₂ – промоторы, poly(A)₁, poly(A)₂ – сигналы полиаденилирования; *oriE*, *oriA* – сайты инициации репликации в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*; *mob* – локус генов мобилизации вектора

Одними из первых бинарных векторов, обеспечивающих высокую эффективность трансформации растений, стали сконструированный в 1984 году вектор pBin19 [48] и его производные – pBin20 (с улучшенным полилинкером, содержащим дополнительные уникальные сайты гидролиза рестриктазами) [16] и pBI121 (содержит дополнительный репортерный ген) [49]. В настоящее время бинарные векторные системы широко применяются для получения трансгенных линий различных культур растений [50]. Характеристика ряда бинарных векторов приведена в таблице 1 [43].

Активно используемой в последнее время является серия векторов pPZP, отличающихся высокой стабильностью в клетках *A. tumefaciens* [43,

Таблица 1. Бинарные и супербинарные векторы для трансформации растений [43]

Вектор	Селективный маркер растений	Селективный маркер бактерий	Сайт инициации репликации в <i>A. tumefaciens</i>	Сайт инициации репликации в <i>E. coli</i>	Способность к мобилизации	Ссылки
pBin19	Kan	Kan	IncP	IncP	Да	[48]
pBI121	Kan	Kan	IncP	IncP	Да	[49]
pCAMBIA серия	Kan или Hyg	Sm или Kan	pVS1	ColE1	Да	[51]
pPZP серия	Kan или Gen	Sm или Sp	pVS1	ColE1	Да	[52]
pGreen серия	Kan, Hyg, Sul или Bar	Kan	IncW	pUC	Нет	[50]
pGA482	Kan	Tc, Kan	IncP	ColE1	Да	[53]
pSB11	-	Sp	-	ColE1	Да	[54]
pSB1	-	Tc	IncP	ColE1	Да	[54]
pPCV001	Kan	Amp	IncP	ColE1	Да	[55]
pCLD04541	Kan	Tc, Kan	IncP	IncP	Да	[56]
pBIBAC серия	Kan или Hyg	Kan	pRi	F factor	Да	[57]
pYLTAС серия	Hyg или Bar	Kan	pRi	Phage P1	Нет	[58]

Примечание: Kan – устойчивость к канамицину, Hyg – устойчивость к гигромицину, Gen – устойчивость к гентамицину, Sul – устойчивость к сульфаниламидам, Bar – устойчивость к фосфинотрицину, Sm – устойчивость к хлорамфениколу, Sp – устойчивость к спектиномицину, Tc – устойчивость к тетрациклину, Amp – устойчивость к ампициллину.

52]. На основе векторов pPZP сконструирована серия векторов pCAMBIA, несущих селективные маркерные гены *nptII*, *hpt* или *bar*, а также репортерные гены *gus* и *gfp* [16, 43, 51]. Векторы серии pCAMBIA широко применяются для создания трансгенных культур риса.

Бинарные векторные системы обеспечивают эффективный перенос в клетки растений T-ДНК, содержащих трансгенные конструкции значительного размера [57-58]. Так, с помощью векторов серии pВІВАС (бинарные бактериальные искусственные хромосомы) осуществлен перенос из агробактерий в растительные клетки с последующей интеграцией в геном табака фрагментов хромосомной ДНК человека размером до 150 т.п.н. [57]. Векторы серии pYLTAC позволили осуществить перенос и интеграцию в геном *Arabidopsis* фрагментов ДНК размером 40-80 т.п.н. [58]. Данные векторы обеспечивают стабильную репликацию и сохранение ДНК-вставки значительного размера в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*, и открывают новые возможности для фундаментальных исследований трансгенных растений.

Высокую эффективность переноса T-ДНК с трансгенными конструкциями в клетки растений, в том числе однодольных, устойчивых к агробактериальной трансформации, проявляют супербинарные векторные системы [43, 59-61]. Супербинарные векторы представляют собой улучшенные модификации бинарных векторов, несущие фрагмент плазмиды pTiBo542 с генами *virB*, *virC* и *virG* супервирулентного штамма *A. tumefaciens* A281 [59, 62]. В качестве вектора-помощника для супербинарных векторов используют «обезоруженные» плазмиды типа pAL4404 с полным набором своих генов вирулентности *vir*.

Для получения трансгенных растений с помощью бинарных векторных систем наиболее активно используют следующие штаммы бактерий *A. tumefaciens*, несущие «обезоруженные» плазмиды-помощники с генами вирулентности *vir*: штамм LBA4404 с обезоруженной Ti-плазмидой октопинового типа; штамм MP90 с плазмидой-помощником нопалинового типа; штаммы ЕНА101 и ЕНА105, содержащие «обезоруженную» плазмиду

pTiBo542 с генами *virB*, *virC* и *virG* супервирулентного штамма *A. tumefaciens* A281 [16, 63-64].

Для увеличения уровня экспрессии целевого гена, интегрированного в геном растительной клетки в составе Т-ДНК, эффективным является введение в состав Т-ДНК бинарных векторов участков MAR (областей присоединения к матриксу ядра). Данные участки имеют богатые АТ-парами последовательности нуклеотидов, облегчающие присоединение геномной ДНК к матриксу ядра либо внутренней поверхности ядерной мембраны. Эффективность экспрессии целевого гена, окруженного участками MAR генома табака в составе трансгенной конструкции Т-ДНК, увеличивается в сотни раз, что продемонстрировано при создании трансгенных культур растений [16].

Участки интеграции трансгенных конструкций в ядерный геном растений случайны, поэтому экспрессия генов подчиняется эффекту положения; однако в настоящее время разрабатываются технологии направленного встраивания трансгенов хромосомы растений с использованием систем сайт-специфической рекомбинации [65].

Метод агробактериальной трансформации активно применяется для получения трансгенных культур двудольных растений, усовершенствованные модификации метода позволяют успешно осуществлять трансформацию ряда однодольных растений [17]. Для исключения стадии культивирования клеток и тканей из технологии получения трансгенных растений разработаны методы осуществления трансформации растений агробактериями *in planta*, включающие вакуумную инфильтрацию, трансформацию прорастающих семян и погружение бутонов в суспензию агробактерий (floral dipping) [17].

1.2 Перенос генов в растения с помощью вирусов

подавляющее большинство вирусов растений являются РНК-содержащими вирусами, геном которых представлен одноцепочечной

молекулой РНК, реплицирующейся в цитоплазме клетки-хозяина. Вирусная геномная РНК накапливается в растительных клетках до высоких концентраций, что открывает возможность конструировать на основе вирусных геномов многокопийные экспрессирующие векторы. При этом встраивание целевых генов в вирусный геном осуществляют на клонированных в бактериальных плазмидах ДНК-копиях вирусных РНК. ДНК-копию встраивают в плазмиде между промотором и терминатором транскрипции фага (например, фага T7). С помощью фаговой РНК-полимеразы синтезируют РНК-транскрипты рекомбинантных кДНК и трансфицируют ими протопласты или ткани растения [3].

Способность вируса распространяться по всему растению, обеспечивая системное заражение растения, высокий уровень экспрессии встроенного в геном вируса целевого гена, быстрая аккумуляция значительных количеств чужеродного белка и вследствие этого простота его очистки делают вирусы растений перспективными векторами для переноса генов. Вирусы растений имеют более широкий круг хозяев, чем агробактерии, что позволяет экспрессировать целевой ген в разных культурах растений с помощью одной и той же генетической конструкции вектора.

Экспрессирующие векторы для синтеза чужеродных белков в клетках растений сконструированы на основе геномов вируса табачной мозаики, мозаики коровьего гороха и ряда других вирусов [3].

Для экспрессии чужеродных антигенных пептидов на поверхности вирионов активно используется вирус табачной мозаики (TMV) [3]. Вирусная одноцепочечная РНК имеет размер 6,4 тысяч нуклеотидов и кодирует четыре белка. Палочковидные вирионы длиной 300 нм одеты в оболочку из 2130 субъединиц белка. Структура белка оболочки TMV хорошо изучена, что позволяет планировать и осуществлять эксперименты по интеграции в состав белка чужеродных целевых последовательностей. На основе ДНК-копии РНК TMV сконструированы также векторы, обеспечивающие синтез в

растительных клетках значительных количеств индивидуальных чужеродных белков.

Для создания растительных экспрессирующих векторов используют также геномы ДНК-содержащих вирусов – каулимовирусов и геминивирусов [40]. К первым относится вирус мозаики цветной капусты (CaMV), геном которого представлен кольцевой двухцепочечной молекулой ДНК размером 8024 п.н. Из восьми генов только два несмежных несущественны для развития вируса. Их замена позволяет внедрять фрагменты ДНК длиной лишь в несколько сотен пар нуклеотидов. В растительных экспрессирующих векторах широко используют сильные промоторы вируса CaMV – промоторы гена 35S рРНК и гена VI, которые на 1-2 порядка эффективнее, чем промотор гена *nos A. tumefaciens*.

Геном геминивирусов представлен одной или двумя молекулами кольцевой одноцепочечной ДНК общей длиной 2,7 тыс. нуклеотидов. Изолированная вирусная ДНК, нативная или в двухцепочечной репликативной форме, не является инфекционной. Однако оказалось возможным ввести геномную ДНК геминивируса в растительные клетки с помощью агробактерий [66-67]. Тандемный димер вирусной ДНК был встроен в Т-ДНК и с помощью *A. tumefaciens* перенесен в кукурузу, у которой проявились все симптомы системного вирусного заболевания. Метод введения вирусного генома или сконструированного на его основе рекомбинантного вектора, содержащего целевой ген, с помощью агробактериальной трансформации в составе Т-ДНК, назван **агроинфекцией**. Он интересен тем, что позволяет избежать ограничений по размеру рекомбинантной вирусной ДНК и оказался применим к другим вирусам, в том числе, однодольных растений [68-69].

Быстрота и высокий уровень экспрессии трансгена определяют преимущества векторных систем вирусов растений перед трансгенными растениями. Однако при создании вирусов, экспонирующих на поверхности своих частиц чужеродные пептиды, существует ограничение на размер

такого пептида. Так, максимальный размер встройки, при котором не нарушается процесс сборки вирусных частиц, для вируса табачной мозаики составляет 25 аминокислотных остатков [3]. Векторы на основе вирусных геномов характеризуются низкой эффективностью переноса в растительные клетки рекомбинантных генетических конструкций среднего и большого размера [70-72]. Кроме того, вирусная система не обеспечивает стабильной интеграции трансгенных конструкций в геном растительной клетки и наследования признака, кодируемого целевым геном: продукция вируса и экспрессия встроенного в вирусный вектор целевого гена возможна только в инфицированных растениях в ограниченный промежуток времени. Вирусные векторы могут инициировать механизмы посттранскрипционного сайленсинга (замолкания) генов или вирус-индуцированного сайленсинга генов [73-75].

Векторы на основе геномов вирусов растений могут быть использованы как альтернативный способ доставки и обеспечения временной экспрессии генов рекомбиназ в растительных клетках для контролируемых перестроек трансгенных конструкций в ходе сайт-специфической рекомбинации. В частности, для разделения целевого и маркерного трансгенов, входящих в состав одного T-ДНК сегмента, после введения данного сегмента в клетки растения, при этом удаляемый участок в составе T-ДНК, содержащий маркерный ген, должен быть фланкирован ориентированными в одном направлении сайтами рекомбинации. Так, векторы на основе вируса X картофеля (*potato virus X*, PVX) и вируса табачной мозаики (*tobacco mosaic virus*, TMV), несущие экспрессионную кассету гена *cre* рекомбиназы, позволили получить безмаркерные трансгенные линии табака (*Nicotiana benthamiana*) на основе трансформантов, содержащих интегрированную в геном T-ДНК, в составе которой селективный маркерный ген был окружен прямыми повторами сайтов рекомбинации *loxP* [76-79]. Данный подход позволяет создавать безмаркерные трансгенные линии растений, регенерация которых осуществляется путем органогенеза или соматического эмбриогенеза [80].

1.3 Прямые методы введения трансгена в клетки растений

Методы прямого переноса ДНК позволяют вводить трансгенные конструкции в растительные протопласты, интактные клетки и целые растения. Они применимы для трансформации любого растительного материала различных видов растений, не требуют конструирования специализированных векторных систем и позволяют одновременно вводить в клетки растений различные трансгенные конструкции.

Недостатки прямых методов введения трансгена:

- необходимость в сложном оборудовании;
- значительно большее разнообразие вариантов встроенных структур вследствие фрагментации, рекомбинации и перестроек трансгенных конструкций, что требует тщательного и трудоемкого анализа интегрированных последовательностей ДНК;
- интеграция множества копий трансгена в геном растения и ко-интеграция векторной ДНК наряду с целевой трансгенной конструкцией.

Баллистический метод (биолистика)

Метод «биолистической» трансформации, включающий биологические и баллистические технологии, является одним из самых эффективных методов введения молекул ДНК в клетки растений, в том числе однодольных, устойчивых к агробактериальной трансформации. Впервые использованный Дж. Сэнфордом с соавторами в 1987 году для трансформации больших эпидермальных клеток лука [81], метод успешно применен для получения трансгенных и транспластомных культур многих видов растений, исследования временной экспрессии трансгенов в растительных клетках, инокуляции растений патогенными вирусами и т.п. [82-84]. Метод позволяет осуществлять перенос и интеграцию в геном

растения значительных фрагментов ДНК (100-150 т.п.н.), используя векторы YAC и BAC [85-86].

Для бомбардирования растительных клеток наиболее удобны химически инертные частицы золота диаметром 0,6-1 мкм, на которые адсорбируют молекулы ДНК в присутствии хлорида кальция и спермидина. Также можно использовать более дешевые вольфрамовые микрочастицы, но они более гетерогенны по структуре и иногда проявляют фитотоксичность [82-84]. Микрочастицами, несущими чужеродную ДНК, заряжают генную пушку, обеспечивающую ускорение частиц, которые пробивают клеточные стенки и проникают внутрь клетки, чужеродная ДНК, в конечном итоге, оказывается ядре либо в пластидах растительной клетки.

Генетические конструкции, вводимые методом биологической баллистики (биолистики), могут представлять собой кольцевые или линейные векторы, либо линейные фрагменты ДНК, содержащие целевой и маркерный гены в составе экспрессионных кассет, функционирующих в растительных клетках. Плазмидные векторы для биолитической трансформации – это небольшие молекулы, несущие гены, необходимые для репликации и селекции рекомбинантных плазмид в бактериальных клетках, и множественные сайты для клонирования. Трансформация клеток линейными фрагментами, включающими трансгенные экспрессионные кассеты, называемая «чистой генной технологией», исключает возможную интеграцию векторных последовательностей в геном растений [87]. Как только чужеродная ДНК оказывается в ядре, начинается временная экспрессия генов, включенных в ее состав. Уже через час после бомбардировки в тканях растения может быть выявлена экспрессия вводимых трансгенов.

В клетке молекулы ДНК, введенные методом биолитики, рекомбинируют между собой и геномной ДНК и интегрируются в геномы растительных клеток в индивидуальном или, чаще, в мультимерном виде. Интеграция в геном растения происходит случайным образом. Метод

биолистики позволяет осуществлять ко-трансформацию растений ДНК-векторами, содержащими экспрессионные кассеты разных генов, при этом трансгенные конструкции обычно встраиваются в геном растения как коинтеграты [88].

Добавление осмопротекторов - маннитола или сорбитола – в среду культивирования клеток при бомбардировке обеспечивает высокий выход стабильных трансформантов различных суспензионных культур клеток [9].

Метод биолистики является основным методом трансформации пластид растительных клеток [89]. Стабильные трансформанты риса получены путем бомбардировки незрелых зародышей и эмбриогенного каллуса, при этом эффективность трансформации достигала 50 % [18, 90]. Данная технология адаптирована для получения трансгенных линий других, устойчивых к агробактериальной трансформации, видов растений. Опыление растений пыльцой, полученной из трансформированных методом биолистики микроспор, позволяет создавать трансгенные линии растений *in planta*, минуя стадии культивирования растительных клеток и тканей и регенерации полноценного растения [91].

Метод биолистики имеет ряд недостатков. Как и другие методы прямого введения ДНК в клетки растений, биолистическая трансформация характеризуется высокой частотой формирования различных комбинаций встроенных трансгенных структур, том числе интеграцией множества копий трансгена в геном растения, что может повлиять на экспрессию трансгена в растительных клетках и инициировать механизм сайленсинга (замолкания) генов [92]. Уменьшение количества адсорбированной на поверхности микрочастиц ДНК и трансформация клеток линейными фрагментами ДНК, несущими экспрессионные кассеты трансгенов, снижает вероятность встраивания множества копий трансгена в геном растения [87]. В последнее время был разработан и успешно применен комбинированный метод трансформации, названный *агролистическим*. Методом бомбардировки микрочастицами в растительные клетки вводятся молекулы ДНК,

содержащие экспрессионную кассету с генами *vir* Ti-плазмид *A. tumefaciens* под контролем активного в растениях промотора и T-ДНК сегмент с целевым и маркерным генами. Временная экспрессия агробактериальных генов вирулентности приводит к синтезу белков, которые правильно вырезают T-ДНК и встраивают ее в геном растения, как при обычной агробактериальной трансформации [84, 93].

Электропорация

Введение чужеродной ДНК в растительные клетки методом электропорации основано на том, что импульсы электрического поля высокого напряжения вызывают структурные перестройки липидного бислоя, что приводит к образованию пор и увеличению проницаемости мембран [94-96]. Время существования и размер пор достаточны для того, чтобы молекулы ДНК могли из внешней среды войти в клетку под действием осмотических сил. На эффективность процесса влияют: тип клеток, гетерогенность популяции клеток, величина трансмембранного потенциала, напряженность поля и продолжительность импульса, продолжительность компетентного состояния клеток, структура и концентрация переносимых молекул ДНК [97-98].

Технология переноса трансгенных ДНК-конструкций методом электропорации была разработана для трансформации протопластов растительных клеток. Чужеродную ДНК можно вводить в протопласты, используя либо высоковольтный импульс малой длительности (1,5 кВ, 10 мкс), либо низковольтный импульс гораздо большей длительности (350 В, 54 мс).

Метод электропорации успешно применен для стабильной трансформации различных культур растений [99], а также для исследования временной экспрессии трансгенов в растительных клетках [95-96]. Временная экспрессия трансгенов в клетках, трансформированных методом электропорации, позволяет эффективно изучать функциональность

регуляторных элементов и их отдельных участков [100-101]; влияние антисмысловых РНК на экспрессию генов растения [102]; транспорт белков в ядро [103] и пластиды [104] растительных клеток; исследовать экспрессию белков на разных стадиях клеточного цикла [105]. Продукты временной экспрессии трансгенов выявляются быстро – в пределах нескольких часов после трансформации. Это позволяет на первом этапе получения трансгенных растений исследовать функциональность сконструированных рекомбинантных конструкций в ходе временной экспрессии трансгена в растительных клетках, трансформированных методом электропорации; а затем использовать более эффективные методы переноса ДНК для получения стабильных трансформантов, несущих трансгенную конструкцию, интегрированную в геном растения.

Отсутствие эффективных технологий регенерации полноценных растений из протопластов ограничивает применение метода электропорации для стабильной трансформации ряда культур растений. Для решения данной проблемы в качестве экспланта для трансформации можно использовать зародыши растений [106], кроме того разработаны технологии стабильной трансформации методом электропорации интактных меристем *in planta* [107]. Трансформация методом электропорации микроспор (пыльцы) позволяет избежать стадии культивирования клеток и тканей для получения трансгенных растений [108].

Для того, чтобы исключить стадию культивирования клеток и тканей из методики получения трансгенных культур разработан альтернативный способ применения электрического поля для введения рекомбинантных молекул ДНК в растительные клетки – трансформация методом электрофореза. Напряжение 25 мВ и ток 0,5 мА в течение 15 минут обеспечивают перенос отрицательно заряженных молекул ДНК в растительную клетку [109-111]. Метод применим для трансформации интактных меристем *in planta* [112].

Трансформация протопластов с помощью полиэтиленгликоля

Метод разработан для введения трансгенных конструкций в протопласты растительных клеток и применим для трансформации различных культур растений, в том числе устойчивых к агробактериальной трансформации. Полиэтиленгликоль (гидрофильный длинноцепочечный полимер) стимулирует поглощение небольших векторных ДНК (4-12 т.п.н.) протопластами и обеспечивает хороший уровень трансформации при незначительном повреждении клеток [113-115]. На основе трансформации растительных протопластов в присутствии полиэтиленгликоля разработана система временной экспрессии трансгена, применимая для синтеза достаточных количеств соединений медицинского назначения [116]. Отсутствие эффективных технологий регенерации полноценных растений из протопластов ограничивает применение данного метода.

Перенос ДНК в составе липосом и других наночастиц

Катионные липосомы представляют собой положительно заряженные сферические структуры из липидного бислоя, несущие в своей полости молекулы рекомбинантной ДНК. Липосомы эффективно поглощаются протопластами растительных клеток в ходе эндоцитоза, обеспечивая перенос чужеродных молекул ДНК в клетки [117-118]. Эффективность процесса определяется размером липосом, при этом применение липосом большего размера обеспечивает более высокую эффективность трансформации [119]. Метод применим для введения в растительные клетки различных по структуре ДНК-векторов, в том числе векторов на основе вирусных геномов. Данный метод успешно применен для введения трансгенных конструкций в клетки риса [120], пшеницы [121], картофеля [122]. Успешную трансформацию клеток табака YAC векторами, несущими чужеродные фрагменты ДНК большого размера, в составе липосом провели, используя для введения частиц в клетки метод биолистики [123].

Наряду с липосомами, для доставки рекомбинантных векторов, несущих трансгенные конструкции, в растительные клетки используют углеродные нанотрубки. Физические и химические свойства углеродных нанотрубок позволяют им преодолевать мембраны, не повреждая клетки [20, 111, 124-125]. С помощью нанотрубок получены трансформанты кукурузы [124, 126], риса [127], пшеницы [128], табака [111] и других растений [129]. Углеродные нанотрубки могут быть также использованы для поранения растений, чтобы увеличить эффективность трансформации клеток агробактериями [130].

Микроинъекция

Метод состоит в прямом введении ДНК в цитоплазму или ядра протопластов растительных клеток с помощью стеклянной микрокапиллярной пипетки, управляемой микроманипулятором, и применим для трансформации любых протопластов и одноклеточных систем с высокой степенью эффективности [131-132]. Важной особенностью метода является использование геля из легкоплавкой агарозы для удержания протопластов растительных клеток во время микроинъекции и последующего культивирования. Методом микроинъекции получены трансформанты табака [133], петунии [134], рапса [135], ячменя [136].

В последнее время активно развивается технология макроинъекции раствора ДНК в семяпочку растения для получения трансформированного потомства [137]. При этом отрезается рыльце, и раствор ДНК, содержащей трансгенную конструкцию, наносится на обрезанный конец столбика только что опыленного цветка. Модификацией технологии может быть инъекция суспензии агробактерий или раствора ДНК-векторов вместе с пылью растения в соцветия без удаления рыльцев [138]. Метод макроинъекции успешно применен для получения трансформантов риса [139], пшеницы [140], сои [141], петунии [142] и других растений.

Обработка ультразвуком

Воздействие ультразвуком увеличивает проницаемость мембран, стимулируя перенос ДНК в протопласты растительных клеток, суспензии клеток и explants растений. Explants суспендируются в нескольких миллилитрах среды в микроцентрифужной пробирке; после добавления ДНК-векторов и быстрого перемешивания образцы подвергаются воздействию ультразвуком, затем клетки переносят в среду культивирования. Частота ультразвука и время экспозиции определяют эффективность трансформации [143]. Метод применен для исследования временной экспрессии трансгена [144], переноса вирусных частиц [145], стабильной трансформации растений [146]. Обработка ультразвуком используется для увеличения эффективности агробактериальной трансформации путем нанесения микроповреждений растительным клеткам и тканям [147-148].

2 Трансгенная система хлоропластов

Как было отмечено выше, продукция рекомбинантных белков в трансгенных растениях имеет ряд преимуществ перед другими системами экспрессии чужеродных генов, что делает актуальной задачу создания на основе растений «биореакторов» для крупномасштабного синтеза новых соединений, используемых в медицине, химическом производстве и других областях. Однако трансгенные растения с интеграцией целевого гена в хромосомы ядра обычно обеспечивают низкий уровень синтеза чужеродного белка. Существенного повышения продуктивности растений по чужеродному белку можно достичь при использовании трансгенной системы хлоропластов (пластид).

У большинства высших растений в каждой клетке зрелого листа присутствует примерно 100 пластид, и каждая пластида содержит порядка 100 копий пластидной ДНК [149]. Геном пластид – пластом – представляет собой кольцевую самореплицирующуюся молекулу двухцепочечной ДНК

размером 120-220 т.п.н. [150]. Хотя в растении в каждой клетке пластидные геномы идентичны, пластиды могут значительно различаться по морфологии и функциям. Листья и зеленые ткани содержат фотосинтезирующие хлоропласты, зрелые плоды и цветы – пигментированные хромопласты, клубни и другие запасные органы – амилопласты или элайопласты, другие незеленые ткани – лейкопласты [3].

В 1986 году двум группам японских исследователей впервые удалось определить полную нуклеотидную последовательность пластидных геномов двух видов растений – низшего растения *Marchantia polymorpha* [151] и высшего двудольного растения табака *Nicotiana tabacum* [152]. К настоящему времени секвенированы пластидные геномы порядка 170 видов растений, относящихся к различным систематическим группам [153]. Пластомы различных видов растений оказались высоко консервативны. В кольцевой молекуле пластидной (хлоропластной) ДНК можно выделить 4 области:

- большой однокопийный район (LSC – large single copy);
- малый однокопийный район (SSC – small single copy);
- два инвертированных (т.е. имеющих противоположную ориентацию), но идентичных друг другу повторяющихся районов (IR – inverted repeats) (рис. 5) [154].

хлоропластном геноме обнаружен ряд генов, связанных с регуляцией экспрессии генома пластид: гены факторов инициации транскрипции, тРНК-синтетазы, субъединиц факторов элонгации и ферментов, участвующих в репликации пластома [157]. Организация и регуляция экспрессии пластидных генов совмещает особенности, характерные для прокариот и эукариот. Пластидные гены организованы в опероны, в ходе транскрипции которых синтезируются полицистронные мРНК. Регуляция экспрессии генов происходит на различных стадиях процесса – на стадии инициации транскрипции, процессинга РНК, путем регуляции стабильности молекул мРНК, а также на стадии трансляции и посттрансляционной модификации белков [89].

Принципиальная возможность введения и стабильной интеграции экзогенной ДНК в пластидный геном была продемонстрирована в 1988 году в экспериментах с одноклеточной водорослью *Chlamidomonas reinhardtii* [158]. Для трансформации мутантных клеток с делецией гена *atpB* использовали метод бомбардировки микрочастицами вольфрама, несущими ген *atpB* дикого типа. У большинства трансформантов в результате гомологичной рекомбинации экзогенного фрагмента с пластидной ДНК полностью восстанавливался участок, отсутствовавший у исходных организмов, что приводило к восстановлению нарушенного фотосинтеза.

В 1990 году метод биологической баллистики (биолистики) был успешно применен для получения трансформированных хлоропластов высших растений [159]. Листья табака *Nicotiana tabacum* обстреливали микрочастицами вольфрама, на поверхности которых была адсорбирована рекомбинантный вектор pZS148 (рис. 6). Данный вектор был получен при встраивании в клонирующий вектор pBluescript *E. coli* фрагмента пластидной ДНК мутантной линии табака SPC2, высокоустойчивой к антибиотикам спектиномицину и стрептомицину за счет точечных мутаций в гене *rrn16* 16SpРНК (*str-1* и *spc-2*). Отбор трансформантов, несущих модифицированные хлоропласты с интегрированным в ходе гомологичной

рекомбинации мутантным фрагментом пластидной ДНК, проводили на селективной среде по маркеру устойчивости к спектиномицину. Из 148 образцов листьев табака было отобрано три устойчивых клона, содержащих модифицированные хлоропласты. Растения, несущие генетически трансформированный геном пластид, было предложено называть **транспластомными**.

Позднее был разработан альтернативный метод химической трансформации пластид с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ-трансформация) [160-161].

В основе отбора транспластомных культур лежит характерная для пластид чувствительность к антибиотикам. Включение в состав трансгенной конструкции вместе с целевым геном селективного маркерного гена устойчивости к антибиотику позволило отбирать клетки с трансформированными пластидами на соответствующей селективной среде. В качестве селективного маркерного гена при создании транспластомных культур используют бактериальный ген *aadA*, кодирующий фермент – аминогликозид-3'-аденилилтрансферазу – инактивирующий спектиномицин и стрептомицин аденилированием [159, 162], а также гены устойчивости к канамицину *nptII* [163] и *aphA-6* [164].

Стадия селективного отбора трансформантов является необходимым этапом получения гомопластомных культур, содержащих интегрированную трансгенную конструкцию в каждой копии генома пластид [89].

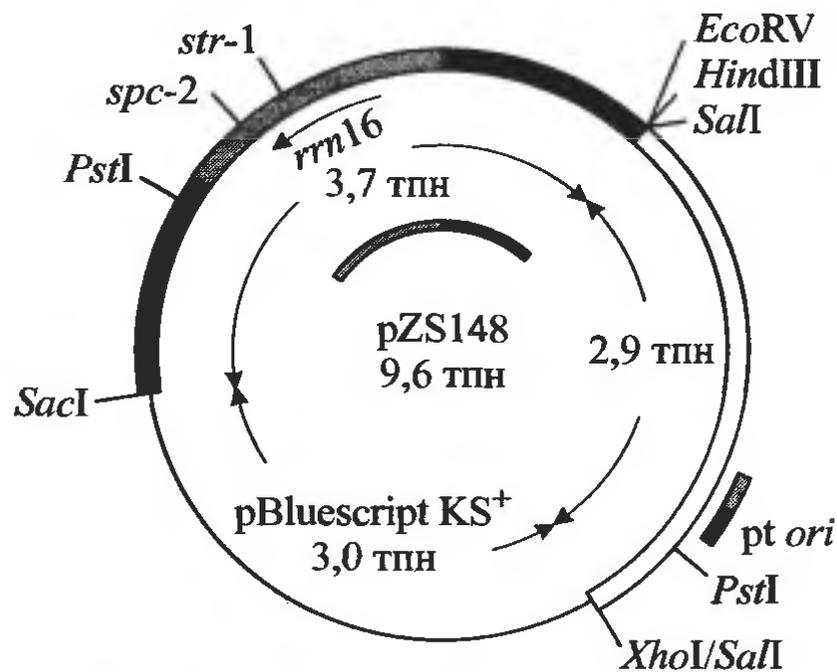


Рис. 6. Вектор плазмидной трансформации pZS148 [3]

Вектор состоит из последовательности плазмиды pBluescript KS+, *SacI-EcoRV* участка плазмидной ДНК, содержащего ген *rrn16* 16S рРНК, и фрагмента плазмидной ДНК с участком инициации репликации (*pt ori*). *str-1*, *spc-2* - мутации в гене *rrn16*, обуславливающие устойчивость к стрептомицину и спектиномицину.

Гомоплазмия, т.е. полное отсутствие нетрансформированных плазмид, - обязательное условие стабильности регенерированных транспластомных растений. Для достижения гомоплазии растительные экспланты после бомбардировки микрочастицами, несущими трансформирующий вектор, выдерживают на среде с антибиотиком. Клетки, содержащие трансформированные пластомы, продолжают делиться и через 4-6 недель инкубации дают начало небольшим каллусам, которые в свою очередь могут дать начало транспластомным побегам. Нетрансформированные клетки чувствительны к спектиномицину (ингибитору трансляции в органеллах), они постепенно теряют пластиды и не способны поддерживать клеточные деления. Для полной элиминации нетрансформированных пластомов проводят повторные циклы регенерации на селективной среде с высокими концентрациями антибиотика [154].

Векторы пластидной трансформации представляют собой гибридные векторы *E. coli*, содержащие селективный и целевой гены, фланкированные сегментами пластидной ДНК (птДНК). Данные фланкирующие последовательности не обладают какими-либо специальными свойствами, имеют размер 1-2 т.п.н., гомологичны выбранному участку пластидной ДНК и обеспечивают интеграцию трансгенной конструкции в геном пластид в ходе гомологичной рекомбинации [89, 154]. Идентичность фланкирующих трансгенную конструкцию участков соответствующим последовательностям пластидной ДНК является ключевым фактором успешной интеграции трансгенов в пластом. Попытки создать универсальный трансформирующий пластидный вектор показали, что применение сегментов пластидной ДНК одного вида для встраивания трансгенов в пластом другого вида даже при ~98% степени гомологии значительно снижает эффективность трансформации [165-166].

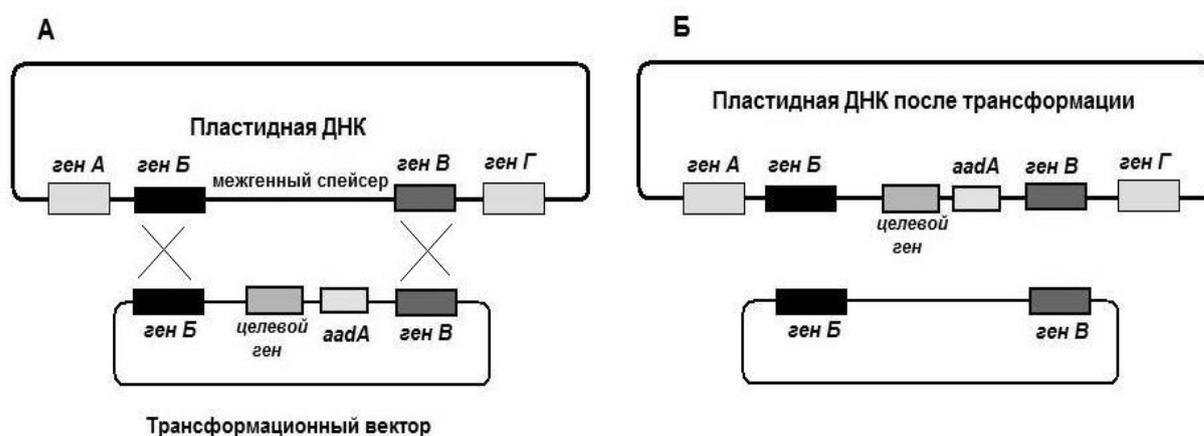


Рис. 7. Трансформация пластидной ДНК

А – интеграция целевого гена в межгенную область пластома в ходе гомологичной рекомбинации, Б – трансформированная пластидная ДНК; *aadA* – селективный маркерный ген устойчивости к спектиномицину. Молекула векторной ДНК после рекомбинации обычно неспособна реплицироваться в пластидах и вскоре теряется

Обычно интеграцию чужеродных генов осуществляют в межгенные участки ДНК пластид. Наиболее активно используемыми сайтами интеграции являются: *trnI/trnA*, *rbcL/accD*, *trnV/rps12/7* [89]. Подавляющее

большинство транспластомных культур – продуцентов соединений, используемых в медицине, химическом производстве и других областях (в том числе, съедобных вакцин, антител и других белков медицинского назначения) содержат целевой трансген, интегрированный в активно транскрибируемую спейсерную область между *trnI/trnA* генами. Это обеспечивает наивысший уровень экспрессии чужеродных генов в трансгенных растениях: продукция рекомбинантных белков достигает 46 % суммарного растворимого белка растения [168]. Один из сегментов пластидной ДНК, фланкирующий трансгенную конструкцию в составе трансформирующего вектора и обеспечивающий интеграцию конструкции в область между *trnI/trnA* генами пластома, содержит сайт инициации репликации пластидной ДНК [169-170], что, возможно, способствует успешной репликации рекомбинантного вектора в хлоропластах, повышает вероятность интеграции трансгенной конструкции в пластом и позволяет достигнуть гомоплазмии транспластомных культур уже в первом раунде селективного отбора [171].

Для экспрессии трансгена, интегрированного в пластом, чаще всего используют сильный пластидный промотор гена *rrn16* (p_{rrn}) [89]. Транскрибируемая трансгенная мРНК для эффективной трансляции на рибосомах пластид должна содержать на 5'-конце соответствующий участок связывания рибосом (RBS). Наряду с RBS некоторых пластидных генов используется аналогичная последовательность гена *10* фага T7 [171]. Нетранслируемый 3'-концевой район гена *psbA* белка реакционного центра фотосистемы II хлоропластов стабилизирует транскрипты чужеродных генов, поэтому его помещают в 3'-концевую часть интегрируемой конструкции [3, 89]. Для стабилизации транскриптов используют и другие 3'-концевые последовательности пластидных генов (3'-UTR генов *rps16* [172-173], *rrnB* [174], *rbcL* [175] и др.).

Метод трансформации пластидных ДНК высших растений долгое время был применим лишь для табака (*Nicotiana tabacum*), так как для

данного растения разработаны эффективные технологии поддержания культуры клеток и успешной регенерации растений из каллусов. В последние годы технологии генетической инженерии пластид успешно применены для создания транспластомных культур картофеля (*Solanum tuberosum*) [165], томатов (*Lycopersicon esculentum*) [166], резушки (*Arabidopsis thaliana*) [176], рапса (*Brassica napus*) [177], петунии (*Petunia hybrida*) [178]. Регенерацию полноценных растений из трансформированных клеток, несущих модифицированные пластиды, в большинстве случаев осуществляли методом органогенеза. Развитие технологий культивирования клеток и тканей растений, применение метода соматического эмбриогенеза позволили получить транспластомные культуры моркови (*Daucus sativus*) [172], хлопка (*Gossypium sp.*) [179] и сои (*Glycine max*) [180].

При создании эффективных суперпродукторов чужеродных белков на основе транспластомных культур растений актуальным является разработка методов элиминации (удаления) маркерных генов из геномов хлоропластов после завершения стадии селекционного отбора транспластомных линий [89, 181-182]. Экспрессия в каждой клетке транспластомной культуры десятков тысяч копий маркерного гена в составе генома хлоропластов может вызвать истощение энергетических запасов и нарушение метаболизма клетки. Для получения безмаркерных транспластомных культур растений успешно применены различные подходы на основе методов гомологичной [183-185] и сайт специфической рекомбинации [186-189], ко-трансформации [190-191] и временной ко-интеграции маркерного гена [192].

Применение в качестве селективного маркера гена *badh*, кодирующего синтез фермента бетаин-альдегиддегидрогеназы, позволяет осуществлять отбор трансформантов с модифицированными пластидами без применения систем селекции на основе ферментов устойчивости к антибиотикам [89]. Фермент активно действует в клетках шпината и других растений, приспособленных к произрастанию в условиях засухи и повышенной солености почв, и катализирует вторую стадию реакции превращения холина

в высокоэффективный осмопротектор – бетаин. Большинство высших растений не способны синтезировать бетаин. Транспластомные клетки, несущие ген *badh*, превращают цитотоксичный бетаин-альдегид в нетоксичный глицин-бетаин, выживают на соответствующей селективной среде и приобретают устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды. Кроме того, использование гена *badh* в качестве селективного маркерного гена при создании транспластомных культур повышает эффективность трансформации и отбора более чем в 20 раз по сравнению с селекцией трансформантов по признаку устойчивости к спектиномицину [172, 193].

Исследование особенностей транспластомных культур показывает ряд их преимуществ перед классическими трансгенными растениями.

– *Отсутствие эффектов положения в пластидах вследствие направленного встраивания трансгенной конструкции в заданный участок пластома.* При трансформации ядерного генома растений в процессе создания трансгенных культур интеграция чужеродной генетической конструкции в хромосомы растения происходит преимущественно случайно путем негомологичной рекомбинации. В результате возникает популяция трансгенных линий с различным количеством встроенных копий трансгена и различным уровнем его экспрессии в зависимости от того, в какой участок ядерного генома встраивается трансген. Интеграция в пластома происходит в результате гомологичной рекомбинации в заданный участок пластидной ДНК. Место встраивания трансгенной конструкции определяется фрагментами ДНК, окружающими рекомбинантную конструкцию в составе вектора, - данные фрагменты гомологичны соответствующим участкам ДНК пластид [89, 166]. Поэтому все трансформанты, получаемые из одной и той же конструкции, одинаковы, содержат трансгенную конструкцию в заданном участке пластома в одинаковом генетическом окружении. Направленное встраивание трансгена в пластома в ходе гомологичной рекомбинации существенно снижает вероятность интеграции в пластидную ДНК

последовательностей векторной ДНК и связанные с этим возможные незадаанные эффекты [181].

– *Высокий уровень экспрессии трансгена и накопления чужеродного белка.* При экспрессии целевого гена в пластидах аккумуляция чужеродного белка достигает 40% суммарного растворимого белка клетки [166, 168, 173]. Это значительно превышает величины, которых удается достичь при интеграции целевого гена в ядерный геном растений. Причиной такой высокой экспрессии могут быть как полиплоидность пластидных геномов (до 10000 копий на клетку), так и высокая стабильность чужеродных белков в пластидах [194].

К настоящему времени получены транспластомные культуры, несущие более 40 различных трансгенов, интегрированных в геном хлоропластов табака и других растений. Созданы транспластомные культуры табака – суперпродуценты антигенов, гормонов и других белков медицинского назначения, включая сывороточный альбумин человека (уровень экспрессии – 11,1 % суммарного растворимого белка клетки), соматотропин (7 %), α -интерферон (19 %), γ -интерферон (6 %) и др. [89]. Функциональность синтезированных белков доказана соответствующими тестами. Для создания съедобных вакцин наиболее перспективны растения и их плоды, которые можно использовать в пищу без термообработки. В работе по получению транспластомных растений томата показано, что в хромопластах плодов томата трансген способен эффективно экспрессироваться, хотя при этом выход целевого белка был в два раза меньше по сравнению с его продукцией с хлоропластах листьев тех же растений [166].

Хлоропласты являются идеальным местом аккумуляции белков и продуктов катализируемых ими реакций, которые могут оказывать токсичное действие на клетки и растение в целом [195]. Так, при экспрессии гена В-субъединицы холерного токсина (СТВ), интегрированного в ядерный геном растительной клетки, наблюдается замедление роста растения, в то время как транспластомные культуры не проявляют нарушений в развитии и имеют

нормальный фенотип, хотя уровень экспрессии белка СТВ в данном случае в 500-4000 раз выше [196-197]. Ксиланаза, используемая в промышленной биотехнологии, не вызывает деградацию клеточной стенки транспластомных культур, что наблюдается в случае трансформантов, содержащих целевой трансген в составе ядерного генома [198].

– *Возможность экспрессировать несколько трансгенов в одном опероне.* Важной особенностью пластид является возможность экспрессии в них оперонов и трансляции белков полицистронных мРНК, что характерно для прокариот, но не реализуется у эукариот, в том числе в ядре клеток растений. Организация нескольких трансгенов в составе одной генетической конструкции в виде оперона и интеграция данной конструкции в пластидный геном позволяют достичь одновременной экспрессии трансгенов, контролируемых одним промотором и стабилизируемых одной 3'-нетранслируемой областью на конце полицистронной мРНК [166]. Это, а также прокариотическая система экспрессии генов в пластидах, открывают возможность экспрессировать в пластидах полные бактериальные опероны, отвечающие за какой-либо метаболический путь, без дополнительной модификации данных оперонов и их регуляторных последовательностей; а также конструировать рекомбинантные опероны для введения новых метаболических путей в пластиды растительных клеток. Уровень экспрессии трансгена в составе оперона и эффективность трансляции целевого белка с полицистронной мРНК не снижаются в сравнении с экспрессией целевого трансгена в составе отдельной экспрессионной кассеты [89].

– *Отсутствие эпигенетических эффектов в пластидах.* При интеграции целевого трансгена в ядерный геном растительной клетки низкий уровень экспрессии чужеродного белка может быть связан с рядом эпигенетических эффектов, том числе с механизмом сайленсинга (замолкания) генов в последующих поколениях. В пластидах эпигенетические эффекты отсутствуют, поэтому экспрессия целевого гена стабильно сохраняется в последующих поколениях [166].

– *Сдерживание неконтролируемого распространения трансгенов в биосистемах.* Важной особенностью пластид является то, что они наследуются по материнской линии и обычно не содержатся в пыльце. Поэтому транспластомные растения более безопасны для окружающей среды по сравнению с классическими трансгенными растениями, так как при интеграции трансгена в пластидную ДНК предотвращается неконтролируемое распространение трансгена в другие растения и уменьшается потенциальная токсичность пыльцы для нецелевых организмов [89, 166].

Перечисленные особенности транспластомных растений делают технологию интеграции целевых трансгенных конструкций в геном пластид многообещающим инструментом, который позволит избежать многих потенциальных проблем и рисков, связанных с классическими методами создания трансгенных растений [154].

3 Применение маркерных генов при трансформации клеток растений

Используемые в настоящее время технологии введения и интеграции чужеродных фрагментов ДНК в геном растений являются недостаточно эффективными. Низкая эффективность трансформации растительных клеток делает необходимым включение в состав вводимых генетических конструкций маркерных генов, экспрессия которых в растительных клетках позволяет проводить идентификацию и отбор трансформированных клеток, тканей, проростков и регенерированных трансгенных растений. В большинстве случаев экспрессия маркерных генов контролируется конститутивным 35S промотором вируса мозаики цветной капусты (CaMV), а также промоторами генов нопалинсинтетазы либо октопинсинтетазы *A. tumefaciens*. Однако уровень экспрессии гена под контролем 35S промотора в клетках однодольных на два порядка ниже, чем в клетках двудольных [200].

Поэтому при создании трансгенных культур однодольных, в том числе злаковых, растений используют промоторы гена убихитина 1 (*Ubi1*) кукурузы [11-12], гена актина (*Act1*) риса [47], а также элементы генетических конструкций (например, интроны), усиливающие экспрессию селективного маркерного гена, что обеспечивает высокую эффективность отбора трансформантов [200].

В литературе описаны порядка 50 различных систем селективного отбора для работы в растительных клетках; эффективность действия данных систем при трансформации различных культур растений различна. В качестве маркерных генов при создании трансгенных растений наиболее часто используют гены устойчивости к антибиотикам и гербицидам, гены синтеза фитогормонов или гидролиза особых форм полисахаридов при культивировании растений на соответствующих селективных средах. Наиболее активно используемыми в генетической инженерии растений селективными маркерными генами являются гены устойчивости к антибиотикам канамицину и гиромоцину и ген устойчивости к гербициду фосфинотрицину [44]. Заменой селективным маркерным генам при создании трансгенных культур растений могут служить репортерные гены, не обуславливающие селективных преимуществ, но позволяющие проводить визуальный отбор трансформированных клеток и тканей среди нетрансформированного материала.

Селективные маркерные гены могут быть подразделены на несколько категорий в соответствии с технологией отбора трансформантов и зависимостью отбора от присутствия в среде культивирования определенного (внешнего) субстрата. Системы позитивной селекции обеспечивают преимущественный рост и развитие трансформированных клеток и тканей, тогда как системы негативной селекции обуславливают гибель несущих их клеток.

После завершения стадии селективного отбора трансгенных растений дальнейшее присутствие маркерных генов и их продуктов в клетках растений

не является необходимым, более того, создает потенциальный риск проявления незаданных эффектов и может оказать неблагоприятное воздействие на человека, животных и окружающую среду. Для предотвращения распространения маркерных генов в окружающей среде при масштабном культивировании трансгенных растений эффективным подходом является удаление маркерного гена из генома трансгенных культур [201-202].

3.1 Системы позитивной селекции с использованием антибиотиков

Все гены устойчивости к антибиотикам, применяемые в качестве селективных маркерных генов для работы с клетками растений, выделены из бактериальных источников [44]. Экспрессионные кассеты данных генов, вводимые в растительные клетки, должны содержать регуляторные последовательности, узнаваемые белками ферментных систем растений. Ряд генов могут действовать как селективные маркеры в составе ядерного и пластидного геномов, но в этом случае для переноса данных генов в растительные клетки должны быть использованы различные экспрессионные кассеты в составе разных векторов [203].

Ферменты, модифицирующие аминогликозиды. К аминогликозидам относятся антибиотики: канамицин, неомицин, производное гентамицина – генетицин (G418), паромомицин, - оказывающие сильное токсичное действие на клетки бактерий, грибов, растений и животных [204]. Канамицин, активно используемый в качестве селективного агента для отбора трансформированных клеток, продуцируется почвенным актиномицетом *Streptomyces kanamyceticus* в виде трисахарида, состоящего из дезоксистрептамина и двух глюкозаминов. Неомицин – тетрасахарид, производимый другим актиномицетом *Streptomyces fragdiae*. Аминогликозидные антибиотики ингибируют синтез белков в бактериальных клетках, а также в пластидах и митохондриях эукариот, путем связывания с

30S субъединицами рибосом. В присутствии данных антибиотиков наблюдается замедление роста и обесцвечивание растительных тканей вследствие отсутствия биосинтеза хлорофилла.

Гены большинства ферментов, модифицирующих аминокликозиды, обнаружены у бактерий и актиномицетов – продуцентов антибиотиков, и обычно располагаются на внехромосомных элементах – бактериальных плазидах и транспозонах [205-206].

Неомицинфосфотрансфераза. Бактериальная аминокликозид-3'-фосфотрансфераза II (APH [3'] II, E.C. 2.7.1.95), также известная как неомицинфосфотрансфераза II (NPTII), является наиболее широко используемой селективной маркерной системой при создании трансгенных растений. NPTII катализирует перенос γ -фосфатной группы АТФ на 3'-ОН группу аминокликозидной части аминокликозидных антибиотиков, что блокирует связывание данных антибиотиков с рибосомами [207-208]. Для конститутивной экспрессии в растениях ген *nptII* (также известный как *neo*), выделенный из транспозона Tn5 *E. coli*, и ген меньшего размера *nptI* из транспозона Tn601 включали в состав экспрессионных кассет, содержащих 5'- и 3'-концевые нетранслируемые регуляторные последовательности гена нопалинсинтетазы (*nos*) *A. tumefaciens*. Ген *nptII*, применяемый в большинстве маркерных трансгенных конструкций растений, имеет мутацию в кодирующей области, которая снижает ферментативную активность фермента NPTII [209].

Конститутивный 35S промотор вируса мозаики цветной капусты (CaMV), и промотор гена нопалинсинтетазы (*nos*), используемые для контроля экспрессии маркерных генов, активны в клетках *E. coli* и *A. tumefaciens*, а также в клетках грибов и эндофитных бактерий, колонизирующих растения [210]. Экспрессия маркерного гена в данных организмах снижает эффективность селективной системы при отборе трансформантов растений, несущих маркерный ген. Включение интрона 3, выделенного из гена белка бобовых фазеолина, в кодирующую

последовательность гена *nptII* блокирует экспрессию активного фермента неомицинофосфотрансферазы II в клетках прокариот, где не действует механизм посттранскрипционного сплайсинга мРНК [211]. Включение интрона 2 из гена ST-LS1 картофеля в 5'-кодирующую область гена *nptII* также обеспечивало синтез активного фермента NPTII лишь в клетках двудольных и однодольных растений без уменьшения эффективности трансформации табака и картофеля [210, 212]. Другие интроны, например интрон 1 из гена *Shrunken 1 (Sh 1)* кукурузы, обеспечивают экспрессию активной неомицинофосфотрансферазы II лишь в клетках однодольных [210].

Так как ген *nptII*, кодируемый им фермент неомицинофосфотрансфераза и канамицин в качестве селективного агента составляют наиболее широко используемую систему селективного отбора трансформированных растений, проведены многочисленные исследования по оценке безвредности гена *nptII* и кодируемого им белка NPTII (APH [3'] II) [204, 213-215].

Анализ нуклеотидной последовательности гена *nptII* и аминокислотной последовательности белка NPTII не выявил гомологии с белками, включенными в список пищевых аллергенов и токсинов. Не обнаружены изменения фенотипа и физиологических характеристик организма вследствие плеiotропного эффекта интеграции и экспрессии гена *nptII* в геноме растения [44]. Так, экспрессия гена *nptII* в составе ядерного генома *Arabidopsis* не влияла на экспрессию 24000 исследованных генов растения [216].

Как правило, количество синтезируемого белка NPTII в растениях низкое (порядка 0,00005-0,001% сырой массы семян хлопка, клубней картофеля или плодов томата). Чтобы получить достаточное количество данного белка для оценки безвредности, он был экспрессирован в *E. coli* [213]. Исследования показали, что неомицинофосфотрансфераза не проявляет свойств, характерных для известных пищевых аллергенов [217]. NPTII быстро разрушается в модельных желудочном и кишечном соке, потребление

больших доз NPTII не оказывало отрицательного действия на здоровье мышей [213].

Ген *nptII* достаточно распространен в природных популяциях почвенных бактерий и среди бактерий, населяющих ЖКТ человека и животных. В виду относительной токсичности и широко распространенной устойчивости канамицин и неомицин очень редко используются для лечения человека. Сообщения о неблагоприятных эффектах фермента NPTII или гена *nptII* на окружающую среду, а также здоровье человека и животных отсутствуют [44, 215, 218].

В соответствии с заключением ВОЗ от 1993 года использование гена *nptII* в качестве селективного маркерного гена в генетически модифицированных растениях не подвергает риску здоровье человека [219]. Международные регулирующие организации утвердили коммерческую реализацию генетически модифицированного масличного рапса, зерновых, картофеля, томатов, льна, цикория и хлопка, содержащих *nptII* ген [44].

Гигромицинофосфотрансфераза. Гигромицин В – антибиотик широкого спектра действия, ингибирующий синтез белков в клетках прокариот и эукариот. Гигромицин В, как правило, более токсичен, чем канамицин, и вызывает быструю гибель чувствительных клеток. Ген *hpt* (*hph*, *aphIV*, *aph4*), выделенный из природной плазмиды *E. coli* штамма W677 [220], кодирует синтез гигромицинофосфотрансферазы (НРТ, Е.С. 2.7.1.119), также известной как аминогликозид-4'-фосфотрансфераза (АРН4). Фермент катализирует фосфорилирование гигромицина В (а также дестомицина А и В и гигромицина В₂), что переводит антибиотики в неактивное состояние [221].

Использование гена *hpt* в качестве селективного маркера обеспечивает высокую эффективность отбора трансформантов различных культур растений, включая однодольные, двудольные и голосеменные [44, 222-223], особенно в тех случаях, когда селективная система *nptII*/канамицин неэффективна [224].

Анализ нуклеотидной последовательности гена *hpt* и аминокислотной последовательности белка АРН4 не выявил гомологии с белками, включенными в список пищевых аллергенов и токсинов. АРН4 быстро разрушается в модельных желудочном и кишечном соке. Тесты на животных показали, что белок даже в больших дозах (779 мг/кг веса) не вызывает острых токсичных эффектов. Устойчивость к гигромицину широко распространена в природных популяциях бактерий, поэтому редкие случаи возможного переноса трансгена не окажут неблагоприятного воздействия на окружающую среду и структуру популяций [225].

Стрептомицинфосфотрансфераза. Ген, кодирующий фермент стрептомицинфосфотрансферазу (SPT, АРН [3′], Е.С. 2.7.1.87), изолирован из бактериального транспозона Tn5 [226]. Мутантная форма SPT с делецией двух аминокислот в районе С-конца белка использована в качестве селективного маркера при трансформации *N. Tabacum*; трансформированные каллусы отбирали в присутствии стрептомицина. Стрептомицин чаще вызывает обесцвечивание, а не гибель клеток, поэтому трансформированные ткани распознавались по зеленой окраске. Эффективность трансформации при использовании данного маркера устойчивости к стрептомицину была сопоставима с применением *nptII* гена под контролем *nos* промотора [227]. Данная маркерная система не адаптирована для широкого применения.

Аминогликозид-N-ацетилтрансферазы (ААС) представляют другой класс аминогликозид-модифицирующих ферментов, которые могут быть использованы в качестве селективных маркеров при работе с культурами клеток растений [204]. Активность двух ферментов ААС(3)-III и ААС(3)-IV исследована на примере петунии и *Arabidopsis*, для экспрессии белков использовали регуляторные последовательности 35S промотора CaMV и 3′-нетранслируемой области гена *nos A. tumefaciens* [228]. Данные ферменты ацетируют гентамицин, канамицин, неомицин и паромомицин. ААС(3)-IV дополнительно модифицирует апрамицин и G418. Оба гена обуславливают высокий уровень устойчивости к гентамицину трансформированной петунии,

однако уровень устойчивости к канамицину – незначителен. Данная система позитивной селекции обеспечивает эффективный отбор трансформантов различных видов растений, включая рапс, табак и томаты [228].

Аминогликозид-О-нуклеотидилтрансферазы относятся к третьему классу ферментов, модифицирующих аминогликозиды, и могут быть использованы в качестве селективных маркерных ферментов в растениях [204]. Бактериальный ген *aadA* кодирует фермент аминогликозид-3'-аденилтрансферазу. Экспрессия гена *aadA* под контролем 35S промотора обеспечивает устойчивость к спектиномицину и стрептомицину клеток *N. tabacum*, однако селекция была более контрастна по признаку окраски тканей (между трансформированными зелеными и обесцвеченными исходными тканями), чем по признаку преимущественного роста трансформированных клеток [159]. Ген *aadA* является наиболее широко используемым селективным маркерным геном при получении транспластомных культур [89, 162].

Ферменты устойчивости к блеомицину. Флеомицин и блеомицин – новые антибиотики, принадлежащие к блеомициновому семейству гликопептидов, вызывающие разрывы в специфических участках одно- и двухцепочечных молекул ДНК [44]. Блеомицин препятствует регенерации растений табака через морфогенез [230]. Выделены два гена устойчивости к блеомицину: ген, изолированный из Tn5 транспозона *E. coli* и хромосомный ген *Streptoalloteichus hindustanus*. При высоком уровне экспрессии обоих генов под контролем 35S промотора CaMV трансформанты табака проявляли высокие показатели устойчивости к флеомицину и способность к регенерации полноценных растений [229]. К настоящему времени данная система не адаптирована для широкого применения.

Мутантная дигидроптероатсинтаза. Дигидроптероатсинтаза (DHPS, E.C. 2.5.1.15) катализирует ключевую стадию синтеза фолиевой кислоты в бактериях и растениях [230-231]. Сульфаниламидные антибиотики являются ингибиторами данного фермента. Устойчивость к сульфаниламидным

антибиотикам определяется генами *sul*, расположенными на бактериальных R плаزمидах [230]. Ген устойчивости *sulI* в составе плазмиды R46 кодирует мутантную форму DHPS, резистентную к ингибированию сульфаниламидами. Для эффективной работы в растениях фермент должен быть направлен в хлоропласты, для чего конструируют слитый рекомбинантных белок, несущий сигнальную последовательность гена рибулозобифосфаткарбоксилазы. Данная система селекции, включающая ген *sulI* и сульфаниламиды в качестве селективного агента, отличается от описанных ранее тем, что она основана на применении мутантного, устойчивого к действию селективного агента, фермента, а не осуществляет инактивацию антибиотика ферментом. Рекомбинантный ген *sulI*, описанный выше, является одной из альтернатив гену *nptII* для отбора трансформантов картофеля сорта Russet Burbank из-за неэффективности других систем селекции [231].

Стрептотрицинацетилтрансфераза. Стрептотрицины – синтезируемые стрептомицетами антибиотики, взаимодействие которых с малой субъединицей рибосом ингибирует синтез белка. Ген *sat3* *E. coli* кодирует фермент, ацетилтрансферазная активность которого инактивирует стрептотрицины. Под контролем 35S промотора CaMV ген *sat3* применяют в качестве селективного маркерного гена при работе с двудольными растениями [232].

Хлорамфениколацетилтрансфераза (CAT, E.C. 2.3.1.2) кодируется геном *cat*, изолированным из Tn9 транспозона *E. coli*. Ген *cat* под контролем *nos*-промотора использовали в качестве селективного маркерного гена для отбора трансформированных растений табака [233]. Отбор трансформантов на селективной среде с хлорамфениколом менее эффективен, чем селекция на канамицине с применением гена *nptII*. Подобная неэффективность ограничила применение гена *cat* в качестве селективного маркера.

3.2 Системы позитивной селекции с использованием гербицидов

Подобно антибиотикам гербициды действуют на разнообразные целевые специфические сайты в растениях. Гены устойчивости к гербицидам выделены из геномов бактерий и растений [44]. Выявлены два механизма достижения устойчивости клеток к гербицидам. При первом – устойчивость к гербицидам определяется естественными изоферментами или вызвана мутациями, определяющими устойчивость ферментов к действию селективного агента; во втором случае фермент осуществляет детоксификацию гербицидов в ходе химической реакции. Типы селекции с использованием антибиотиков и гербицидов сходны в том, что обе категории веществ являются токсичными для нетрансформированных растительных клеток, а трансформированные клетки выживают на среде, содержащей селективный агент.

Фосфинотрицин-N-ацетилтрансфераза. L-изомер фосфинотрицина (PPT; глюфосинат аммония) – активный компонент ряда коммерческих гербицидов широко спектра действия. Аналог L-глутаминовой кислоты, PPT является конкурентным ингибитором глутаминсинтетазы (GS), катализирующей превращение глутаминовой кислоты в глутамин, в ходе которого происходит связывание токсичного для клеток аммиака. Ингибирование данного фермента приводит к ассимиляции аммиака в растительных клетках, нарушению структуры хлоропластов и, в конечном итоге, к гибели растительных клеток [234].

Два гена – *pat* и *bar* – кодируют фермент фосфинотрицин-N-ацетилтрансферазу (PAT, EC 2.3.1.-). Идентичность гена *bar*, выделенного из *S. hygrosopicus* [235], и гена *pat* из *S. viridochromogenes* [236] составляет 87 %. PAT инактивирует фосфинотрицин-содержащие гербициды путем ацетилирования свободной амино- группы фосфинотрицина при участии кофактора - ацетил КоА. Ацетилированная форма L-PPT не способна связываться с глутаминсинтетазой и инактивировать фермент. Ген *bar*

обнаружен в геноме *S. viridochromogenes* – продуцента биалафоса (трипептидного антибиотика, состоящего из L-фосфинотрицина и двух L-аланинов) [237]. Продукт гена *bar* – фосфинотрицин-N-ацетилтрансфераза – защищает клетки бактерии от токсичного действия продуцируемого антибиотика.

Система позитивной селекции *bar*/L-фосфинотрицин широко и успешно используется для отбора трансформантов при создании трансгенных культур однодольных, в том числе злаковых, растений [44].

Анализ аминокислотной последовательности белка PAT не выявил гомологии с белками, включенными в список пищевых аллергенов и токсинов. PAT быстро разрушается в модельных желудочном и кишечном соке и не имеет сайтов гликозилирования, характерных для большинства аллергенов. Тесты на животных показали, что внутривенное введение белка в больших дозах (10 мг/кг веса) не вызывает острых токсичных эффектов [238].

5-еноилпирувоил-шикимат-3-фосфатсинтетаза и глифосатоксидаза. Глифосат (N-(фосфонометил)глицин) – гербицид широкого спектра действия – является активным компонентом в составе коммерческого препарата Раундап (Roundup®). Глифосат ингибирует фермент 5-еноилпирувоил-шикимат-3-фосфатсинтетазу (EPSPS, E.C. 2.5.1.19), участвующий в биосинтезе ароматических аминокислот. Мутантная форма гена *aroA*, кодирующего модифицированный фермент EPSPS с редуцированной способностью связывать глифосат, выделена из *Salmonella typhimurium* [239] и *E. coli* [240], а также из *A. tumefaciens* штамм CP4 [241]. Высокий уровень конститутивной экспрессии гена *aroA* в клетках растений обуславливает устойчивость трансгенных культур к глифосату [242].

Включение бактериального гена *aroA* в качестве селективного маркера в состав трансгенных конструкций обуславливает повышенную, но не полную, толерантность трансформантов к глифосату, так как ген кодирует

растворимую форму фермента, действующего в цитоплазме. Более высокую эффективность отбора трансформантов обеспечивает рекомбинантная форма белка, имеющего сигнальную последовательность, направляющую фермент в хлоропласты растительных клеток [240, 243].

Другим ферментом, обуславливающим устойчивость к глифосату, является бактериальная глифосатоксидоредуктаза (GOX), катализирующая превращение глифосата в глиоксилат и аминометилфосфоновую кислоту (АМРА) [244]. Для использования в качестве растительного селективного маркера, ген *goxv247* глифосатоксидоредуктазы из *Ochrobactrum anthropi* штамм LВАА был модифицирован для улучшения экспрессии в растениях и соединен с сигнальной последовательностью малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы *Arabidopsis* для транспорта в хлоропласты. Данная конструкция использована в качестве селективного маркера при создании трансгенных культур табака, *Arabidopsis*, картофеля и сахарной свеклы [44].

Ацетолактат синтаза (ALS), известная как синтаза ацетогидроксикислот (АНАС, Е.С. 4.1.8.13), является мишенью для нескольких классов гербицидов, включая сульфонилмочевину, имидазолиноны и др. [245]. ALS (АНАС) – регуляторный фермент биосинтеза аминокислот с разветвленной боковой цепью в хлоропластах. Ингибирование данного фермента вызывает дефицит лейцина, изолейцина и валина, накопление токсичного субстрата (α -кетобутирата), нарушение биосинтеза белков и в итоге гибель клетки [246-247]. Гены *crs1*, кодирующие синтез ALS, подвержены мутациям и дают модифицированные формы ферментов, устойчивых к одному или нескольким гербицидам, действующим на ALS. Устойчивые к гербицидам формы ALS отличаются от природных заменой одной или двух аминокислот. Мутантные формы гена *crs1* (*ahas*) выделены из толерантных к сульфонилмочевине и имидазолинонам линий *Arabidopsis thaliana*, других растений (табака и сахарной свеклы), бактерий (*E. coli* и *S. typhimurium*), дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [248-250].

Мутантные формы ALS в сочетании с сульфонилмочевинной или имидазолиноновыми гербицидами могут быть использованы как эффективные селективные маркерные гены при работе с растительными клетками. Показана эффективность мутантной формы кукурузного ALS гена для селекции трансгенной кукурузы в культуре эмбрионных клеток [251]. Мутантная форма ALS гена *Arabidopsis*, кодирующая устойчивый к имидазолинону фермент, применена при трансформации клеток сои в культуре апикальных меристем [252]. Несколько линий генетически модифицированной гвоздики, одобренных для коммерциализации, получены с использованием кодирующего ALS мутантного гена *surB* табака в качестве селективного маркера [44].

Бромоксинил нитрилаза. Оксиниловые гербициды, например бромоксинил и йодоксинил, являются ингибиторами электрон-транспортной цепи фотосистемы II во многих растениях, кроме однодольных. Фермент нитрилаза (Е.С. 3.5.5.6), кодируемая геном *bnx Klebsiella pneumoniae*, гидролизует бромоксинил до 3,5-дибромо-4-дигидроксибензойной кислоты и аммиака [44].

Полная оценка безвредности применения гена *bnx* в трансгенных растениях привела к нормативному одобрению коммерциализации по крайней мере трех трансгенных линий, содержащих данный ген. Линия рапса Оху-235, содержащая интегрированный в геном растения ген *bnx*, одобрена для использования в пищевой и кормовой промышленности в 1997 году в Канаде [44].

Глутамат-1-полуальдегид аминотрансфераза. Габакулин (3-амино-2,3-дигидробензойная кислота) – бактериальный фототоксин, ингибирующий широкий ряд пиридоксаль-5-фосфат-связывающих аминотрансфераз. Мутантная форма глутамат-1-полуальдегид аминотрансферазы (GSA-AT, Е.С. 5.4.3.8), кодируемая геном *hemL*, обнаружена в устойчивой к габакулину цианобактерии *Synechococcus* PCC6301 штамм GR6. С помощью гена *hemL*, кодирующего фермент GSA-AT с сигнальной последовательностью малой

субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы, обеспечивающей транспорт фермента в хлоропласты, получены зеленые трансформированные ткани табака, отличающиеся от обесцвеченных нетрансформированных тканей [253]. Данная система может быть использована для разработки методов селекции транспластомных культур.

3.3 Системы позитивной селекции с использованием токсичных селективных агентов

Ферменты, участвующие в различных метаболических путях, являются мишенями для действия ингибиторов. Нарушение метаболических и биосинтетических путей в присутствии токсичных селективных агентов (аналогов субстратов, промежуточных соединений и т.п.) может внести существенные изменения в состав и форму трансгенных растений, что позволяет проводить прямую селекцию устойчивых трансформантов.

2-дезоксиглюкозо-6-фосфат фосфатаза. Аналог глюкозы, 2-дезоксиглюкоза (2-DOG), фосфорилируется гексокиназой с образованием 2-дезоксиглюкозо-6-фосфата, который конкурирует с глюкозо-6-фосфатом за участки связывания в активном центре фермента фосфоглюкоизомеразы, катализирующей стадию превращения глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат в цепи гликолиза. Присоединение аналога субстрата к фосфоглюкоизомеразе вызывает ингибирование гликолиза и гибель клеток. Дрожжевой ген *DOG^{R1}*, кодирующий 2-дезоксиглюкозо-6-фосфатфосфатазу, обуславливает резистентность к наличию в среде 2-дезоксиглюкозы. Ген *DOG^{R1}* под контролем конститутивного 35S промотора CaMV использован в качестве селективного маркерного гена для отбора трансформантов табака и картофеля. Данная система селективного отбора проявила более низкую эффективность селекции трансгенных растений табака и аналогичную эффективность селекции трансгенного картофеля по сравнению с использованием гена *nptII* в качестве маркера [254].

Альдегид-дегидрогеназа. Небольшие альдегиды, например, бетаин-альдегид, фитотоксичны для многих растительных клеток. Бетаин-альдегид-дегидрогеназа (BADH) активно действует в клетках шпината и других растений, приспособленных к произрастанию в условиях засухи и повышенной солености почв, и катализирует вторую стадию реакции превращения холина в высокоэффективный осмопротектор – бетаин. Фермент кодируется геном в составе хромосом ядра, транспортируется и активно действует в хлоропластах. Большинство высших растений не способны синтезировать бетаин [44].

Использование гена *badh* в качестве селективного маркерного гена при создании транспластомных культур повышает эффективность трансформации и отбора более чем в 20 раз по сравнению с селекцией трансформантов по признаку устойчивости к спектиномицину [172, 193]. Транспластомные клетки, несущие ген *badh*, превращают цитотоксичный бетаин-альдегид в нетоксичный глицин-бетаин, выживают на соответствующей селективной среде и приобретают устойчивость к неблагоприятным условиям окружающей среды.

Октопиринсинтетаза может участвовать в детоксификации аналога лизина, АЕС. Ген данного фермента входит в состав T-DNA Ti-плазмиды октопинового типа *Agrobacterium tumefaciens*. Октопиринсинтетаза катализирует реакции превращения пирувата и лизина в лизопин, а также превращение АЕС в карбоксиэтил-АЕС. Ткани каллуса, в которых экспрессируется фермент, в 20 раз более устойчивы к присутствию АЕС в составе селективной среды [44].

Триптофан-декарбоксилаза (TDC; Е.С. 4.1.1.28), выделенная из *Catharanthus roseus*, превращает L-триптофан в триптамин. Другим субстратом для TDC является 4-метилтриптофан (4-mT), токсичный для растений, не имеющих гена TDC; но в растениях, несущих ген TDC, данный субстрат может быть превращен в нетоксичный триптамин. Под контролем 35S промотора CaMV ген, кодирующий TDC, был использован в качестве

селективного маркерного гена при отборе трансформантов табака. Эффективность прямого отбора трансформантов на среде с 4-метилтриптофаном оказалась сравнима с эффективностью селекции при применении системы *nptII*/канамицин [156].

Дигидрофолатредуктаза. Триметоприм и метотрексат (Mtx) являются ингибиторами фермента дигидрофолатредуктазы (DHFR, E.C. 1.5.1.3). Связываясь с активным центром фермента, данные соединения вызывают нарушение биосинтеза белка, РНК и ДНК, а впоследствии - гибель клетки. Клетки растений обычно очень чувствительны к низким концентрациям метотрексата. Устойчивый к метотрексату фермент DHFR найден в бактерии *E. coli* [208, 256], грибе *Candida albicans* [257] и мутантных клетках млекопитающих [258]. Использование генов *dhfr*, кодирующих толерантные ферменты, при создании трансгенных линий табака и петунии подтвердило, что они могут применены в разработке систем отбора трансформантов на среде, содержащей метотрексат. Ген *dhfr* из *C. albicans* обеспечивает устойчивость растений к метотрексату в сочетании с эндогенными грибными регуляторными последовательностями [257], показывая, что для обеспечения устойчивости растения к метотрексату достаточен даже низкий уровень экспрессии данного гена.

3.4 Системы позитивной селекции с использованием нетоксичных субстратов

Данные системы отбора трансформантов используют внешние субстраты, инертные для растительных клеток до тех пор, пока они не конвертируются в продукты, обеспечивающие преимущество в росте трансформированным растительным клеткам. Описанные к настоящему времени системы позитивной селекции с использованием нетоксичных селективных агентов основаны на применении в качестве селективных маркеров бактериальных генов, действующих на основные метаболические пути растений.

Ксилозоизомераза. Растительные клетки табака, картофеля и томатов не могут использовать в качестве единственного источника углерода D-ксилозу. Фермент ксилозоизомераза (D-ксилозокетол-изомераза; Е.С. 5.3.1.5) катализирует реакцию изомеризации ксилозы до D-ксилозы, которая может служить источником углерода. Гены *xylA*, кодирующие ксилозоизомеразу, выделены из *Streptomyces rubiginosus* [259] и *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* [260]. Возможность применения селективной системы *xylA*/ксилоза для отбора трансформантов продемонстрирована при создании трансгенных линий табака, картофеля и томатов. Для улучшения экспрессии маркерного гена использовали конститутивный 35S промотор CaMV и Ω' трансляционный энхансер вируса табачной мозаики. Эффективность отбора трансформантов с применением системы селекции *xylA*/ксилоза была значительно выше, чем при использовании системы *nptII*/канамицин, и регенерация проростков проходила значительно быстрее.

Фосфоманнозоизомераза. Манноза подобно ксилозе не токсична для растительных клеток. Однако данный углевод обычно не используется растительными клетками в качестве источника углерода и превращается в маннозо-6-фосфат эндогенными гексокиназами. Накопление маннозо-6-фосфата в клетках препятствует росту и развитию клеток, может индуцировать механизм апоптоза (программируемой гибели клеток) через активацию эндонуклеаз [261]. Фосфоманнозоизомераза (PMI, Е.С. 5.3.1.8) катализирует превращение маннозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат, который используется в ряде метаболических путей растительной клетки, в том числе – в гликолизе. Фермент широко распространен в природе и выделен из клеток бактерий, дрожжей, млекопитающих и человека [238].

При использовании маннозы в качестве селективного агента для отбора растительных трансформантов в состав трансгенной конструкции включают ген *manA* (*pmi*), выделенный из *E. coli* [262], под контролем конститутивного 35S промотора CaMV. Трансгенные растения, содержащие интегрированный в геном ген *manA*, способны использовать маннозу в качестве единственного

источника углерода. Система селективного отбора *manA*/манноза широко используется для отбора трансформантов при получении трансгенных линий различных видов растений (кукурузы, пшеницы, риса, рапса, сахарной свеклы, томатов, картофеля и др.) [44, 238]. Для ряда растений применение данной системы селекции вызывает десятикратное увеличение частоты трансформации по сравнению с традиционной системой селекции *nptII*/канамицин [260-266]. В то же время ряд растений (морковь, табак, бобовые) не чувствительны к данной системе селекционного отбора.

Система отбора *manA*/манноза продается компанией Syngenta под названием метод селекции PositechTM. Проведена оценка ее безопасности, включая исследование аллергичности и токсичности системы [238, 267]. Анализ нуклеотидной последовательности гена *manA* и аминокислотной последовательности РМІ не выявил гомологии с белками, включенными в список пищевых аллергенов и токсинов. РМІ быстро разрушается в модельных желудочном и кишечном соке. Тесты на животных показали, что белок даже в больших дозах (3г/кг веса) не вызывает острых токсичных эффектов. Не выявлены плеiotропные эффекты при интеграции маркерного гена в геномы растений. Фермент РМІ широко распространен в природе и активно действует в клетках человека.

β-глюкуронидаза. Фермент β-глюкуронидаза (GUS, Е.С. 3.2.1.31), кодируемый *uidA* (*gusA*) геном *E. coli*, катализирует гидролиз β-D-глюкуронидов. В данной системе прямого селективного отбора в качестве селективного агента используется производное бензиладенина – бензиладенин-*N*-3-глюкуронид, который является неактивной формой растительного гормона цитокинина и не воздействует на рост и дифференциацию растений. β-глюкуронидаза катализирует гидролиз селективного агента с образованием бензиладенина (активного цитокинина), стимулирующего регенерацию трансформированных проростков. Описанная селективная система использована для отбора трансформантов при создании трансгенных линий табака, при этом частота трансформации была

значительно выше, чем при использовании системы отбора *nptII*/канамицин [268]. Дополнительное преимущество заключается в том, что активность GUS может быть оценена визуально.

3.5 Системы позитивной селекции, не использующие внешних селективных агентов

Системы отбора данной группы способствуют регенерации трансформированных растений без применения селективных агентов. Развитию данной технологии препятствует нехватка знаний в области генетического и биохимического контроля процесса регенерации растений на стадиях органо- и эмбриогенеза. В настоящее время механизмы регуляции органогенеза проростков изучены в большей степени, чем эмбриогенез. Исследование генов, контролирующих эмбриогенез растений, позволит предложить новые селективные стратегии для отбора трансформантов при получении трансгенных растений [44].

Изопентилтрансферазы. Органогенез *in vitro* происходит в 3 стадии: приобретение компетентности, детерминация формирования органов за счет баланса фитогормонов и морфогенез [269]. Для формирования проростка в культуре необходимо определенное соотношение фитогормонов цитокининов/ауксинов. Гены, кодирующие ферменты биосинтеза фитогормонов, усиливают регенерацию проростков, обеспечивая возможность визуальной селекции трансформантов. Фермент изопентенилтрансфераза (ИПТ) (ЕС 2.5.1.27), кодируемый геном *ipt* в составе T-ДНК Ti-плазмид *A. tumefaciens*, катализирует реакцию взаимодействия изопентенилдифосфата с 5'-АМФ, продуктом которой является изопентенил-АМФ – предшественник цитокининов [2, 270]. Трансформанты, содержащие интегрированный в геном ген *ipt* на неселективной среде формируют побеги, утратившие апикальную доминантность и неспособные формировать корни. Данный фенотип трансформированных побегов легко выявляется визуально.

При использовании гена *ipt* под контролем 35S промотора CaMV в качестве селективного маркерного гена эффективность трансформации табака оказалась выше, чем при применении 35S-*nptII*/канамицин системы отбора. Кроме того, эффективность отбора по экспрессии *nptII* гена усиливалась при ко-трансформации с 35S-*ipt* генной конструкцией [271]. По-видимому, в геноме *Arabidopsis* находится семейство генов, кодирующих изопентенилтрансферазу, которая катализирует аналогичные реакции и способствует появлению подобного фенотипа трансформированных проростков при экспрессии в трансгенных растениях [272-273]. Растительные гены изопентенилтрансферазы *Arabidopsis* могут служить эффективной заменой бактериальным *ipt* генам *A. tumefaciens* в разработке систем позитивной селекции трансгенных растений.

Сложность данной системы состоит в том, что все регенерированные побеги имеют неправильную морфологию в результате высокого уровня эндогенного цитокинина, что вызывает потерю апикальной доминантности и недостаток корней (т.е. побеговый фенотип). Использование индуцибельного промотора для ограничения экспрессии *ipt* гена во время селекции способствовало устранению морфологических отклонений в регенерированных проростках табака [274].

Рецептор цитокинина. В геномах растений выявлен ген, кодирующий синтез потенциального рецептора цитокинина - SKI1 [275]. Экспрессия белка SKI1 под контролем 35S промотора в трансгенном каллусе вызывала типичный «цитокининовый» ответ (формирование побегов при недостатке корней) без добавления цитокинина в среду культивирования. Результатом последующих экспериментов с использованием β -эстрадиол-индуцибельного промотора для экспрессии SKI1 гена в *Arabidopsis* явилось формирование побегов с соответствующим измененным фенотипом в отсутствие экзогенного цитокинина и в присутствии β -эстрадиола для активации промотора [276]. При переносе трансформированных проростков на новую среду, не содержащую индуктора β -эстрадиола, восстанавливался

нормальный фенотип проростков, и происходила регенерация полноценных растений.

3.6 Системы негативной селекции

Системы негативной селекции включают гены, кодирующие ферменты, катализирующие реакции превращения нетоксичных субстратов в токсичные продукты (селективные агенты), вызывающие гибель растительных клеток. Системы негативной селекции, используемые для отбора трансформантов при создании трансгенных растений, представлены в таблице 2.

Таблица 2. Системы негативной селекции для работы с растительными клетками [44]

Ген	Фермент	Субстрат	Источник
<i>codA</i>	Цитозиндеаминаза	5-флуороцитозин	<i>E. coli</i>
<i>aux2</i>	Амидогидролаза	Нафталинацетамид	<i>A. rhizogenes</i>
<i>tms2</i>	Гидролаза индолилуксусной кислоты	Индолил-3-ацетамид	<i>A. tumefaciens</i>
<i>dhlA</i>	Дегалогеназа	Дигалоалканы	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>
<i>CYP105A</i>	Цитохром P450 – зависимая монооксигеназа	Сульфонилмочевина	<i>Streptomyces griseolus</i>
<i>cue</i>	Алкоголь-дегидрогеназа	Спирты	<i>Arabidopsis thaliana</i>

В качестве маркерного гена для негативной селекции растительных трансформантов активно используют *codA* ген, кодирующий фермент цитозиндеаминазу [ЕС 3.5.4.1], катализирующую реакцию превращения нетоксичного для растительных клеток 5-флуороцитозина в цитотоксичный 5-флуороурацил [277]. Безмаркерные трансформанты, не содержащие интегрированную в геном генетическую конструкцию с маркерным геном, выживают на среде с 5-флуороцитозином. Данная система широко применяется для контроля за интеграцией фрагментов ДНК в геном растения

и контроля за удалением фрагментов трансгенных конструкций, интегрированных в геном растения (например, для отбора безмаркерных трансформантов после удаления генетической конструкции, содержащей маркерные гены).

3.7 Системы визуальной селекции на основе репортерных генов

Заменой селективным маркерным генам при создании трансгенных культур растений могут служить репортерные гены, не обуславливающие селективных преимуществ, но позволяющие проводить визуальный отбор трансформированных клеток и тканей среди нетрансформированного материала. Репортерные гены применяют для улучшения эффективности систем отбора и регенерации трансгенных растений и часто включают в состав трансгенных конструкций наряду с селективными маркерными генами.

β-глюкуронидаза. Бактериальный фермент β-глюкуронидаза, кодируемый *uidA (gusA)* геном *E. coli*, является наиболее широко используемым репортерным геном в растениях. Для количественного анализа активности фермента используют широкий набор хромогенных и флуорогенных субстратов (в ходе реакции образуются окрашенные или флуоресцирующие продукты), а 5-бromo-4-хлоро-3-индолилглюкуронид (X-gal) является субстратом для определения гистологической локализации трансформированных тканей [278]. β-глюкуронидазная активность выявлена у микроорганизмов, беспозвоночных и позвоночных, и в очень малых количествах – у растений [279]. β-глюкуронидаза очень стабильна и нетоксична для растений даже при высоких уровнях экспрессии. Секретируемый, оптимизированный по кодонам для эффективной экспрессии в растениях, фермент GUS, выделенный из *Bacillus*, имеет высокую активность и стабилен при денатурирующих условиях [44]. Гистохимическая локализация экспрессии гена детектируется на

субклеточном уровне, например, в пластидах [280]. Главный недостаток репортерного гена *uidA* заключается в том, что в процессе исследования растительные клетки разрушаются.

Ген *uidA* часто включают в состав трансгенных конструкций наряду с селективными маркерными генами (*bar*, *nptII*), что приводит к визуализации трансформации дополнительно к селекции трансформантов.

Анализ аминокислотной последовательности β -глюкуронидазы не выявил в составе белка участков, характерных для известных аллергенов и токсинов. Фермент быстро разрушается под действием модельного желудочного сока. Человек и животные непрерывно получают β -глюкуронидазу от бактерий, населяющих кишечный тракт, или в результате потребления нетрансгенной пищи, что не ведет к проявлению вредных эффектов, поэтому низкие концентрации GUS белка в генетически модифицированных растениях не вызывают беспокойства относительно возможной токсичности или возникновения аллергических реакций [279].

Люцифераза светляков (LUC, E.C. 1.13.12.7) катализирует АТФ-зависимое окислительное декарбоксилирование люциферина с образованием оксилуциферина и выделением кванта света. Для проявления активности фермент не требует посттрансляционной модификации, имеет короткое время жизни в клетках, и вследствие этого активность люциферазы в тканях точнее отражает уровень трансформации в отличие от других репортерных белков, которые более стабильны и накапливаются в клетках в течение долгого времени. Активность фермента позволяет осуществлять высокочувствительный анализ экспрессии гена *luc* в клетках в реальном времени без разрушения клеток, что используется для анализа экспрессии белка в разных тканях в ходе развития растения [281-283]. Бактериальная люцифераза (LUX, E.C. 1.14.14.3), выделенная из *Vibrio harveyi*, также может быть использована в качестве репортерного белка при работе с растительными клетками [284].

Люцифераза часто используется в сочетании с другими маркерными генами в качестве внутреннего контроля и визуального маркера процесса трансформации для отбора трансгенного материала [285].

Зеленый флуоресцентный белок (GFP), выделенный из медузы *Aequorea victoria*, имеет следующие спектральные характеристики: максимумы поглощения – 395 нм и 475 нм, максимум флуоресценции – 509 нм, квантовый выход флуоресценции – 0,8; для проявления флуоресценции не требует дополнительных субстратов, устойчив к изменениям температуры, кислотности среды (pH), к разрушающим белки ферментам протеазам и разного рода химическим соединениям, которые вызывают денатурацию белков. В последнее время GFP широко используется для визуальной селекции трансформированного материала, а также применим в сочетании с другими маркерными генами в качестве внутреннего контроля процессов трансформации [286-287]. Несколько вариантов гена *gfp* создано путем мутаций или оптимизации кодонов с целью усиления активности, стабильности, растворимости и изменения локализации белка в растительной клетке [16, 288].

Большое преимущество GFP как репортерного белка заключается в возможности прямого наблюдения за флуоресцентной активностью белка в живых тканях в реальном времени, исключая любые инвазивные процедуры, что делает возможным выявлять клетки, экспрессирующие GFP, вскоре после трансформации и оценить, являются ли они делящимися. Это особенно важно при получении трансгенных линий зерновых культур, трудно подвергающихся трансформации. Применение GFP позволяет вручную визуально отбирать трансформированные ткани для улучшения последующей селекции с гербицидами или антибиотиками, что увеличивает эффективность трансформации. Данная стратегия широко используется для ядерной трансформации двудольных, голосеменных и зерновых растений [287-288]. Ген *gfp* также применяется в качестве репортерного гена в составе трансгенных конструкций наряду с селективными маркерными генами при

получении транспластомных культур с целью улучшения эффективности трансформации хлоропластов [165, 289].

Фитоинсинтетаза. Бактериальный ген фитоинсинтетазы, выделенный из *Erwinia herbicola*, может работать как репортерный ген, так как его присутствие в геноме изменяет путь биосинтеза каротиноидов в хлоропластах, что ведет к накоплению окрашенных каротиноидов. Фитоинсинтетаза катализирует синтез фитоина из геранилпирофосфата. Фитоин является предшественником каротиноида ликопена, придающего красную окраску томату. Фитоинсинтетаза из *Erwinia herbicola*, транспортируемая в хлоропласты и способствующая возникновению трансгенного оранжевого каллуса, может быть применена для мониторинга трансгенных растений. Окрашенные ткани могут быть затем выделены и культивированы для получения регенерированных полноценных трансгенных растений [44].

Оксалатоксидаза (ОхО, Е.С. 1.2.3.4) проявляет активность в некоторых зерновых культурах и отсутствует у двудольных. Ген ОхО, выделенный из пшеницы, может функционировать в качестве репортерного гена в однодольных и двудольных растениях. Исследования активности фермента проводятся с применением сравнительно недорогих субстратов (оксаловая кислота и 4-хлоро-1-нафтол) и позволяют быстро определить гистохимическую локализацию ферментативной активности, которая может быть измерена количественно [44].

Список использованных источников

1. Handbook of plant biotechnology / eds. P. Christou, H. Klee. – Wiley-VCH., 2004. – 1488 p.
2. Глик, Б. Р. Молекулярная биотехнология: принципы и применение: учебник / Б. Р. Глик, Д. Пастернак; пер. с англ. Н. В. Баскаковой [и др.] ; под ред. Н. К. Янковского. – М. : Мир, 2002. – 589 с. : ил. – (Лучший зарубежный учебник).
3. Щелкунов, С. Н. Генетическая инженерия : учеб. пособие для студентов вузов / С. Н. Щелкунов. – 2-е изд., испр. и доп. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2004. – 496 с. : ил.
4. Artsaenko O. Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies / O. Artsaenko [et al.] // Mol. Breed. – 1998. – V. 4. – P. 313-319.
5. Teli N. P. Recent developments in the use of transgenic plants for the production of human therapeutics and biopharmaceuticals / N. P. Teli, M. P. Timko // Plant Cell Tissue Organ Culture. – 2004. – V. 79. – P. 125-145.
6. Fischer R. Plant-based production of biopharmaceuticals / R. Fischer [et al.] // Curr. Opin. Plant Biol. – 2004. – V. 7. – P. 152-158.
7. Ma I. K. C. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants / I. K. C. Ma, P. M. W. Drake, P. Christou // Nat. Rev. Genet. – 2003. – V. 4. – P. 794-805.
8. Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии растений / Э. С. Пирузян. – М.: Наука, 1988. – 304 с.
9. Transgenic plants: methods and protocols / ed. L. Peña // Methods in molecular biology, v. 286. – Humana Press Inc., 2005. – 437 p.
10. Lessard P. A. Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants / P. A. Lessard [et al.] // Metabolic Engin. – 2002. – V. 4. – P. 67-79.

11. Christensen A. H. Ubiquitin promoter-based vectors for high level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants / A. H. Christensen, P. H. Quail // *Transgenic Res.* – 1996. – V. 5. – P. 213-218.
12. Toki S. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-bar chimeric gene in transgenic rice plants / S. Toki [et al.] // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 100. – P. 1503-1507.
13. Yoshida K. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor / K. Yoshida, A. Shinmyo // *J. Biosci. Bioeng.* – 2000. – V. 90. – P. 353-362
14. Zuo J. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes / J. Zuo, N.-H. Chua // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2000. – V. 11. – P. 146-151.
15. Tang W. Regulated gene expression with promoters responding to inducers / W. Tang, X. Luo, V. Samuel // *Plant Science.* – 2004. – V. 166. – P. 827-834.
16. Veluthambi K. The current status of plant transformation technologies / K. Veluthambi, A. K. Gupta, A. Sharma // *Current Science.* – 2003. – V. 84. – P. 368-380.
17. Darbani B. Dna-delivery methods to produce transgenic plants / B. Darbani [et al.] // *Biotechnology.* – 2008. – V. 7. – P. 385-402.
18. Li L. An improved rice transformation system using the biolistic approach / L. Li [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1993. – V. 12. – P. 50-55.
19. De la Riva G. A. *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation / G. A. De la Riva [et al.] // *Elect. J. Biotechnol.* – 1998. – V. 1. – P. 118-133.
20. Racoczy-Trijanowska M. Alternative methods of plant transformation / M. Racoczy-Trijanowska // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – V. 7. – P. 849-858.
21. Stanton B. G. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the gene-jockeying tool / B. G. Stanton // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – V. 67. – P. 16-37.

22. Chilton M. D. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis / M. D. Chilton [et al.] // Cell. – 1977. – V. 11. – P. 263-271.
23. Escobar M. A. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease / M. A. Escobar, A. M. Dandekar // Trends Plant. Sci. – 2003. – V. 8. – P. 380-386.
24. Армитидж Ф. Агробактериальные трансформирующие векторы растений / Ф. Армитидж, Р. Уолден, Дж. Дрейпер // В: Генная инженерия растений. Лабораторное руководство / Под ред. Дж. Дрейпера и др.; пер. с англ. Г. И. Эйснера, В. М. Андрианова. – М.: Мир, 1991. – 408 с.: ил.
25. Huffman G. A. Hairy root inducing plasmid: physical map and homology to tumor inducing plasmid / G. A. Huffman [et al.] // J. Bact. – 1984. – V. 157. – P. 269-276.
26. De Paolis A. Localization of agropine-synthesizing functions in the T_R-region of the root inducing plasmid of *A. rhizogenes* 1855 / A. De Paolis [et al.] // Plasmid. – 1985. – V. 13. – P. 1-7.
27. Zambryski P. Chronicles from the Agrobacterium-plant cell DNA transfer story / P. Zambryski // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1992. – V. 43. – P. 465-490.
28. Hooykaas P. J. J. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens* / P. J. J. Hooykaas, A. G. M. Beijersbergen // Annu. Rev. Phytopathol. – 1994. – V. 32. – P. 157-179.
29. Sheng J. Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel / J. Sheng, V. Citovsky // Plant Cell. – 1996. – V. 8. – P. 1699-1710.
30. Zupan J. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights / J. Zupan [et al.] // Plant J. – 2000. – V. 23 – P. 11-28.
31. Gelvin S. B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration / S. B. Gelvin // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 2000. – V. 51. – P. 223-256.

32. Tzfira T. Partners-in-infection: host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium* / T. Tzfira, V. Citovsky // Trends Cell Biol. – 2000. – V. 12. – P. 121-128.
33. Winans S. C. Two-way chemical signaling in *Agrobacterium*–plant interactions / S. C. Winans // Microbiol. Rev. – 1992. – V. 56. – P. 12-31.
34. Stachel S. E. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens* / S. E. Stachel [et al.] // Nature. – 1985. – V. 318. – P. 624-628.
35. Лутова Л. А. Генетическая инженерия растений: свершения и надежды / Л. А. Лутова // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6 (№ 10). – С. 10-17.
36. Vergunst A. C. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells / A. C. Vergunst [et al.] // Science. – 2000. – V. 290. – P. 979-982.
37. Rossi L. Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* / L. Rossi, B. Hohn, B. Tinland // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – V. 93. – P. 126-130.
38. Ziemienowicz A. Plant enzymes but not *Agrobacterium* VirD2 mediate T-DNA ligation in vitro / A. Ziemienowicz [et al.] // Mol. Cell Biol. – 2000. – V. 20. – P. 6317-6322.
39. van Attikum, H. Non-homologous end-joining proteins are required for *Agrobacterium* T-DNA integration / H. van Attikum, P. Bundock, P. J. J. Hooykaas // EMBO J. – 2001. – V. 20. – P. 6550-6558.
40. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии : учеб. для биол. спец. вузов / В. Н. Рыбчин ; СПбГТУ. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб. : Изд-во СПбГТУ, 2002. – 521 с.: ил.
41. De Frammond A. J. Mini-Ti: A new vector strategy for plant genetic engineering / A. J. De Frammond, K. A. Barton, M. D. Chilton // Bio/Technology. – 1983. – V. 5. – P. 262-269.

42. Hoekema A. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid / A. Hoekema [et al.] // Nature. – 1983. – V. 303. – P. 179-180.
43. Komori T. Current Status of Binary Vectors and Superbinary Vectors / T. Komori [et al.] // Plant Physiology. – 2007. – V. 145. – P. 1155-1160.
44. Miki B. Selectable marker genes in transgenic plants: application, alternatives and biosafety / B. Miki, S. McHugh // J. Biotechnology. – 2004. – V. 107. – P. 193-232.
45. Odell J. T. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter / J. T. Odell, F. Nagy, N. H. Chua // Nature. – 1985. – V. 313. – P. 810-812.
46. Depicker A. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence / A. Depicker [et al.] // J. Mol. Appl. Genet. – 1982. – V. 1. – P. 561-573.
47. Zhang W. Analysis of rice *Act1* 5' region activity in transgenic rice plants / W. Zang, D. McElroy, R. Wu // Plant Cell. – 1991. – V. 3. – P. 1155-1165.
48. Bevan M. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation / M. Bevan // Nucleic Acids Res. – 1984. – V. 12. – P. 8711-8721.
49. Jefferson R. A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system / R. A. Jefferson // Plant Mol. Biol. Rep. – 1987. – V. 5. – P. 387-405.
50. Hellens R. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors / R. Hellens, P. Mullineaux // Trends Plant Sci. – 2000. – V. 5. – P. 446-51.
51. Cambia [Электронный ресурс]: Сайт компании. – Режим доступа: <http://www.cambia.org>.
52. Hajdukiewicz P. The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation / P. Hajdukiewicz, Z. Svab, P. Maliga // Plant Mol. Biol. – 1994. – V. 25. – P. 989-994.
53. An G. New cloning vehicles for transformation of higher plants / G. An [et al.] // EMBO J. – 1985. – V. 4. – P. 277-284.
54. Komari T. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of

- transformants free from selection markers / T. Komari [et al.] // *Plant J.* – 1996. – V. 10. – P. 165-174.
55. Koncz C. The promoter of T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector / C. Koncz, J. Schell // *Mol. Gen. Genet.* – 1986. – V. 204. – P. 383-396.
56. Tao Q. Cloning and stable maintenance of DNA fragments over 300 kb in *Escherichia coli* with conventional plasmid-based vectors / Q. Tao, H.-B. Zhang // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – P. 4901-4909.
57. Hamilton C. M. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA / C. M. Hamilton // *Gene.* – 1997. – V. 200. – P. 107-116.
58. Liu Y.-G. Complementation of plant mutants with large genomic DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning / Y.-G. Liu [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – P. 6535-6540.
59. Komari T. Transformation of cultured cells of *Chenopodium quinoa* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542 / T. Komari // *Plant Cell Rep.* – 1990. – V. 9. – P. 303-306.
60. Hiei Y. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA / Y. Hiei [et al.] // *Plant J.* – 1994. – V. 6. – P. 271-282.
61. Ishida Y. Improved co-transformation of maize with vectors carrying two separate T-DNAs mediated by *Agrobacterium tumefaciens* / Y. Ishida [et al.] // *Plant Biotechnol.* – 2004. – V. 21. – P. 57-63.
62. Jin S. Genes responsible for the supervirulence phenotype of *Agrobacterium tumefaciens* A281 / S. Jin [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1987. – V. 169. – P. 4417-4425.
63. Hood E. E. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA / E. E. Hood [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1986. – V. 168. – P. 1291-1301.
64. Hood E. E. New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants / E. E. Hood [et al.] // *Transgenic Res.* – 1993. – V. 2. – P. 208-218.

65. Ow D. W. 2002. Recombinase-directed plant transformation for the post-genomic era. *Plant Mol. Biol.* 48, 183–200.
66. Grimsley N. “Agroinfection,” an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid / N. Grimsley [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1986. – V. 83. – P. 3282-3286.
67. Grimsley N. Agrobacterium-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants / N. Grimsley [et al.] // *Nature.* – 1987. – V. 325. – P. 177-179.
68. Dale P. J. Agroinfection of wheat: inoculation of in vitro grown seedlings and embryos / P. J. Dale [et al.] // *Plant Sci.* – 1989. – V. 63. – P. 237-245.
69. Dasgupta I. Rice tungro bacilliform virus DNA independently infects rice after Agrobacterium-mediated transfer / I. Dasgupta [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 1991. – V. 72. – P. 1215-1221.
70. Porta C. Viruses as vectors for the expression of foreign sequences in plants / C. Porta, G. P. Lomonosoff // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* – 2002. – V. 19. – P. 245-291.
71. Marillonnet S. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants / S. Marillonnet [et al.] // *Natl. Biotechnol.* – 2005. – V. 23. – P. 718-723.
72. Gleba Y. Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants / Y. Gleba [et al.] // *Vaccine.* – 2005. – V. 23. – P. 2042–2048.
73. Tenllado F. Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection / F. Tenllado, J. R. Diaz-Ruiz // *J. Virol.* – 2001. – V. 75. – P. 12288-12297.
74. Holzberg S. Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in a monocot plant / S. Holzberg [et al.] // *Plant J.* – 2002. – V. 30. – P. 315-327.
75. Lu R. Virus-induced gene silencing in plants / R. Lu [et al.] // *Methods.* – 2003. – V. 30. – P. 296-303.
76. Kopertekh L. PVX-Cre-mediated marker gene elimination from transgenic plants / L. Kopertekh, G. Juttner, J. Schiemann // *Plant Mol. Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 491-500.

77. Kopertekh L. Agroinfiltration as a tool for transient expression of Cre recombinase in vivo / L. Kopertekh, J. Schiemann // *Transgenic Res.* – 2005. – V. 14. – P. 793-798.
78. Jia H. Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a tobacco mosaic virus vector through agroinfection / H. Jia [et al.] // *Transgenic Res.* – 2006. – V. 15. – P. 375-384.
79. Hull A. K. Inducible expression in plants by virus-mediated transgene activation / A. K. Hull, V. Yusibov, V. Mett // *Transgenic Res.* – 2005. – V. 14. – P. 407-416.
80. Darbani B. Methods to produce marker-free transgenic plants / B. Darbani [et al.] // *Biotechnol. J.* – 2007. – V. 2. – P. 83-90.
81. Sanford I. C. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process / I. C. Sanford [et al.] // *Particulate Sci. Technol.* – 1987. – V. 5. – P. 27-37.
82. Sanford I. C. Optimizing the biolistic process for different biological applications / I. C. Sanford, F. D. Smith, I. A. Russell // *Methods Enzymol.* – 1993. – V. 217. – P. 483-509.
83. Southgate E. M. Factors affecting the genetic engineering of plants by microprojectile bombardment / E. M. Southgate [et al.] // *Biotechnol. Adv.* – 1995. – V. 13. – P. 631-651.
84. Taylor N. J. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology / N. J. Taylor, C. M. Fauquet // *DNA Cell Biol.* – 2002. – V. 21. – P. 963-977.
85. Mullen J. Biolistic transfer of large DNA fragments to tobacco cells using YACs retrofitted for plant transformation / J. Mullen [et al.] // *Mol. Breed.* – 1998. – V. 4. – P. 449-457.
86. Ercolano M. R. Functional complementation analysis in potato via biolistic transformation with BAC large DNA fragments / M. R. Ercolano [et al.] // *Mol. Breed.* – 2004. – V. 13. – P. 15-22.

87. Fu X. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns / X. Fu [et al.] // *Transgenic Res.* – 2000. – V. 9. – P. 11-19.
88. Francois I. E. J. A. Different approaches for multi-transgene-stacking in plants / I. E. J. A. Francois, W. F. Broekaert, B. P. A. Cammue // *Plant Sci.* – 2002. – V. 163. – P. 281-295.
89. Grevich J. J. Chloroplast genetic engineering: recent advances and future perspectives / J. J. Grevich, H. Daniell // *Crit. Rev. Plant Sci.* – 2005. – V. 24. – P. 83-107.
90. Zhang S. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells / S. Zhang [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1996. – V. 15. – P. 465-469.
91. Aziz N. Efficient male germ line transformation for transgenic tobacco production without selection / N. Aziz, G. C. Machray // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 51. – P. 203-211.
92. Dai S. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment / S. Dai [et al.] // *Mol. Breed.* – 2001. – V. 7. – P. 25-33.
93. Hansen G. Agrolistic transformation of plant cells: Integration of T-strands generated in planta / G. Hansen, M. D. Chilton // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1996. – V. 93. – P. 14978-14983.
94. Fromm M. Electroporation of DNA and RNA into plant protoplasts / M. Fromm [et al.] // In: *Methods in Enzymology*. V. 153. / eds. R. Wu, L. Grossman. – Academic Press, London, 1987. – P. 351-366.
95. Joersbo M. Electroporation: mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts / M. Joersbo, J. Brunstedt // *Physiol. Plant.* – V. 81. – P. 256-264.
96. Bates G. W. Genetic transformation of plants by protoplast electroporation / G. W. Bates // *Mol. Biotech.* – 1994. – V. 2. – P. 135-145.

97. Hui S. W. Effects of Pulse Length and Strength on Electroporation Efficiency / S. W. Hui // In: Methods in Molecular Biology. Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols. V. 55. / ed. J. A. Nickoloff. – Humana Press Inc: Totowa, NJ, 1995. – P. 29-40.
98. Weaver J. C. Electroporation Theory / J. C. Weaver // In: Methods in Molecular Biology. Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols. V. 55. / ed. J. A. Nickoloff. – Humana Press Inc: Totowa, NJ, 1995. – P. 3-28.
99. Shewry P. R. Opportunities for manipulating the seed protein composition of wheat and barley in order to improve quality / P. R. Shewry [et al.] // Transgenic Res. – 1994. – V. 3. – P. 3-12.
100. Higo K. Cloning and characterization of the rice CatA catalase gene, a homologue of the maize Cat3 gene / K. Higo, H. Higo // Plant Mol. Biol. – 1996. – V. 30. – P. 505-521.
101. Kao C.-Y. Localization and interaction of the *cis*-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS1, and light activation of the *C1* gene of maize / C.-Y. Kao [et al.] // Plant Cell. – 1996. – V. 8. – P. 1171-1179.
102. Ecker J. R. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA / J. R. Ecker, R. W. Davis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1986. – V. 83. – P. 5372-5376.
103. Teeri T. H. Chloroplast targeting of neomycin phosphotransferase II with a pea transit peptide in electroporated barley protoplasts / T. H. Teeri [et al.] // Plant Cell Rep. – 1989. – V. 8. – P. 187-190.
104. Fisk H. J. Nuclear localization of a foreign gene product in tobacco results in increased accumulation due to enhanced stability / H. J. Fisk, A. M. Dandekar // Plant Sci. – 1998. – V. 133. – P. 177-189.
105. Nagata T., Okada, K., Kawazu, T., and Takebe, I. (1987) Cauliflower mosaic virus 35 S promoter directs S phase specific expression in plant cells / T. Nagata [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1987. – V. 207. – P. 242-244.
106. D'Halluin K. Transgenic maize plants by tissue electroporation / K. D'Halluin [et al.] // The Plant Cell. – 1992. – V. 4. – P. 1495-1505.

107. Chowrira G. M. Electroporation-mediated gene transfer into intact nodal meristems in planta: Generating transgenic plants without in vitro tissue culture / G. M. Chowrira, V. Akella, P. F. Lurquin // *Mol. Biotechnol.* – 1995. – V. 3. – P. 17-23.
108. Saunders I. A. Pollen Electrotransformation in Tobacco / I. A. Saunders, B. F. Matthews // In: *Methods in Molecular Biology. Plant Cell Electroporation and Electrofusion Protocols. V. 55.* / ed. J. A. Nickoloff. – Humana Press Inc: Totowa, NJ, 1995. – P. 81-88.
109. Ahokas H. Transfection of germinating barley seed electrophoretically with exogenous DNA / H. Ahokas // *Theor. Applied Genet.* – 1989. – V. 77. – P. 469-472.
110. Griesbach R. J. An improved method for transforming plants through electrophoresis / R. J. Griesbach, J. Hammond // *Plant Sci.* – 1994. – V. 102. – P. 81-89.
111. Songstad D. D. Advances in alternative DNA delivery techniques / D.D. Songstad, D.A. Somers, R.J. Griesbach // *Plant Cell Tissue Organ Culture.* – 1995. – V. 40. – P. 1-15.
112. Vik N. I. Stable transformation of poinsettia via electrophoresis / N. I. Vik [et al.] // *Acta Horticult.* – 2001. – V. 560. – P. 101-103.
113. Paszkowski J. Direct gene transfer to plants / J. Paszkowski [et al.] // *EMBO J.* – 1984. – V. 3. – P. 2717-2722.
114. Schaefer D. I. A new moss genetic: Targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens* / D. I. Schaefer // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2002. – V. 53. – P. 477-501.
115. Bart R. A novel system for gene silencing using siRNAs in rice leaf and stem-derived protoplasts / R. Bart [et al.] // *Plant Methods.* – 2006. – V. 2. – P 13.
116. Buar A. A fast and flexible PEG-mediated transient expression system in plants for high level expression of secreted recombinant biopharmaceuticals / A. Buar [et al.] // *J. Biotechnol.* – 2005. – V. 119. – P. 332-342.
117. Gad A. E. Liposome-mediated gene delivery into plant cells / A. E. Gad, N. Rosenberg, A. Airman // *Physiol. Plant.* – 1990. – V. 79. – P. 177-183.

118. Fukunaga Y. An ultrastructural study of the interaction of liposomes with plant protoplasts / Y. Fukunaga [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 1983. – V. 144. – P. 181-189.
119. Almofti M. R. Lipoplex size determines lipofection efficiency with or without serum / M. R. Almofti [et al.] // *Mol. Membrane Biol.* – 2003. – V. 20. – P. 35-43.
120. Dekeyser R. A. Transient gene expression in intact and organized rice tissues / R. A. Dekeyser [et al.] // *Plant Cell.* – 1990. – V. 2. – P. 591-601.
121. Zhu Z. Transformation of wheat protoplasts mediated by cationic liposome and regeneration of transgenic plantlets / Z. Zhu [et al.] // *Chin. J. Biotechnol.* – 1993. – V. 9. – P. 257-261.
122. Sawahel W. A. The production of transgenic potato plants expressing human U-interferon using lipofection-mediated transformation / W. A. Sawahel // *Cell. Mol. Biol. Lett.* – 2002. – V. 7. – P. 19-29.
123. Wordragen M. V. Liposome-mediated transfer of YAC DNA to tobacco cells / M. V. Wordragen [et al.] // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1997. – V. 15. – P. 170-178.
124. Kaeppeler H. Silicon carbide fiber-mediated stable transformation of plant cells / H. Kaeppeler [et al.] // *Theor. Applied Genet.* – 1992. – V. 84. – P. 560-566.
125. Wang K. Whisker mediated plant transformation: an alternative technology / K. Wang [et al.] // *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 1995. – V. 31. – P. 101-104.
126. Petolino J. F. Whisker mediated transformation of embryogenic callus of maize / J. F. Petolino [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2000. – V. 19. – P. 781-786.
127. Komatsu A. Transgenic rice for animal feed with high tryptophan content generated by a selectable marker and vector backbone-free technology / A. Komatsu [et al.] // *Plant Biotechnol.* – 2006. – V. 23. – P. 39-46.
128. Brisibe E. A. Cytodifferentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat / E.A. Brisibe [et al.] // *J. Exp. Bot.* – 2000. – V. 51. – P. 187-196.
129. Dalton S. J. Transgenic plants of *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*, *Festuca arundinacea* and *Agrostis stolonifera* by silicon carbide fibre-mediated

- transformation of cell suspensions / S. J. Dalton [et al.] // *Plant Sci.* – 1998. – V. 132. – P. 31-43.
130. Singh N. Use of silicon carbide fibers for *Agrobacterium*-mediated transformation in wheat / N. Singh, H. S. Chawla // *Curr. Sci.* – 1999. – V. 76. – P. 1483-1485.
131. Crossway A. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts / A. Crossway [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1986. – V. 202. – P. 179-185.
132. Morikawa H. Capillary microinjection into protoplasts and intranuclear localization of injected materials / H. Morikawa, Y. Yamada // *Plant Cell Physiol.* – 1985. – V. 26. – P. 229-236.
133. Schnorf M. An improvement method for transformation of plant cells by microinjection; molecular and genetic analysis / M. Schnorf *Transgenic Res.* – 1991. – V. 1. – P. 23-30.
134. Griesbach R. J., Chromosome-mediated transformation via microinjection / R. J. Griesbach // *Plant Sci.* – 1987. – V. 50. – P. 69-77.
135. Neuhaus G. Transgenic rape seed plants obtained by microinjection of DNA into microspore derived embryoids / G. Neuhaus [et al.] // *Theor. Applied Genet.* – 1987. – V. 75. – P. 30-36.
136. Holm P. B. Transformation of barley by micromjection into isolated zygote protoplasts / P. B. Holm [et al.] // *Transgenic Res.* – 2000. – V. 9. – P. 21-32.
137. Touraev A. Plant male germ line transformation / A. Touraev [et al.] // *Plant J.* – 1997. – V. 12. – P. 949-956.
138. De la Pena A. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young floral tillers // A. De la Pena, H. Lorz, J. Schell // *Nature.* – 1987. – V. 325. – P. 274-276.
139. Luo Z. X. A simple method for the transformation of rice via pollen-tube pathway / Z. X. Luo, R. Wa // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1988. – V. 6. – P. 165-174.

140. Mu H. M. Transformation of wheat with insecticide gene of arrowhead proteinase inhibitors by pollen tube pathway and analysis of transgenic plants / H. M Mu [et al.] // I Chuan Hsueh Pao (Chinese). – 1999. – V. 26. – P. 634-642.
141. Hu C. Y. In-planta soybean transformation technologies developed in China: Procedure, confirmation and field performance / C. Y. Hu, L. Wang // In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. – 1999. – V. 35. – P. 417-420.
142. Tjokrokusumo D. Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation / D. Tjokrokusumo [et al.] // Plant Cell Rep. – 2000. – V. 19. – P. 792-797.
143. Wyber J. A. The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells / J. A. Wyber, J. Andrew, A. D'Emanuele // Phann. Res. – 1997. – V. 14. – P. 750-756.
144. Joersbo M. Direct gene transfer to plant protoplasts by mild sonification / M. Joersbo, I. Brunstedt // Plant Cell Rep. – 1990. – V. 9. – P. 207-210.
145. Joersbo M. Inoculation of sugar beet protoplasts with beet necrotic yellow vein virus particles by mild sonication / M. Joersbo, I. Brunstedt // J. Virol. Methods. – 1990. – V. 29. – P. 62-70.
146. Zhang L. J. Efficient transformation of tobacco by ultrasonication / L. J. Zhang [et al.] // Biotechnology. – 1991. – V. 9. – P. 996-997.
147. Trick H. N. SAAT: Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation / H.N. Trick, J.J. Finer // Transgenic Res. – 1997. – V. 6. – P. 329-
148. Tang W. Additional virulence genes and sonication enhance *Agrobacterium tumefaciens*-mediated loblolly pine transformation / W. Tang // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 21. – P. 555-562.
149. Bendich A. J. Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? / A. J. Bendich // BioEssays. – 1987. – V. 6. – P. 279-282.
150. Lilly J. W. Cytogenomic analyses reveal the structural plasticity of the chloroplast genome in higher plants / J. W. Lilly [et al.] // Plant Cell. – 2001. – V. 13. – P. 245-254.

151. Ohya K. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA / K. Ohya [et al.] // Nature. – 1986. – V. 322. – P. 572-574.
152. Shinozaki K. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression / K. Shinozaki [et al.] // EMBO J. – 1986. – V. 5. – P. 2043-2049.
153. Genome [Электронный ресурс]: база данных. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>. – 12.10.2009.
154. Даниленко И. Г. Миры геномов органелл / И. Г. Даниленко, О. Г. Давыденко. – Мн.: Тэхналогія, 2003. – 494 с.: ил.
155. Юрина Н. П. Сравнительная характеристика структурной организации геномов хлоропластов и митохондрий растений / Н. П. Юрина, М. С. Одинцова // Генетика. – 1998. – Т. 34. – С. 5-22.
156. Sugiura M. The chloroplast genome / M. Sugiura // Plant. Mol. Biol. – 1992. – V. 19. – P. 149-168.
157. Sugiura M. Evolution and mechanisms of translation in chloroplasts / M. Sugiura, T. Hirose, M. Sugita // Annu. Rev. Genet. – 1998. – V. 32. – P. 437-459.
158. Boynton J. E. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles / J. E. Boynton [et al.] // Science. – 1988. – V. 240. – P. 1534-1538.
159. Svab Z. Stable transformation of plastids in higher plants / Z. Svab., P. Hajdukiewicz, P. Maliga // Proc. Nat. Acad. Sci USA. – 1990. – V. 87. – P. 8526-8530.
160. Golds T. Stable plastid transformation in PEG-treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* / T. Golds, P. Maliga, H.-U. Koop // Bio/Technology. – 1993. – V. 11. – P. 95-97.
161. O'Neill C. Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems / C. O'Neill [et al.] // Plant J. – 1993. – V. 3. – P. 729-738.

162. Svab Z. High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric *aadA* gene / Z. Svab, P. Maliga // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 90. – P. 913-917.
163. Carrer H. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco / H. Carrer [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1993. – V. 241. – P. 49-56.
164. Huang F. C. Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection / F. C. Huang [et al.] // Mol. Gen. Genom. – 2002. – V. 268. – P. 19-27.
165. Sidorov V. A. Technical advance: Stable chloroplast transformation in potato: Use of green fluorescent protein as a plastid marker / V. A. Sidorov [et al.] // Plant J. – 1999. – V. 19. – P. 209-216.
166. Ruf S. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit / S. Ruf [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2001. – V. 219. – P. 870-875.
167. De Gray G. Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi / G. De Gray [et al.] // Plant Physiol. – 2001. – V. 127. – P. 852-862.
168. De Cosa B. Overexpression of the *Bt cry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals / B. De Cosa [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2001. – V. 19. – P. 71-74.
169. Kunnimalaiyaan M. Analysis of the tobacco chloroplast DNA replication origin (*oriB*) downstream of the 23S rRNA gene / M. Kunnimalaiyaan, F. Shi, B. L. Nielsen // J. Mol. Biol. – 1997. – V. 268. – P. 273-283.
170. Lugo S. K. Required sequence elements for chloroplast DNA replication activity in vitro and in electroporated chloroplasts / S. K. Lugo [et al.] // Plant Sci. – 2004. – V. 166. – P. 151-161.

171. Guda C. Stable expression of biodegradable protein based polymer in tobacco chloroplasts / C. Guda, S. B. Lee, H. Daniell // *Plant Cell Rep.* – 2000. – V. 19. – P. 257-262.
172. Kumar S. Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance / S. Kumar, A. Dhingra, H. Daniell // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 136. – P. 2843-2854.
173. Staub J. M. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts / J. M. Staub [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – V. 18. – P. 333-338.
174. Birch-Machin I. Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability / I. Birch-Machin [et al.] // *Plant Biotechnol.* – 2004. – V. 2. – P. 261-270.
175. Tregoning J. S. Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplasts / J. S. Tregoning [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – P. 1174-1179.
176. Sykdar S. R. Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana* / S. R. Sykdar [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1998. – V. 18. – P. 20-24.
177. Hou B. K. Chloroplast transformation in oilseed rape / B. K. Hou [et al.] // *Transgenic Res.* – 2003. – V. 12. – P. 111-114.
178. Zubko M. K. Stable transformation of petunia plastids / M. K. Zubko [et al.] // *Transgenic Res.* – 2003. – V. 13. – P. 523-530.
179. Kumar S. Manipulation of gene expression facilitates cotton plastid transformation of cotton by somatic embryogenesis and maternal inheritance of transgenes / S. Kumar, A. Dhingra, H. Daniell // *Plant Mol. Biol.* – 2004. – V. 56. – P. 203–216.
180. Dufourmantel N. Generation of fertile transplastomic soybean / N. Dufourmantel [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2004. – V. 55. – P. 479-89.
181. Daniell H. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology / H. Daniell, M. S. Khan, L. Allison // *Trends Plant Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 84-91.

182. Maliga P. Engineering the plastid genome of higher plants / P. Maliga // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2002. – V. 5. – P. 164-172.
183. Iamtham S. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids / S. Iamtham, A. Day // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – V. 18. – P. 1172-1176.
184. Dufourmantel N. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance / N. Dufourmantel [et al.] // *Plant Biotechnol. J.* – 2007. – V. 5. – P. 118-133.
185. Kode V. Isolation of precise plastid deletion mutants by homology-based excision: a resource for site-directed mutagenesis, multi-gene changes and high-throughput plastid transformation / V. Kode [et al.] // *Plant J.* – 2006. – V. 46. – P. 901-909.
186. Corneille S. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system / S. Corneille [et al.] // *Plant J.* – 2001. – V. 72. – P. 171-178.
187. Hajdukiewicz P. T. J. Multiple pathways for Cre/lox-mediated recombination in plastids / P. T. J. Hajdukiewicz, L. Gilbertson, J. M. Staub // *Plant J.* – 2001. – V. 27. – P. 161-170.
188. Lutz K. A. Plastid marker gene excision by transiently expressed CRE recombinase / K. A. Lutz, M. H. Bosacchi, P. Maliga // *Plant J.* – 2006. – V. 45. – P. 447-456.
189. Kittiwongwattana C. Plastid marker gene excision by the phiC31 phage site-specific recombinase / C. Kittiwongwattana [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 2007.
190. Carrer H. Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genomes without physical linkage to the selectable marker gene / H. Carrer, P. Maliga // *Biotechnol.* – 1995. – V. 13. – P. 791-794.
191. Ye G. N. Persistence of unselected transgenic DNA during a plastid transformation and segregation approach to herbicide resistance / G. N. Ye [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 133. – P. 402-410.

192. Klaus S. M. J. Generation of marker-free plastid transformants using a transiently cointegrated selection gene / S. M. J. Klaus [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2004. – V. 22. – P. 225-229.
193. Daniell H. Antibiotic-free chloroplast genetic engineering – an environmentally friendly approach / H. Daniell, P. Wiebe, A. Fernandez-San Millan // Trends in Plant Sci. – 2001. – V. 6. – P. 237-239.
194. McBride K. E. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco / K. E. McBride [et al.] // Bio/Technology. – 1995. – V. 13. – P. 362-365.
195. Bogorad L. Engineering chloroplasts: An alternative site for foreign genes, proteins, reactions and products / L. Bogorad // Trends Biotechnol. – 2000. – V. 18. – P. 257-263.
196. Daniell H. Expression of cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts / H. Daniell [et al.] // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 311. – P. 1001-1009.
197. Molina A. High yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts / A. Molina [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2004. – V. 2. – P. 141-153.
198. Leelavathi S. Overproduction of an alkali- and thermo-stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme / S. Leelavathi [et al.] // Mol. Breed. – 2003. – V. 11. – P. 59-67.
199. Hauptmann R. M. Transient expression of electroporated DNA in monocotyledonous and dicotyledonous species / R. M. Hauptmann [et al.] // Plant Cell Rep. – 1987. – V. 6. – P. 265-70.
200. Vasil I. K. Molecular improvement of cereals / I. K. Vasil // Plant Mol. Biol. – 1994. – V. 25. – P. 925-937.
201. Hare P. D. Excision of selectable marker genes from transgenic plants / P. D. Hare, N.-H. Chua // Nat. Biotechnol. – 2002. – V. 20. – P. 575- 580.

202. Puchta H. Marker-free transgenic plants / H. Puchta // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2003. – V. 74. – P. 123-134.
203. Cheung A. Y. Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene / A. Y. Cheung [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1998. – V. 85. – P. 391-395.
204. Nap J.-P. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants / J.-P. Nap, J. Bijvoet, W. J. Stiekema // *Trans. Res.* – 1992. – V. 1. – P. 239-249.
205. Shaw K. J. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes / K. J. Shaw [et al.] // *Microbiol. Rev.* – 1993. – V. 57. – P. 138-163.
206. Davies J. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics / J. Davies, G. D. Wright // *Trends Microbiol.* – 1997. – V. 5. – P. 234-240.
207. Bevan M. W. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation / M. W. Bevan, R. B. Flavell, M.-D. Chilton // *Nature*. – 1983. – V. 304. – P. 184-187.
208. Herrera-Estrella L. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells / L. Herrera-Estrella [et al.] // *EMBO J.* – 1983. – V. 2. – P. 987-995.
209. Yenofsky R. L. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure / R. L. Yenofsky, M. Fine, J. W. Pellow // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1990. – V. 87. – P. 3435-3439.
210. Maas C. Expression of intron modified *NPTII* genes in monocotyledonous and dicotyledonous plant cells / C. Maas [et al.] // *Mol. Breeding*. – 1997. – V. 3. – P. 15-28.
211. Paszkowski J. Expression in transgenic tobacco of the bacterial neomycin phosphotransferase gene modified by intron insertions of various sizes / J. Paszkowski [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – V. 19. – P. 825-836.
212. Libiakova G. Efficacy of an intron-containing kanamycin resistance gene as a selectable marker in plant transformation / G. Libiakova [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2001. – V. 20. – P. 610-615.

213. Fuchs R. L. Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein / R. L. Fuchs [et al.] // *Biotechnology*. – 1993. – V. 11. – P. 1543-1547.
214. Redenbaugh K. Aminoglycoside 3'-phosphotransferase II (APH (3') II): Review of its safety and use in the production of genetically engineered plants / K. Redenbaugh [et al.] // *Food Biotechnol.* – 1994. – V. 8. – P. 137-165.
215. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (Question N EFSA-Q-2003-109) / Opinion adopted on 2 April 2004 // *The EFSA Journal*. – 2004. – V. 48. – P. 1-18.
216. Ouakfaoui S. The stability of the *Arabidopsis* transcriptome in transgenic plants expressing the marker genes *nptII* and *uidA* / S. Ouakfaoui, B. Miki // *Plant J.* – 2005. – V. 41. – P. 791-800.
217. Taylor S. L. Food Allergens: Structure and Immunologic Properties / S. L. Taylor [et al.] // *Ann. Allergy*. – 1987. – V. 59. – P. 93-99.
218. Flavell R. B. Selectable marker genes: safe for plants / R. B. Flavell [et al.] // *Biotechnology*. – 1992. – V. 10. – P. 141-144.
219. WHO. Health aspects of markers in genetically modified plants / Report of a WHO workshop // World Health Organization, Geneva. – 1993.
220. Rao R. N. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli* / R. N. Rao [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1983. – V. 24. – P. 689-695.
221. van den Elzen P. J. M. A chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells / P. J. M. van den Elzen [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – V. 5. – P. 299-302.
222. Ortiz J. P. A. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation / J. P. A. Ortiz [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1996. – V. 15. – P. 877-881.
223. Tian L.-N. Hygromycin resistance is an effective selectable marker for biolistic transformation of black spruce (*Picea mariana*) / L.-N. Tian [et al.] // *Plant Cell. Rep.* – 2000. – V. 19. – P. 358-362.

224. Twyman R. M. Selectable and screenable markers for rice transformation / R. M. Twyman [et al.] // Mol. Methods Plant Anal. – 2002. – V. 22. – P. 1-17.
225. Van den Eede G. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from GM plants / G. Van den Eede [et al.] // Food Chem. Toxicol. – 2004. – V. 42. – P. 1127-1156.
226. Mazodier P. Completion of the nucleotide sequence of the central region of Tn5 confirms the presence of three resistance genes / P. Mazodier [et al.] // Nucleic Acids Res. – 1985. – V. 13. – P. 195-205.
227. Maliga P. Improved expression of streptomycin resistance in plants due to a deletion in the streptomycin phosphotransferase coding sequence / P. Maliga [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1988. – V. 214. – P. 456-459.
228. Hayford M. B. Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferases / M. B. Hayford [et al.] // Plant Physiol. – 1988. – V. 86. – P. 1216-1222.
229. Perez P. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation / P. Perez [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1989. – V. 13. – P. 365-373.
230. Guerineau F. Sulfonamide resistance gene for plant transformation / F. Guerineau [et al.] // Plant Mol. Biol. – 1990. – V. 15. – P. 127-136.
231. Wallis J. G. Genetic transformation with the *sulI* gene: a highly efficient selectable marker for *Solanum tuberosum* L. cv. 'Russet Burbank' / J. G. Wallis, K. Dziewanowska, D. J. Guerra // Mol. Breeding. – 1996. – V. 2. – P. 283-290.
232. Jelenska J. Streptothricin resistance as a novel selectable marker for transgenic plant cells / J. Jelenska [et al.] // Plant Cell. Rep. – 2000. – V. 19. – P. 298-303.
233. De Block M. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny / M. De Block [et al.] // EMBO J. – 1984. – V. 3. – P. 1681-1689.
234. Lindsey K. Genetic manipulation of crop plants / K. Lindsey // J. Biotech. – 1992. – V. 26. – P. 1-28.

235. Thompson C. J. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* / C. J. Thompson [et al.] // EMBO J. – 1987. – V. 6. – P. 2519-2523.
236. Wohlleben W. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum* / W. Wohlleben [et al.] // Gene. – 1988. – V. 70. – P. 25-37.
237. Murakami T. The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: molecular cloning and characterization of the gene cluster / T. Murakami [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1986. – V. 205. – P. 42-50.
238. Petersen W. Biosafety consideration for selectable and scorable markers used in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) biotechnology / W. Petersen [et al.] // Environ. Biosafety Res. – 2005. – V. 4. – P. 89-102.
239. Comai L. An altered *aroA* gene product confers resistance to the herbicide glyphosate / L. Comai [et al.] // Science. – 1983. – V. 221. – P. 370-371.
240. della Cioppa G. Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants / G. della Cioppa [et al.] // Biotechnology. – 1987. – V. 5. – P. 579-584.
241. Clemente T. E. Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium*-mediated transformation / T. E. Clemente [et al.] // Crop Sci. – 2000. – V. 40. – P. 797-803.
242. Shah D. M. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants / D. M. Shah [et al.] // Science. – 1986. – V. 233. – P. 478-481.
243. Oxtoby E. Engineering herbicide tolerance into crops / E. Oxtoby, M. A. Hughes // Trends Biotech. – 1990. – V. 8. – P. 61-65.
244. Howe A. R. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants / A. R. Howe [et al.] // Mol. Breeding. – 2002. – V. 10. – P. 153-164.
245. Singh B. K. Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field / B. K. Singh, D. L. Shaner // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 935-944.

246. Chaleff R. S. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures / R. S. Chaleff, C. J. Mauvais // *Science*. – 1984. – V. 223. – P. 1148-1151.
247. Ray T. B. Site of action of chlorsulfuron / T. B. Ray // *Plant Physiol.* – 1984. – V. 75. – P. 827-831.
248. Haughn G. W. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides / G. W. Haughn [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1988. – V. 211. – P. 266-271.
249. Mourad G. A double mutant allele, *crs1-4*, of *Arabidopsis thaliana* encodes an acetolactase synthase with altered kinetics / G. Mourad, D. Williams, J. King // *Planta*. – V. 196. – P. 64-68.
250. Wilmink A. Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants / A. Wilmink, J. J. M. Dons // *Plant Mol. Biol. Rep.* – 1993. – V. 11. – P. 165-185.
251. Fromm M. E. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants / M. E. Fromm [et al.] // *Biotechnology*. – 1990. – V. 8. – P. 833-839.
252. Aragao F. J. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency / F. J. L. Aragao [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* – 2000. – V. 101. – P. 1-6.
253. Gough K. C. Cyanobacterial GR6 glutamate-1-semialdehyde aminotransferase: a novel enzyme-based selectable marker for plant transformation / K. C. Gough [et al.] // *Plant Cell. Rep.* – 2001. – V. 20. – P. 296-300.
254. Kunze I. 2-Deoxyglucose resistance: a novel selection marker for plant transformation / I. Kunze [et al.] // *Mol. Breeding*. – 2001. – V. 7. – P. 221-227.
255. Goddijn O. J. M. A chimeric tryptophan decarboxylase gene as a novel selectable marker in plant cells / O. J. M. Goddijn [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1993. – V. 22. – P. 907-912.

256. Brisson N. Nucleotide sequence of the dihydrofolate-reductase gene borne by the plasmid R67 and conferring methotrexate resistance / N. Brisson, T. Hohn // *Gene*. – 1984. – V. 28. – P. 271-275.
257. Irdani T. Construction of a new vector conferring methotrexate resistance in *Nicotiana tabacum* plants / T. Irdani [et al.] // *Plant Mol. Biol.* – 1998. – V. 37. – P. 1079-1084.
258. Eichholtz D. A. Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants / D. A. Eichholtz [et al.] // *Somatic Cell Mol. Genet.* – 1987. – V.13. – P. 67–76.
259. Haldrup A. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry / A. Haldrup, S. G. Petersen, F. T. Okkels // *Plant Cell. Rep.* – 1998. – V. 18. – 76-81.
260. Haldrup A. The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using d-xylose as the selection agent / A. Haldrup, S. G. Petersen, F. T. Okkels // *Plant Mol. Biol.* – 1998. – V. 37. – P. 287-296.
261. Stein J. C. Mannose induces an endonuclease responsible for DNA laddering in plant cell / J. C. Stein, G. Hansen // *Plant Physiol.* – 1999. – V.121. – P. 1-9.
262. Miles J. S. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli* / J. S. Miles, J. R. Guest // *Gene*. – 1984. – V. 32. – P. 41-48.
263. Wright M. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the selectable marker / M. Wright [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 2001. – V. 20. – P. 429-436.
264. Joersbo M. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet / M. Joersbo [et al.] // *Mol. Breed.* – 1998. – V. 4. – P. 111-117.
265. Reed J. Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation / J. Reed [et al.] // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* – 2001. – V. 37. 127-132.

266. Lucca P. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent / P. Lucca, X. Ye, I. Potrykus // *Mol. Breeding*. – 2001. – V. 7. – P. 43-49.
267. Privalle L. Phosphomannose isomerase, a novel plant selection system. Potential allergenicity assessment / L. Privalle // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2002. – V. 964. – P. 129-138.
268. Joersbo M. A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection / M. Joersbo, F. T. Okkels // *Plant Cell Rep.* – 1996. – V. 16. – P. 219-221.
269. Sugiyama M. Organogenesis in vitro / M. Sugiyama // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 1999. – V. 2. – P. 61-64.
270. Ebinuma H. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene / H. Ebinuma [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – P. 2117-2121.
271. Endo S. The isopentyl transferase gene is effective as a selectable marker gene for plant transformation in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Petite Havana SR1) / S. Endo [et al.] // *Plant Cell. Rep.* – 2001. – V. 20. – P. 60-66.
272. Takei K. Identification of genes encoding adenylate isopentyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana* / K. J. Takei, H. Skakibara, T. Sugiyama // *Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. P. 26405–26410.
273. Sun J. The *Arabidopsis* AtIPT8/PGA22 gene encodes an isopentyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis / J. Sun [et al.] // *Plant Physiol.* – 2003. – V. 131. – P. 167-176.
274. Kunkel T. Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation / T. Kunkel, Y.-S. Chan, N.-H. Chua // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – V. 17. – P. 916-919.
275. Kakimoto T. CK1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction / T. Kakimoto // *Science*. – V. 274. – P. 982-985.

276. Zuo J. Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes / J. Zuo [et al.] // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2002. – V. 13. – P. 173-180.
277. Rommens C. M. Crop improvement through modification of the plant's own genome / C. M. Rommens [et al.] // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 135. – P. 421-431.
278. Jefferson R. A. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants / R. A. Jefferson, T. A. Kavanaugh, M. W/ Bevan // *EMBO J.* – 1987. – V. 6. – P. 3901-3907.
279. Gilissen L. J. W. Biosafety of *E. coli* β -glucuronidase (GUS) in plants / L. J. W. Gilissen [et al.] // *Trans. Res.* – 1998. – V. 7. – P. 157-163.
280. Daniell H. Transient expression of β -glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli / H. Daniell, M. Krishnan, B. F. McFadden // *Plant Cell. Rep.* – 1991. – V. 9. – P. 615-619.
281. Ow D. W. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants / D. W. Ow [et al.] // *Science.* – 1986. – V. 234. – P. 856-859.
282. Millar A. J. Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants / A. J. Millar [et al.] // *Plant. Mol. Biol. Rep.* – 1992. – V. 10. – P. 324-337.
283. Verhees J. Characterization of gene expression during potato tuber development in individuals and populations using the luciferase reporter system / J. Verhees, A. R. van der Krol, D. Vreugdenhil // *Plant Mol. Biol.* – 2002. – V. 50. – P. 653-665.
284. Koncz C. Expression and assembly of functional bacterial luciferase in plants / C. Koncz [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1987. – V. 84. – P. 131-135.
285. Lonsdale D. M. Using firefly luciferase to identify the transition from transient to stable expression in bombarded wheat scutellar tissue / D. M. Lonsdale [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1998. – V. 102. – P. 447-453.

286. Ahlandsberg S. Green fluorescent protein as a reporter system in the transformation of barley cultivars / S. Ahlandsberg [et al.] // *Physiol. Plant.* – 1999. – V. 107. – P. 194-200.
287. Jordan M. C. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation / M. C. Jordan // *Plant Cell. Rep.* – 2000. – V. 19. – P. 1069-1075.
288. Stewart C. N. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants / C. N. Stewart // *Plant Cell. Rep.* – 2001. – V. 20. – P. 376-382.
289. Khan S. M. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants / S. M. Khan, P. Maliga // *Nat. Biotechnol.* – 1999. – V. 17. – P. 910-915.