

УДК 581.1.577.2:602.6

ТРАНСПЛАСТОМНЫЕ РАСТЕНИЯ: ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПУТИ ИХ РЕШЕНИЯ

© 2022 г. С. М. Розов^а, *, Ю. В. Сидорчук^а, Е. В. Дейнеко^а

^аФедеральный исследовательский центр “Институт цитологии и генетики”
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: rozov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 31.07.2021 г.

После доработки 02.09.2021 г.

Принята к публикации 02.09.2021 г.

Основной проблемой производства трансгенных белков в растительных системах экспрессии остается низкий уровень их накопления. Транспластомные растения со встройкой трансгена не в ядерный геном, а в геном пластид – пластом – позволяют в ряде случаев увеличить выход целевого белка в десятки и более раз. Но здесь возникают две основные проблемы: низкая частота интеграции трансгенов в геном пластид и сложности получения гомопластомных и гомопластидных растений. В последние годы наметился ряд тенденций для преодоления этих трудностей. Первая проблема решается совершенствованием систем доставки экзогенной ДНК и тонким дизайном векторов, вторая – многоступенчатым отбором на нескольких антибиотиках и использованием для трансформации дедифференцированных тканей. Подробному рассмотрению этих проблем и их решениям и посвящен настоящий обзор.

Ключевые слова: гомопластидность, гомопластомность, транспластомные растения, экспрессия трансгенов, эффективность трансформации пластид

DOI: 10.31857/S0015330322020154

ВВЕДЕНИЕ

Пластиды, самыми известными из которых являются хлоропласты, представляют собой независимо делящиеся полуавтономные органеллы растительной клетки. Помимо хлоропластов существуют различные формы пластид, такие как пропластиды, этиопласты, амилопласты, хромопласты и некоторые другие [1, 2]. Они выполняют не только фотосинтетические, но и другие важнейшие функции в растительной клетке, например, синтез жирных кислот, аминокислот, витаминов и пигментов, хотя этот список гораздо шире [3, 4].

Пластиды имеют собственный геном (пластом), доступный для различных генетических манипуляций. Пластом, представленный кольцевой ДНК, обычно имеет сравнительно небольшие размеры (~150 т.п.н.) и содержит около 120 генов. Каждая пластида содержит около 100 копий пластома. Способность пластома автономно реплицироваться в клетке делает пластиды уникальной и очень эффективной биологической “фабри-

кой”. Структура генома пластид, опероноподобная организация генов, наличие бактериоподобной РНК-полимеразы и 70S рибосомы отражают происхождение пластид от древних свободноживущих цианобактерий. Пластиды также способны к посттранскрипционному процессингу мРНК [5]. Регуляция экспрессии генов в пластидах осуществляется как на транскрипционном, так и посттранскрипционном уровнях, включая стабилизацию мРНК и воздействие различными трансляционными факторами [6, 7].

В последние годы пластидная трансформация становится крайне привлекательной для сферы биотехнологии, так как обладает целым рядом преимуществ по сравнению с ядерной трансформацией. Во-первых, если при использовании обычных методов трансформации встраивание трансгена в ядерный геном происходит в случайный район по механизму NHEJ, то в пластидах, как в прокариотических структурах, встраивание идет преимущественно по механизму гомологической рекомбинации (HR). Это дает возможность точного помещения трансгена в заданный район пластома и позволяет избежать эффекта положения и перекрытия с собственными генами пластома. Во-вторых, так как в пластидах гены транскрибируются в составе оперонов, появляется возмож-

Сокращения: ОРБ – общий растворимый белок, CS-SWNTs – однослойные углеродные нанотрубочки с хитозаном, DSB – двухцепочечный разрыв, HR – гомологичная рекомбинация, NEPs – nuclear-encoded RNA polymerases, NHEJ – нехомологичное сращивание концов, PEP – plastid-encoded RNA polymerase, sgRNA – одноцепочечная направляющая РНК, UTRs – нетранслируемые области.

ность встраивать сразу несколько генов экзогенных метаболических путей, создавая в пластидах искусственные опероны. В-третьих, транспластомные растения содержат трансгены не в одной или двух копиях на клетку, как это обычно бывает при ядерном трансгенезе, а по одной копии в каждом из ~100 элементарных пластов во всех из ~100 хлоропластов клетки, т. е. до 10000 копий [8]. В сочетании с еще двумя особенностями пластид: природной способностью экспрессировать большие количества генных продуктов и отсутствием генного сайленсинга и эпигенетических модификаций [9], количество аккумулированного трансгенного белка, экспрессируемого в пластидах может быть в 10–100 раз больше, чем при ядерной экспрессии [10, 11], и может достигать 70% всего растворимого белка растения, без значительного ущерба для его жизнеспособности [12]. Еще одной важной особенностью пластид является их наследование по материнской линии. Это позволяет поддерживать стабильную экспрессию трансгена даже в случае переопыления и исключает перенос рекомбинантных генов с пыльцой на другие растения. Наконец, каждая пластида представляет собой изолированный компартмент. Хотя понятно, что многие метаболиты могут частично выходить в цитозоль, все же большая их часть и генетический материал защищены двойной мембраной пластиды и изолированы от катаболических ферментов цитоплазмы. Для некоторых вакцин, синтезированных в пластидах *Chlamydomonas reinhardtii* и хранящихся в виде лиофилизированных клеток при комнатной температуре, показана их стабильность и активность по крайней мере через 0.5 и 1.5 года [13, 14].

Первые трансформации пластид были осуществлены у одноклеточной водоросли *Ch. reinhardtii* и у табака более 25 лет назад [15, 16]. За последующие годы круг видов растений с трансформированными пластидами расширился медленно и с большими трудностями. Тем не менее, были получены транспластомные растения томатов (*Solanum lycopersicum*), картофеля (*Solanum tuberosum*), салата (*Lactuca sativa*), сои (*Glycine max*), кочанной капусты (*Brassica oleracea var. capitata*), цветной капусты (*Brassica oleracea var. botrytis*), сахарной свеклы (*Beta vulgaris*), баклажана (*Solanum melongena*), моркови (*Daucus carota*), хлопчатника (*Gossypium hirsutum*) и тополя (*Populus alba*) [17, 18]. Совсем недавно были достигнуты значительные успехи в получении фертильных транспластомных растений *Arabidopsis thaliana* [19]. В транспластомных растениях сейчас успешно синтезируется широкий спектр белков различного назначения. В хлоропластах в тех или иных масштабах уже синтезируется несколько десятков различных белков: это антигены, рекомбинантные вакцины, моноклональные антитела, различные ферменты для медицинского и промышленного применения [20–23].

Таким образом, транспластомные растения являются крайне перспективными в плане промышленного получения широкого круга биопрепаратов. Тем не менее, на сегодняшний день существует ряд проблем, ограничивающих использование транспластомных растений в качестве биореакторов. Эти проблемы сводятся к двум основным – это (1) низкая вероятность трансформации пластидного генома и (2) сложность отбора для получения гомопластомных и гомопластидных растений. Первая связана с необходимостью конструирования особых видоспецифичных рекомбинационных каскадов. Кроме того, немалую роль в повышении эффективности трансформации играют и способы доставки этих каскадов в растительную клетку. Вместе с этим, очень важным моментом в повышении интенсивности биосинтеза целевого белка является многоступенчатый отбор на нескольких антибиотиках и разработка специальных схем селекции для достижения гомопластомности и гомопластидности растительных клеток. Подробному рассмотрению этих вопросов и посвящен предлагаемый обзор.

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧАСТОТЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ПЛАСТИДНОГО ГЕНОМА

Повышение частоты интеграции целевых генов в пластиды остается одной из основных проблем использования пластид в биотехнологии. Эта проблема комплексная, и решается она на разных уровнях. К ним относятся методы доставки экзогенной ДНК в пластиды, дизайн видоспецифичных экспрессионных каскадов (оптимально подобранные промоторы, 5'- и 3'- регуляторные UTRs), а также выбор места интеграции в пластома и использование инструментария адресного геномного редактирования.

Методы доставки экзогенной ДНК в геном пластид. Наиболее часто используемыми методами доставки чужеродной ДНК в пластиды являются биобаллистика, то есть доставка с помощью золотых или вольфрамовых микрочастиц [24], и трансфекция в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ). К сожалению, второй метод требует получения протопластов, то есть удаления клеточной стенки [25]. Метод биобаллистической доставки может быть использован для клеток практически всех видов растений, так как позволяет варьировать множество параметров генной пушки: расстояние до мишени, давление в вакуумной и разрывной камерах, размер микрочастиц и концентрацию ДНК. Это позволяет приспособиться к той или иной структуре оболочки растительных клеток. Культивирование протопластов в присутствии везикул из ПЭГ, покрытых плазмидной ДНК, приводит к поглощению этой ДНК протопластами с последующей интеграцией ее в пластидный геном [25]. С одной стороны, метод с использова-

нием ПЭГ более трудоемок, так как требует лизиса клеточных стенок и получения протопластов, с другой — более экономичен, так как не требует дорогого оборудования.

Недавно была разработана совершенно новая стратегия трансформации пластид с помощью наночастиц, не требующая ни получения протопластов, ни использования генной пушки [26]. Этот метод позволяет доставлять ДНК в хлоропласты клеток листьев с помощью однослойных карбоновых нанотрубочек (SWNTs). Эти наноносители представляют собой ассоциированные с хитозаном карбоновые нанотрубочки (CS-SWNTs). Они несут положительный заряд и за счет электростатических взаимодействий могут связывать отрицательно заряженную плазмидную ДНК. Такой ДНК-SWNT конъюгат при инфильтрации в листья растения может легко проникать через клеточную стенку в клетки мезофилла, а затем по механизму обменного липидного проникновения (LEEP) легко проходить через двойную липидную мембрану хлоропласта [26]. Основа этой стратегии доставки в хлоропласты состоит в том, что ДНК может селективно высвобождаться внутри хлоропласта из комплекса ДНК-SWNT за счет разницы рН цитозоля и среды хлоропласта. Слабокислый цитозоль клеток мезофилла удерживает ДНК в комплексе с хитозаном, тогда как в слабощелочной среде хлоропласта ДНК легко высвобождается. Это приводит к значительному накоплению ДНК в хлоропластах. Действительно, до 35% SWNT мигрирует в хлоропласты, и до 88% хлоропластов содержат SWNT [26]. Это несопоставимо больше, чем при биобаллистической или ПЭГ-опосредованной трансформации хлоропластов. Более того, эффективность доставки ДНК в хлоропласты в основном зависит от размеров и гидродинамических свойств SWNT, а не от концентрации ДНК. Авторы использовали в своих экспериментах количество ДНК в 1000 раз меньше, чем при ПЭГ-опосредованной трансформации, и в 250 раз меньше, чем при биобаллистике, а также ген *YFP* (Yellow Fluorescence Protein) в качестве репортера. Интенсивная флуоресценция, ассоциированная с хлоропластами, наблюдалась при соотношении ДНК : SWNT равном 1 : 6, но исчезала при соотношении — 1 : 1. Избыток ДНК, связанной с SWNT, видимо, нейтрализует их поверхностный заряд, что приводит к потере их способности проникать через мембраны [26]. Авторы продемонстрировали эффективность SWNT-метода доставки ДНК в хлоропласты на 4 видах растений, принадлежащих разным семействам, что говорит о большом потенциале этого метода в плане его широкого применения [26]. К сожалению, в этих экспериментах использовалась только одна плаزمида с фланкирующими последовательностями из пластома *Panicum virgatum*, но этот вид не был использован в исследовании. Поэтому об интеграции в пластом репортерного гена

говорить не приходится, и авторы изучали только его транзистентную экспрессию. Так что встраивание в пластом целевых генов методом SWNT еще предстоит показать.

Недавно был разработан еще один эффективный метод доставки генетического материала в пластиды с помощью простой инфильтрации листьев. Метод основан на формировании комплекса ДНК плазмиды (pDNA) с двумя сигнальными пептидами размером 30–35 аминокислот [27]. Один пептид, BP100, обеспечивает транспорт через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану (CPP пептид), второй, СТРК₉ОЕР34, осуществляет транспорт по внутриклеточным мембранным и цитоскелетным сетям в хлоропласты (СТР пептид). Эти два пептида электростатически взаимодействуют с ДНК плазмиды и образуют глобулу размером в 170–200 нм. Через 2 ч после инфильтрации pDNA/CPP/СТР-комплексы связываются с мембранами хлоропластов, а затем проникают в них и высвобождают pDNA. Через 24 ч в результате транзистентной экспрессии репортерных генов в хлоропластах обнаруживаются их продукты (GFP, RedFP, люцифераза). Метод был успешно применен к хлоропластам *A. thaliana* и *Nicotiana benthamiana*, а также к хромопластам, лейкопластам и амилопластам томатов и картофеля. Авторы провели сравнительный анализ эффективности биобаллистической доставки генетического материала в хлоропласты и доставки с помощью pDNA/CPP/СТР-комплексов. Биобаллистика приводила к появлению единичных трансформированных хлоропластов на клетку, тогда как метод с использованием pDNA/CPP/СТР-комплексов — к трансформации 10–12 хлоропластов в клетке. Активность люциферазы в трансформированных хлоропластах, полученных последним методом, была больше в 3–10 раз по сравнению с биобаллистикой [27]. К сожалению, как и в описанном ранее методе, авторы исследовали только транзистентную экспрессию репортерных генов.

Дизайн экспрессионных кассет. В отличие от ядерного генома, где гомологический обмен (HR, homologous recombination) затруднен, встраивание экспрессионных кассет в геном пластид идет преимущественно по HR-механизму, что обеспечивает ее точное размещение в заранее заданном районе пластома [8, 28]. Частота гомологичной рекомбинации максимальна, когда экспрессионная кассета фланкирована с обеих сторон последовательностями не менее 121 п.о., гомологичных последовательностям в сайте интеграции [29]. Также немаловажную роль для повышения частоты интеграции и уровня экспрессии трансгена имеют выбор места встраивания и правильный подбор элементов экспрессионной кассеты: промотора, 5'- и 3'-UTRs. Наиболее часто используемые комбинации промоторов и этих регуляторных не-транслируемых элементов, обеспечивающие наи-

Таблица 1. Промоторы, регуляторные нетранслируемые районы (UTRs) и сайты встраивания, обычно используемые для трансформации пластид (цитировано по [30])

Промоторы	5'-UTR	3'-UTR	Сайты встраивания
<i>psbA</i>	<i>ggagg</i>	<i>psbA</i>	<i>trnI/trnA</i>
<i>rrn</i>	<i>T7g10</i>	<i>rps16</i>	<i>rbcL/accD</i>
<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>	<i>trnM-trnG</i>
	<i>psbA</i>	<i>petD</i>	<i>trnV/rps12</i>
	<i>atpB</i>		<i>trnN-trnR</i>
			<i>yef3-trnS</i>

большую экспрессию трансгенов, представлены в табл. 1.

Использование системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. Для эффективного встраивания экспрессионной кассеты в пластом по механизму HR большое значение имеет наличие в этом районе пластома двухцепочечного разрыва ДНК (DSB, double-strand break) [31], который может быть индуцирован использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Для точного позиционирования DSB используется sgRNA, несущая последовательность, гомологичную участку-мишени, и направляющая в него эндонуклеазу Cas9. Yoo с соавторами [32] использовали систему CRISPR/Cas9 для адресной интеграции репортерного гена *GFP* в пластом *Ch. reinhardtii*. Авторы сконструировали единую плазмиду, содержащую три экспрессионные кассеты: одна — с геном Cas9, вторая — с sgRNA, и третья — донорная кассета с репортерным геном *GFP* и генами селективных маркеров. Донорная кассета была фланкирована последовательностями, гомологичными участкам сайта интеграции, нужными для ее встраивания по HR-механизму, и сайтами узнавания Cas9/sgRNA, что обеспечивало ее вырезание из плазмиды. Плазида доставлялась в хлоропласты методом биобаллистики. В результате этого эксперимента 2 из 20 полученных трансформантов содержали репортерный ген в заданном участке пластома. Примечательно, что при использовании плазмиды, не содержащей ген *Cas9*, ни одной адресной трансформации получено не было, что говорит о необходимости получения DSB для встраивания по механизму HR [32]. Аналогичная генная конструкция с системой геномного редактирования была также использована для трансформации хлоропластов табака. Авторы показали, что адресные DSB, вызываемые комплексом Cas9/sgRNA, повышают частоту трансформации хлоропластов в 6–10 раз [33].

Влияние видоспецифичности последовательностей и выбора сайта интеграции в пластом на частоту встраивания и экспрессию трансгена. В то время как кодирующие области в геноме пластид довольно консервативны, межгенные спейсеры, в которые производится интеграция трансгенов,

могут значительно различаться у разных видов. Так, из почти 150 межгенных спейсеров только четыре консервативны у двудольных [34], а у однодольных нет ни одного консервативного [35]. Даже одна нуклеотидная замена в экзогенной фланкирующей последовательности экспрессионной кассеты может привести к драматическому снижению частоты интеграции по механизму HR. Внутри вида межгенные спейсеры, как правило, идентичны [34]. Поэтому для каждого вида необходимо создавать видоспецифичный вектор с фланкирующими последовательностями, имеющими 100% гомологии с межгенным спейсером.

В геноме хлоропластов не наблюдается эффект положения в привычном его понимании, но тем не менее, есть генные спейсеры с высокой и низкой транскрипционной активностью. Поэтому выбор удачного сайта интеграции остается очень важной задачей для получения высокого уровня экспрессии трансгена. Наилучшими сайтами, использованными для трансформации пластид, оказались *rps14/trnM* и *trnM/trnG* (томаты); *rbcL/accD* (цветная капуста, картофель, салат); *trnV/rps7/12* (баклажан); *16srrra/23srrna* (капуста); *trnI/trnA* (морковь, салат); *trnV/rps12/7* (соя). Тем не менее, самый высокий уровень экспрессии трансгенов был достигнут при интеграции в транскрипционно активный спейсер *trnI/trnA*. Подавляющее большинство всех полученных транспластомных растений было получено интеграцией именно в спейсер *trnI/trnA*, что говорит о его перспективности для получения высоких уровней экспрессии трансгенов [36].

Промоторы. Пластиды высших растений содержат РНК-полимеразу двух типов. Одна (PEP, plastid-encoded RNA polymerase) кодируется в пластоме и досталась растениям от цианобактериального эндосимбионта. Полимеразы второго типа (NEPs, nuclear-encoded RNA polymerases) кодируются в ядерном геноме, имеют большое сходство с полимеразами бактериофагов и, видимо, попали к растениям в результате горизонтального переноса [37, 38]. Эти полимеразы опознают разные промоторы: PEP-промоторы напоминают бактериальные, а NEP-промоторы похожи на

промоторы в митохондриальном геноме растений. В целом РЕР-промоторы значительно сильнее, чем NER-промоторы, и большинство наиболее интенсивно транскрибируемых генов пластид находятся под управлением РЕР-промоторов [39]. Поэтому для биосинтеза трансгенов предпочтительнее использование РЕР-промоторов. Наиболее сильный промотор в пластидах высших растений, *Prrn*, управляет опероном рибосомных РНК, и именно *Prrn* использовался при создании многих наиболее интенсивно экспрессирующихся кассет. Так как рРНК не транслируется, *Prrn* для высокой экспрессии трансгена должен быть дополнен соответствующим сигналом о начале трансляции [40]. Также весьма перспективным для трансгенеза является *psbA* оперон (кодирующий белок D1 фотосистемы II), который не только интенсивно транскрибируется, но еще и его транскрипты активно транслируются, что в ряде случаев приводит к более высоким уровням экспрессии, чем при использовании *Prrn* [41]. Кроме пластидных промоторов для управления экспрессией трансгенов в пластидах иногда используют сильные бактериальные или митохондриальные промоторы. Хотя они и опознаются пластидным транскрипционным аппаратом, но они значительно слабее пластидных РЕР-промоторов [42, 43].

Регуляторные элементы – 5'- и 3'-UTRs. Так как экспрессия генов в пластидах регулируется в основном на уровне трансляции [44, 45], неудивительно, что правильный выбор 5'- и 3'-UTRs очень важен для высокого уровня экспрессии трансгена в пластидах. По уровню экспрессии репортерных генов были протестированы в большом количестве не только пластидные, но и некоторые экзогенные 5'-UTRs, в основном бактериальные и даже синтетические [46]. Одним из сильнейших факторов, иницирующих трансляцию, оказался 5'-UTR *gene10* бактериофага T7 [47]. В сочетании с пластидным промотором *Prrn* он обеспечивает один из наиболее высоких уровней аккумуляции трансгенных белков [47, 48]. Очень высокий уровень экспрессии трансгенов обеспечивают промотор/5'-UTR пластидного гена *psbA*, кодирующего самый интенсивно транслируемый белок пластид [49]. Другие эндогенные регуляторные последовательности, например, генов *rbcL* и *atpA*, приводят к более низкому уровню экспрессии трансгенов, чем *psbA*. Экспрессионная активность резко падает при использовании экзогенных *psbA*, например, *psbA* салата в хлоропластах табака и наоборот. Различия в последовательностях 5'-UTR табака и салата приводят к сильному снижению сродства 5'-UTR с РНК-связывающими белками [41]. Это еще раз доказывает, что для получения высоких уровней экспрессии трансгена в пластидах необходимо конструировать видоспецифичные векторы.

3'-UTRs пластидных мРНК формируют стабильные петли во вторичной структуре, которые

защищают мРНК от быстрой деградации, что приводит к ее накоплению [50]. Многочисленные исследования роли пластидных 3'-UTRs говорят о том, что выбор 3'-UTR влияет на уровень аккумуляции мРНК, но их вклад в экспрессию трансгена сильно ограничен [51, 52]. Это согласуется с тем, что регуляция генной экспрессии в пластидах происходит преимущественно на трансляционном уровне, и механизмы регуляции трансляции могут противостоять даже высоким уровням накопления мРНК [52, 53].

Таким образом, уровень экспрессии целевого гена в транспластомных растениях очень сильно зависит от множества факторов, основными из которых выступают правильный подбор места встраивания, промотора и регуляторных нетранслируемых 5'- и 3'-UTRs. В табл. 2 в качестве примера показана вариабельность уровня накопления рекомбинатных белков, причем первые 6 позиций таблицы соответствуют оптимальному сочетанию регуляторных элементов и сайта интеграции (*trnI/trnA*).

Из представленных данных очевидно, что даже при встройке в один и тот же сайт уровень накопления рекомбинантного белка варьирует от 0.85% до 45.0% от общего растворимого белка (ОРБ). На самом деле этот разброс может быть еще больше. Также уровень экспрессии может в значительной степени зависеть от совсем других факторов, например, от качества отбора гомопластомных и гомопластидных форм трансгенных растений.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ГОМОПЛАСТОМНЫХ И ГОМОПЛАСТИДНЫХ РАСТЕНИЙ

Одной из основных проблем при создании транспластомных растений с высоким уровнем экспрессии трансгенов остается сложность получения клеток, в которых все пластомы всех пластид имеют трансген, из которых в дальнейшем можно регенерировать гомопластомные и гомопластидные растения. За последние два десятилетия методы получения гомопластомных и гомопластидных растений мало изменились, и их основой остается многоступенчатый отбор с использованием двух или более селективных факторов. Общая схема преобразования генома пластид в результате многоступенчатого отбора на селективных средах представлена на рис. 1. Идеалом, обеспечивающим наиболее высокие уровни экспрессии целевых генов, является получение гомопластомных и гомопластидных клеток (рис. 1, д).

В последнее время к этой селективной схеме добавилась тенденция трансформировать не зрелые хлоропласты, а пропластиды меристематических и этиолированных каллусных тканей, изначально содержащие малое число пластид с малым количеством пластомов.

Таблица 2. Изменчивость экспрессии ряда трансгенов в зависимости от сайта встраивания, используемых промоторов и регуляторных областей (цитировано по [30], с изменениями)

Сайты встраивания	Промотор/5'-UTR/Терминатор(3'-UTR)	Эффективность экспрессии, % от ОРБ
<i>trnI/trnA</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	32–38; 17–26
<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/TpsbA</i>	45.3
<i>trnI/trnA</i>	<i>TrbcL</i>	10.0
<i>trnI/trnA</i>	<i>Prrn/TpsbA</i>	0.85–1.0
<i>trnI/trnA</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	5.16–9.27
<i>trnI/trnA</i>	<i>PpsbA/TpsbA</i>	0.2–6.0
<i>trnV/rps 12, 7</i>	<i>Prrn/TrbcL</i>	>7.0
<i>rbcL/accD</i>	<i>PpsbA/rbcL</i> 3'	5.0
<i>rps 7, 12/trnV</i>	<i>Prrn/T7g10/Trps 16</i>	>10.0
<i>rbcL/accD</i>	<i>Prrn/TpsbA</i>	2.0–3.0
<i>trnM/trnG</i>	<i>Prrn/T7g10/rbc3'</i>	0.8–1.6

Использование меристематических и этиолированных каллусных тканей. Пластомы хлоропластов организованы в нуклеоиды — довольно компактные нуклеопротеиновые комплексы, расположенные на тилакоидных мембранах хлоропластов. Число пластов в каждом нуклеоиде может варьировать от одного до 20 и более в зависимости от типа ткани. Меристематические апикальные ткани содержат небольшое число пропластид и незрелых хлоропластов, несущих около 10 пластов, тогда как зрелые хлоропласты мезофилла листьев содержат 70–130 копий пластома, до 2600–3300 копий на клетку [54, 55]. В этиолированных клеточных и каллусных культурах хлоропласты дедифференцируются, превращаясь в пропластиды; число пластов в них резко уменьшается, как и число пластид на клетку [55–57]. При трансформации хлоропластов чужеродная ДНК с целевыми и селективными генами встраивается только в небольшое число пластов клетки. Использование для трансформации меристематических тканей и этиолированных клеточных культур значительно снижает число пластов, оставшихся интактными, что в дальнейшем значительно облегчает проведение отбора на гомопластомность и гомопластидность. С помощью трансформации клеток каллусов были получены транспластомные растения *A. thaliana* и сахарного тростника, хотя в ряде случаев гомоплазмия этих растений остается под вопросом [58–60].

Отбор и селективные маркеры. Так как в результате трансформации основная масса пластов клетки остается интактными, то для достижения гомопластомности и гомопластидности всегда необходимо проведение многоступенчатого отбора по одному или двум селективным маркерам. Для получения транспластомных растений используются различные гены, обеспечивающие устойчивость к разным антибиотикам. Большинство используемых антибиотиков являются селективными инги-

биторами синтеза белков на рибосомах прокариотического типа (70S) и не влияют на белковый синтез на 80S рибосомах в цитоплазме. Это такие антибиотики, как спектиномицин, стрептомицин, канамицин и хлорамфеникол. Эти антибиотики чаще используются для первичных ступеней отбора, когда только малое число пластов несет селективный маркер [61]. Экспрессия генов неомицинофосфотрансферазы (*nptII*) или аминогликозид-3'-фосфотрансферазы (*aphA6*) обеспечивает устойчивость к канамицину [62, 63]. Наиболее часто используемым селективным маркером при трансформации пластид является ген стрептомицин-3'-аденилилтрансферазы (*aadA*), который обеспечивает пластидам устойчивость к двум антибиотикам: стрептомицину и спектиномицину [64, 65]. Спектиномицин связывается с рибосомами пластид и препятствует трансляции белков [66]. Селекция на средах с двумя этими антибиотиками (стрептомицин + спектиномицин) проводится для отделения транспластомных клонов от довольно часто возникающих спонтанных мутантов, устойчивых к спектиномицину [61]. Устойчивость к хлорамфениколу, обеспечиваемая геном бактериальной хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (*CAT*) менее выраженная, чем устойчивость к канамицину или спектиномицину, но ее преимущество заключается в отсутствии спонтанных устойчивых мутантов [67]. Также была показана эффективность отбора транспластомных клонов по устойчивости к 4-метилсиндолу и 7-метил-DL-триптофану (ген антранилилсинтазы, *ASA2*) [68] и к бетаин-альдегиду (ген бетаин-альдегид дегидрогеназы, *badh*) [69].

На ранних этапах отбора, когда еще число трансформированных пластов мало, необходимо принимать во внимание такое распространенное в пластидах явление, как генную конверсию. Если целевой ген нетесно сцеплен с селективным маркером, то в результате генной конверсии может произойти

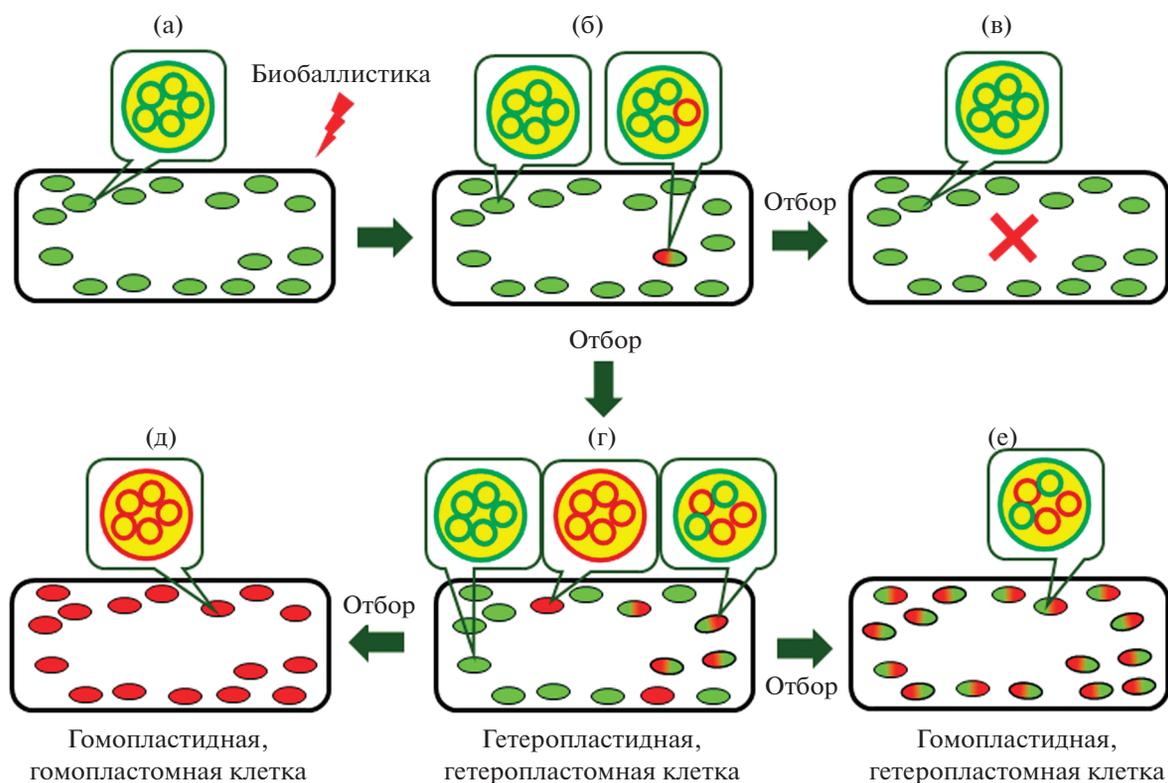


Рис. 1. Реорганизация генома пластид в результате отбора на селективных средах для достижения гомопластомности и гомопластидности. (а) – введение генетической конструкции (трансгена) в пластиды (хлоропласты) любым доступным способом, например, с помощью биобаллистики; (б) – встраивание одной или нескольких копий трансгена в нативный геном (пластом) хлоропластов посредством гомологичной рекомбинации; (в–е) – отбор клеток на среде с селективным агентом (как правило – антибиотик спектиномицин или смесь спектиномицина и стрептомицина). Обозначения: зеленые овалы в границах клетки – нативные хлоропласты с нетрансформированным геномом; двухцветные овалы в границах клетки – хлоропласты, содержащие трансгенные и нетрансгенные копии генома (гетеропластомные хлоропласты); красные овалы в границах клетки – хлоропласты, содержащие только трансформированные копии генома (гомопластомные хлоропласты); вверху в выносках показаны отдельные нуклеотиды хлоропластов, содержащие только нетрансгенные копии генома (окружности зеленого цвета); нуклеотиды, содержащие смесь трансгенных и нетрансгенных копий генома (сочетание окружностей зеленого и красного цвета); и нуклеотиды, содержащие только трансгенные копии генома (окружности красного цвета); стрелки с подписью “отбор” означают культивирование тканей, каллусов или клеток на культуральных средах с добавлением селективных агентов.

его потеря с сохранением устойчивости к селективному агенту, так как большинство пластомеров-матриц целевого гена не имеют [70]. Поэтому очень важно как можно быстрее вводить транспластомные растения в дополнительные циклы селекции, чтобы обеспечить им стабильное гомопластомное состояние и анализировать большое число (десятки) регенерантов в каждом регенерационном цикле методами Дот-блоттинга или ПЦР, чтобы не потерять целевой ген [9].

На последних этапах отбора, когда число трансформированных копий пластомера становится большим, целесообразно использовать такие вторичные селективные маркеры, как *bar*, обеспечивающий устойчивость к гербицидам фосфинотрицину и глифосату [71], а также гены устойчивости к сульфонилмочевине, пиримидилкарбоксилату [72] и дикетонитрилу [73].

Недавно был предложен новый и оригинальный метод эффективного получения гомопластомности при трансформации пластид [74]. Метод основан на паре генов *barnase-barstar* из *Bacillus amyloliquefaciens* [75]. Ген *barnase* кодирует рибонуклеазу, обладающую цитотоксическим действием, а продукт гена *barstar* специфически ее ингибирует [76]. Авторы объединили ген *barnase* с сигналом транспорта в пластиды и поставили его под управление основанной на β -эстрадиол-индуцибельной системы [77]. Эта конструкция была встроена в ядерный геном табака, а пластиды трансформировали вектором с геном *barstar* и репортерным геном *GFP*. При индукции эстрадиолом выживали только трансформированные *barstar* пластиды, что дало авторам возможность быстро получить гомопластомные и гомопластидные растения табака [74].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Не вызывает сомнений, что трансформация пласта открывает новое направление в биотехнологии и биоинженерии растений. Транспластомные растения по сравнению с ядерными трансформантами обладают множеством преимуществ. Это и потенциально высокий выход целевого белка, и возможность адресного встраивания целевого гена в заранее выбранный участок пластома по механизму гомологичной рекомбинации, и возможность переносить блоки генов целых метаболических путей с помощью создания искусственных оперонов. Размещение целевых генов в пластидах практически исключает их сайленсинг и сводит к минимуму эффект положения. Кроме того, транспластомные растения более надежны в плане биобезопасности, так как пластиды не переносятся с пылью на другие растения. Таким образом, транспластомные растения могут способствовать значительному прорыву в биотехнологии: от создания медицинских препаратов до крупномасштабного синтеза промышленных ферментов и биотоплива. Но пока на этом пути возникают значительные проблемы, большинство которых сводится к двум: низкая частота трансформации пластид и сложности отбора гомопластомных и гомопластидных растений. Сейчас уже видны пути решения этих проблем. Первая решается в направлениях разработки новых систем доставки чужеродных генов в пластиды и тонким дизайном трансформирующих векторов. Система доставки генов с помощью нанотрубочек позволяет более чем десятикратно увеличить частоту доставки в пластиды и, возможно, интеграции в пластом. Так как интеграция происходит по механизму HR, очень важно, чтобы фланкирующие последовательности имели 100%-ную гомологию с последовательностями сайта встраивания. Таким образом, для каждого вида растения необходимо создавать свою, видоспецифичную конструкцию. Это также касается промоторных и регуляторных 3'- и 5'-UTRs, которые тоже должны быть видоспецифичными, что повышает выход целевого белка. Сложности достижения гомопластомности могут быть решены созданием принципиально новых систем отбора (например, barnase/barstar) и использованием для трансформации меристематических и дедифференцированных клеток с малым числом пластома.

Работа поддержана бюджетным проектом 0259-2021-0010 “Изучение систем контроля метаболизма живых систем в условиях взаимодействия с окружающей средой, в том числе после генетической модификации”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pogson B.J., Ganguly D., Albrecht-Borth V. Insights into chloroplast biogenesis and development // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1847. P. 1017.
2. Mellor S.B., Behrendorff J.B.Y.H., Nielsen A.Z., Jensen P.E., Pribil M. Non-photosynthetic plastids as hosts for metabolic engineering // *Essays Biochem.* 2018. V. 62. P. 41.
3. Farquhar J., Zerkle A.L., Bekker A. Geological constraints on the origin of oxygenic photosynthesis // *Photosynth. Res.* 2011. V. 107. P. 11. <https://doi.org/10.1007/s11220-010-9594-0>
4. Taylor N.L., Stroher E., Millar A.H. *Arabidopsis* organelle isolation and characterization // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1062. P. 551. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4_29
5. Barkan A. Expression of plastid genes: organelle-specific elaborations on a prokaryotic scaffold // *Plant Physiol.* 2011. V. 155. P. 1520.
6. Prikryl J., Rojas M., Schuster G., Barkan A. Mechanism of RNA stabilization and translational activation by a pentatricopeptide repeat protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. V. 108. P. 415.
7. Gawronski P., Jensen P.E., Karpinski S., Leister D., Scharff L.B. Pausing of chloroplast ribosomes is induced by multiple features and is linked to the assembly of photosynthetic complexes // *Plant Physiol.* 2018. V. 176. P. 2557.
8. Jarvis P., Lopez-Juez E. Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. P. 787.
9. Bock R. Engineering plastid genomes: methods, tools, and applications in basic research and biotechnology // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. V. 66. P. 211.
10. McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J., Hogan P.S., Stalker D.M., Maliga P. Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco // *Nat. Biotechnol.* 1995. V.13. P. 362.
11. Fuentes P., Armarego-Marriott T., Bock R. Plastid transformation and its application in metabolic engineering // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2018. V. 49. P. 10.
12. Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // *Plant J.* 2009. V. 57. P. 436.
13. Dreesen I.A.J., Charpin-El Hamri G., Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection // *J. Biotechnol.* 2010. V. 145. P. 273.
14. Gregory J.A., Topol A.B., Doerner D.Z., Mayfield S. Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines // *Appl. Environ. Microbiol.* 2013. V. 79. P. 3917.
15. Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H., Hosler J.P., Johnson A.M., Jones A.R., Randolph-Anderson B.L., Robertson D., Klein T.M., Shark K.B., Sanford J.C. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high-velocity microprojectiles // *Science.* 1988. V. 240. P. 1534.
16. Svab Z., Hajdukiewicz P., Maliga P. Stable transformation of plastids in higher plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. V. 87. P. 8526.

17. Day A., Goldschmidt-Clermont M. The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal // *Plant Biotechnol. J.* 2011. V. 9. P. 540.
18. Jin S., Daniell H. The engineered chloroplast genome just got smarter // *Trends Plant Sci.* 2015. V. 20. P. 622.
19. Ruf S., Forner J., Hasse C., Kroop X., Seeger S., Schollbach L., Schadach A., Bock R. High-efficiency generation of fertile transplastomic *Arabidopsis* plants // *Nat. Plants* (London, U. K.). 2019. V. 5. P. 282.
20. Dyo Y.M., Purton S. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins // *Microbiology.* 2018. V. 164. P. 113.
21. Kumari U., Singh R., Ray T., Rana S., Saha P., Malhotra K., Daniell H. Validation of leaf enzymes in the detergent and textile industries: launching of a new platform technology // *Plant Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 1167.
22. Sánchez E.A.E., Castillo J.A.T., Cruz Q.R., García S.R.S. Biotechnological Applications of Plastid Foreign Gene Expression // *Plant Growth and Regulation-Alterations to Sustain Unfavorable Conditions* / Eds. Ratnadewi D., Hamim M. S. London, UK: IntechOpen, 2018.
23. Lu Y., Rijzaani H., Karcher D., Ruf S., Bock R. Efficient metabolic pathway engineering in transgenic tobacco and tomato plastids with synthetic multigene operons // *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. V. 110. P. E623.
24. Lu X.M., Yin W.B., Hu Z.M. Chloroplast transformation // *Methods Mol. Biol.* 2006. V. 318. P. 285.
25. O'Neill C., Horvath G.V., Horvath E., Dix P.J., Medgyesy P. Chloroplast transformation in plants: Polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems // *Plant J.* 1993. V. 3. P. 729.
26. Kwak S.Y., Lew T.T.S., Sweeney C.J., Koman V.B., Wong M.H., Bohmert-Tatarev K., Snell K.D., Seo J.S., Chua N.H., Strano M.S. Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers // *Nat. Nanotechnol.* 2019. V. 14. P. 447.
27. Thagun C., Chuah J.A., Numata K. Targeted gene delivery into various plastids mediated by clustered cell-penetrating and chloroplast-targeting peptides // *Advanced Science.* 2019. V. 6. P. 1902064.
28. Hanson M.R., Gray B.N., Ahner B.A. Chloroplast transformation for engineering of photosynthesis // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 731.
29. Dauvillee D., Hilbig L., Preiss S., Johanningmeier U. Minimal extent of sequence homology required for homologous recombination at the psbA locus in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts using PCR-generated DNA fragments // *Photosynth. Res.* 2004. V. 79. P. 219.
30. Yu Y., Yu P.C., Chang W. J., Yu K., Lin C.S. Plastid transformation: How does it work? Can it be applied to crops? What can it offer? // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 4854.
31. Khan M.S., Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 910.
32. Yoo B.C., Yadav N.S., Orozco E.M., Sakai H. Cas9/gRNA-mediated genome editing of yeast mitochondria and *Chlamydomonas* chloroplasts // *PeerJ.* 2020. V. 8. P. e8362.
33. Tang N., Xia Y., Zhan Y., Dan J., Yu M., Bu X., Cao M. Improvement of Chloroplast Transformation Using CRISPR/Cas9 // *J. Biobased Mater. Bioenergy.* 2020. V. 14. P. 401.
34. Daniell H., Lin C.S., Yu M., Chang W.J. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering // *Genome biology.* 2016. V. 17. P. 1.
35. Sasaki C., Lee S.B., Fjellheim S., Guda C., Jansen R.K., Luo H., Tomkins J., Rognli O.A., Daniell H., Clarke J.L. Complete chloroplast genome sequences of *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor* and *Agrostis stolonifera*, and comparative analyses with other grass genomes // *Theor. Appl. Genet.* 2007. V. 115. P. 571.
36. Yarra R. Plastome engineering in vegetable crops: current status and future prospects // *Mol. Biol. Rep.* 2020. V. 47. P. 8061.
37. Liere K., Börner T. Transcription and transcriptional regulation in plastids // *Top Curr. Genet.* 2007. V. 19. P. 121.
38. Filée J., Forterre P. Viral proteins functioning in organelles: a cryptic origin? // *Trends Microbiol.* 2005. V. 13. P. 510.
39. Hajdukiewicz P.T.J., Allison L.A., Maliga P. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 4041.
40. Bock R. Engineering chloroplasts for high-level foreign protein expression // *Chloroplast Biotechnology.* 2014. P. 93.
41. Ruhlman T., Verma D., Samson N., Daniell H. The role of heterologous chloroplast sequence elements in transgene integration and expression // *Plant Physiology.* 2010. V. 152. P. 2088.
42. Newell C.A., Birch-Machin I., Hibberd J.M., Gray J.C. Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts // *Transgenic Res.* 2003. V. 12. P. 631.
43. Bohne A.-V., Ruf S., Börner T., Bock R. Faithful transcription initiation from a mitochondrial promoter in transgenic plastids // *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. 7256.
44. Eberhard S., Drapier D., Wollman F.-A. Searching limiting steps in the expression of chloroplast-encoded proteins: relations between gene copy number, transcription, transcript abundance and translation rate in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant J.* 2002. V. 31. P. 149.
45. Kahlau S., Bock R. Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 856.
46. Herz S., Füßl M., Steiger S., Koop H.-U. Development of novel types of plastid transformation vectors and evaluation of factors controlling expression // *Transgenic Res.* 2005. V. 14. P. 969.
47. Oey M., Lohse M., Kreikemeyer B., Bock R. Exhaustion of the chloroplast protein synthesis capacity by massive expression of a highly stable protein antibiotic // *Plant J.* 2009. V. 57. P. 436.
48. Zhou F., Badillo-Corona J.A., Karcher D., Gonzalez-Rabade N., Piepenburg K., Borchers A.-M.I., Maloney A.P., Kavanagh T.A., Gray J.C., Bock R. High-level expression of HIV antigens from the tobacco and tomato plastid genomes // *Plant Biotechnol. J.* 2008. V. 6. P. 897.

49. Klein R.R., Mullet J.E. Control of gene expression during higher plant chloroplast biogenesis. Protein synthesis and transcript levels of psbA, psaA-psaB, and rbcL in dark-grown and illuminated barley seedlings // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 4341.
50. Mardanov A.V., Ravin N.V., Kuznetsov B.B., Samigullin T.H., Antonov A.S., Kolganova T.V., Skryabin K.G. Complete sequence of the duckweed (*Lemna minor*) chloroplast genome: structural organization and phylogenetic relationships to other angiosperms // J. Mol. Evol. 2008. V. 66. P. 555.
51. Goremykin V.V., Hirsch-Ernst K.I., Wölfel S., Hellwig F.H. Analysis of the *Amborella trichopoda* chloroplast genome sequence suggests that *Amborella* is not a basal angiosperm // Mol. Biol. Evol. 2003. V. 20. P. 1499.
52. Lin C.S., Chen J.J., Huang Y.T., Chan M.T., Daniell H., Chang W.J., Hsu C.-T., Liao D.-C., Wu F.-H., Lin S.-Y., Liao C.-F., Deyholos M.K., Wong G.K.-S., Albert V.A., Chou M.-L. et al. The location and translocation of *ndh* genes of chloroplast origin in the *Orchidaceae* family // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 9040.
53. Wu J., Liu B., Cheng F., Ramchiary N., Choi S.R., Lim Y.P., Wang X.-W. Sequencing of chloroplast genome using whole cellular DNA and Solexa sequencing technology // Front. Plant Sci. 2012. V. 3. P. 234.
54. Golczyk H., Greiner S., Wanner G., Weihe A., Bock R., Börner T., Herrmann R.G. Chloroplast DNA in mature and senescing leaves: a reappraisal // The Plant Cell. 2014. V. 26. P. 847.
55. Greiner S., Golczyk H., Malinova I., Pellizzer T., Bock R., Börner T., Herrmann R.G. Chloroplast nucleoids are highly dynamic in ploidy, number, and structure during angiosperm leaf development // The Plant Journal. 2020. V. 102. P. 730.
56. Teske D., Peters A., Möllers A., Fischer M. Genomic profiling: The strengths and limitations of chloroplast genome-based plant variety authentication // J. Agric. Food Chem. 2020. V. 68. P. 14323.
57. Tetsuaki Osafune S.S., Hase E. Proplastids of dark-grown wax-rich cells of *Euglena gracilis* // Regulation of Chloroplast Biogenesis. 2012. V. 226. P. 361.
58. Ruf S., Forner J., Hasse C., Kroop X., Seeger S., Schollbach L., Schadah A., Bock R. High-efficiency generation of fertile transplastomic *Arabidopsis* plants // Nat. Plants (London, U. K.). 2019. V. 5. P. 282.
59. Devarumath R.M., Nerkar G.A., Farsangi F.J., Nikam A.A., Babu K.H. Embracing biotechnology methods for crop improvement research in sugarcane // Current status of sugarcane research in India / Eds. Tiwari A.K., Lal M., Singh A.K. New York, USA: Nova Science Publishers, 2015. P. 33.
60. Mustafa G., Khan M.S. Transmission of Engineered Plastids in Sugarcane, a C4 Monocotyledonous Plant, Reveals that Sorting of Preprogrammed Progenitor Cells Produce Heteroplasmy // Plants. 2021. V. 10. P. 26.
61. Maliga P. Plastid transformation in flowering plants // Genomics of chloroplasts and mitochondria / Eds. Bock R., Knoop V. Springer, Dordrecht. 2012. P. 393.
62. Kumar S., Dhingra A., Daniel H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes // Plant Mol. Biol. 2004. V. 56. P. 203.
63. Huang F.C., Klaus S.M.J., Herz S., Zou Z., Koop H.U., Golds T.J. Efficient plastid transformation in tobacco using the *aphA-6* gene and kanamycin selection // Mol. Genet. Genom. 2002. V. 268. P. 19.
64. Day A., Goldschmidt-Clermont M. The chloroplast transformation toolbox: Selectable markers and marker removal // Plant Biotechnol. J. 2011. V. 9. P. 540.
65. Bock R. Genetic engineering of the chloroplast: Novel tools and new applications // Curr. Opin. Biotechnol. 2014. V. 26. P. 7.
66. Borovinskaya M.A., Shoji S., Holton J.M., Fredric K., Cate J.H.D. A steric block in translation caused by the antibiotic spectinomycin // ACS Chem. Biol. 2007. V. 2. P. 545.
67. Li W., Ruf S., Bock R. Chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker for plastid transformation // Plant Mol. Biol. 2011. V. 76. P. 443.
68. Barone P., Zhang X.H., Widholm J.M. Tobacco plastid transformation using the feedback-insensitive anthranilate synthase [alpha]-subunit of tobacco (ASA2) as a new selectable marker // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 3195.
69. Verma D., Daniell H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications // Plant Physiol. 2007. V. 145. P. 1129.
70. Khakhlova O., Bock R. Elimination of deleterious mutations in plastid genomes by gene conversion // The Plant Journal. 2006. V. 46. P. 85.
71. Ye G.N., Colburn S., Xu C.W., Hajdukiewicz P.T.J., Staub J.M. Persistence of unselected transgenic DNA during a plastid transformation and segregation approach to herbicide resistance // Plant Physiol. 2003. V. 133. P. 402.
72. Shimizu M., Goto M., Hanai M., Shimizu T., Izawa N., Kanamoto H., Tomizawa K., Yokota A., Kobayashi H. Selectable tolerance to herbicides by mutated acetolactate synthase genes integrated into the chloroplast genome of tobacco // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1976.
73. Dufourmantel N., Dubald M., Matringe M., Canard H., Garcon F., Job C., Kay E., Wisniewski J.P., Ferullo J.M., Pelissier B., Sailland A., Tissot G. Generation and characterization of soybean and marker-free tobacco plastid transformants over-expressing a bacterial 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase which provides strong herbicide tolerance // Plant Biotechnol. J. 2007. V. 5. P. 118.
74. Okuzaki A., Tsuda M., Konagaya K.I., Tabei Y. A novel strategy for promoting homoplasmic plastid transformant production using the barnase-barstar system // Plant Biotechnol. 2020. V. 37. P. 223.
75. Hartley R.W. Barnase and barstar: Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease // J. Mol. Biol. 1988. V. 202. P. 913.
76. Abe K., Oshima M., Akasaka M., Konagaya K., Nanasato Y., Okuzaki A., Taniguchi Y., Tanaka J., Tabei Y. Development and characterization of transgenic dominant male sterile rice toward an outcross-based breeding system // Breed Sci. 2018. V. 68. P. 248.
77. Zuo J., Niu Q.W., Chua N.H. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants // Plant J. 2000. V. 24. P. 265.