

УДК 581.1

МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ: НАПРАВЛЕНИЯ И ПУТИ РАЗВИТИЯ

© 2024 г. Е. В. Дейнеко^{а, *}

^аФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук”,
Новосибирск, Россия
^{*}e-mail: deineko@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 18.03.2024 г.

После доработки 19.04.2024 г.

Принята к публикации 24.04.2024 г.

Развитие и совершенствование методов молекулярной и клеточной биологии существенно расширило возможности исследователей по модификации геномов растительных клеток и послужило основой для развития новых технологий получения рекомбинантных белков, используемых в фармацевтике и других отраслях народного хозяйства, а также стимулировало создание новых высокоурожайных сортов важных сельскохозяйственных культур, устойчивых к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды. Перенос генов в растительный геном из других гетерологичных систем поставил перед исследователями ряд вопросов, связанных с функционированием трансгенов в новом окружении генома-реципиента, а также с их влиянием на функционирование собственных генов растения. За последние сорок лет с момента получения первого трансгенного растения возможности этих технологий были существенно углублены и расширены за счет разработки методов геномного редактирования, основанных на системе CRISPR/Cas. Это позволило не только изменять функционирование целевых генов путем нокаутов или исправлять нежелательные мутации, но и вносить гены интереса в заданные исследователем районы-мишени растительного генома. В предлагаемом обзоре рассматриваются основные этапы исследований по модификации геномов растений за последние сорок лет, с акцентом не только на практическую значимость созданных агробιοтехнологий, но и на важность для фундаментальных исследований функционирования генов и выявления структурных особенностей организации генома растений.

Ключевые слова: gene silencing, биобезопасность, генетическая инженерия, геномное редактирование, наследование трансгенов, природно-трансгенные растения, Т-ДНК индуцированные мутации

DOI: 10.31857/S0015330324050017, EDN: MNFGJU

ВВЕДЕНИЕ

Прошло сорок лет с момента создания первого трансгенного растения — *Nicotiana tabacum* L., в геном которого был перенесен химерный ген, включающий последовательности генов, кодирующих ферменты октопинсинтазы и хлорамфеникол-ацетилтрансферазы [1]. Авторами этой работы было показано, что замена кодирующей последовательности гена нопалинсинтазы *Agrobacterium tumefaciens* на последовательность другого гена — ок-

топинсинтазы, принципиально не влияла на регуляторные особенности промотора этого генов. Стало очевидным, что регуляторные элементы одних генов могут быть использованы для регуляции экспрессии других. Доставка гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, клонированного из *E. coli* и слитого с геном октопинсинтазы, обеспечивала в растительных клетках образование функционально активного рекомбинантного белка, проявляющего ферментативную активность, что подтверждало возможность его корректной

трансляции. Это послужило в дальнейшем отправной точкой для развития систем отбора генетически-модифицированных клеток у растений. Полученные авторами результаты свидетельствовали о том, что транскрипционно-трансляционный аппарат растительной клетки способен поддерживать транскрипцию, трансляцию и пост-трансляционные модификации продуктов экспрессии генов, перенесенных из других гетерологичных систем [1]. Таким образом, перенос и успешная экспрессия в геноме растительной клетки первых созданных в лабораторных условиях генов (трансгенов) открывала перед исследователями широкие возможности для развития технологий модификации геномов с целью улучшения хозяйственно-ценных свойств у растений. Возможность переноса в растительный геном чужеродных генов из других гетерологичных систем – вирусов, микроорганизмов, человека, животных, а также из других отдаленных видов растений, не скрещивающихся между собой в природных условиях, с одной стороны послужило основой для развития не только агrobiотехнологий для улучшения хозяйственно-ценных признаков у важных сельскохозяйственных культур [2, 3], но и открыла широкие перспективы в области создания биопродуцентов рекомбинантных белков, в том числе и для биофармацевтики [4, 5]. Уже через несколько лет после опубликования вышеупомянутой работы по созданию первого генетически модифицированного растения [1], были получены трансгенные растения с полезными свойствами, обеспечивающими устойчивость к гербицидам, насекомым-вредителям и вирусам, а в 1987 г. было получено первое разрешение на проведение полевых испытаний генетически модифицированных растений томата и картофеля [6, 7]. Первый коммерческий сорт томата, получивший название Flavr-Savr, был зарегистрирован компанией Calgene (США) в 1994 г. [8]. В геноме растений этого сорта был перенесен ген фермента полигалактуронидазы, принимающего участие в процессах распада пектина в тканях плодов, в результате чего ткани при созревании плодов быстро размягчались. Введение в геном инвертированной копии этого гена приводило к разрушению продуктов экспрессии собственного (хозяйского) гена, кодирующего полигалактуронидазу и, как результат, к существенному снижению уровня накопления фермента в тканях плодов томата, что обеспечивало более длительный срок их хранения. В последующие несколько лет после регистрации первого сорта генетически модифицированного растения томата, успешно прошли испытания и другие виды растений, рекомендованные для коммерциа-

лизации. Так, например, уже к 1996 г. площади посевов, занимаемых устойчивыми к гербицидам сортами сои и канолы, а также сортами кукурузы, хлопчатника и картофеля, устойчивыми к насекомым-вредителям, составили почти 1.7 млн га в США и Канаде [9].

В последующие годы отмечен неуклонный рост площадей, занимаемых генетически модифицированными культурами. Так, по данным Международной службы по агrobiотехнологиям к 2010 г. в 29 странах мира под генетически модифицированные сорта растений было отведено уже около 148 млн га [10]. Следует подчеркнуть, что к этому времени ввоз продукции, полученной с применением методов генетической инженерии, был разрешен в 30 странах, в том числе и в Российской Федерации, что в целом составило 75% населения Земного шара, имеющего прямой доступ к потреблению продуктов, полученных с использованием генетически модифицированных культур растений [10].

К настоящему времени площади, занимаемые под генетически модифицированными культурами, продолжают расти и достигли уже более 200 млн га [11]. Всего на этих площадях в 27 странах возделывается 10 сортов генетически модифицированных видов растений, доминирующими среди которых являются соя, занимающая 98.9 млн га и кукуруза – 66.2 млн га. Если рассматривать соотношение между возделываемыми сортами, относящимися к генетически модифицированным, по отношению к обычным, то лидирующей культурой выступает хлопчатник, доля возделывания которого по сравнению с традиционными технологиями в мировом производстве составляет 80.4%. Для сои и кукурузы эти показатели несколько ниже – 73.7% и 32.9%. Лидирующие позиции по производству продукции на основе генетически модифицированных растений занимают США, где площади посевов составляют 74.7 млн га, а также Бразилия (63.2 млн га) и Аргентина (23.5 млн га). Наиболее широкий ассортимент сортов, созданных на основе генетической модификации с применением методов геномной инженерии, отмечается в США, где возделываются соя, кукуруза, хлопчатник, люцерна, канولا и сахарная свекла [11]. Сорта других видов генетически модифицированных растений выращиваются в Бразилии (сахарный тростник), Аргентине (пшеница), на Филиппинах (рис) и в Бангладеш (баклажан). Следует отметить тенденцию к использованию стекерных сортов, сочетающих в себе устойчивость к гербицидам и инсектицидам, обеспечиваемые переносом и интеграцией в растительный геном двух и более разных трансгенов [10].

Наряду с улучшением хозяйственно-ценных характеристик важных продовольственных культур, модификация генома растений методами генетической инженерии получила широкое применение в биотехнологии, в частности в биофармацевтике, для биосинтеза рекомбинантных белков. На сегодняшний день это один из быстро развивающихся сегментов экономики, называемый иногда молекулярным фермерством. Такие крупнейшие биотехнологические и фармацевтические компании как Protalix Biotherapeutics (Израиль), Synthon (Нидерланды), Ventria (США), Medicago (Канада), Greenovation (Германия) и Pfizer (США) инвестируют значительные средства в развитие научных исследований и разработку новых платформ для производства ценных рекомбинантных белков на основе растительных систем экспрессии. В целом, современное молекулярное фермерство можно разделить на три главных направления, в которых для производства рекомбинантных белков используются трансгенные растения со стабильной, либо транзиторной экспрессией целевых генов или культуры растительных клеток, поддерживаемые в биореакторах [12].

Компания ProdiGeneInc. (США) впервые использовала генетически модифицированные растения кукурузы для промышленного получения рекомбинантных белков и провела оценку экономической целесообразности молекулярного фермерства, учитывая затраты на выращивание, выделение и очистку конечного рекомбинантного продукта [13, 14]. Экспертами установлено, что рекомбинантные авидин и β -глюкуронидаза, синтезируемые в зернах растений кукурузы, были вполне сравнимы и конкурентоспособны с коммерческими продуктами авидина, полученными из куриных яиц [15], и β -глюкуронидазой бактериального происхождения [16].

Мощное развитие за последнее десятилетие получило второе направление молекулярного фермерства, связанное с наработкой в растениях рекомбинантных белков на основе транзиторной экспрессии. Благодаря максимально сжатым срокам от момента выделения антигенной последовательности до наработки больших количеств антигенов [17], это направление открыло широкие возможности для крупномасштабного производства растительных вакцин, особенно при необходимости экстренного реагирования. [18]. Следует отметить, что такое производство постепенно сместилось в сторону использования закрытых систем культивирования. Для этого растения *N. benthamiana*, используемые в настоящее время как системы транзиторной экспрессии генов, кодирующих целевые антигены возбудителей инфекцион-

ных заболеваний, культивируют в помещениях закрытого типа при искусственном освещении. В таких условиях становится возможным использование автоматизированных роботов, управляющих процессами перемещения блоков с индивидуальными растениями от начала их культивирования до конечной стадии, связанной с измельчением биомассы и последующим извлечением из нее целевого продукта [19, 20]. Несмотря на более низкую стоимость производства рекомбинантных белков при крупномасштабном возделывании трансгенных растений со стабильной экспрессией целевых генов [21, 22], также наблюдается перемещение наработки исходной субстанции в закрытые системы на основе культивирования клеточных культур в биореакторах [23, 24]. Важным преимуществом при культивировании растительных клеток в биореакторах является возможность удешевления процесса производства целевого продукта по сравнению с целыми растениями за счет того, что рекомбинантные белки могут быть секретированы в культуральные среды, что упрощает процесс их выделения и очистки [22]. Немаловажное значение в пользу наработки целевых рекомбинантных белков медицинского назначения с использованием клеточных культур растений имеет и соответствие этой технологии существующим жестким правилам надлежащей производственной практики (GMP – good manufacturing practice), касающимся производства фармацевтических продуктов [4, 22]. Вопросы биобезопасности и анализ рисков при использовании растительных систем экспрессии для получения рекомбинантных белков рассмотрены на примере нормативно-правовой базы для молекулярного земледелия в Европе [25]. Успехи, достигнутые РМР-сообществом (Plant-Made Pharmaceutical) в области получения биофармацевтиков с использованием клеточных культур растений подробно рассмотрены нами ранее [12]. В текущем спецвыпуске журнала эти вопросы также рассматриваются в отдельных обзорных статьях на примере получения растительных рекомбинантных вакцин и различных видов рекомбинантных антител для фармацевтики.

Таким образом, возможность *модификации генома растений методами генетической инженерии* была достаточно быстро подхвачена практикой и за последующие 40 лет после создания первого трансгенного растения мировым сообществом исследователей были получены сорта с улучшенными характеристиками хозяйственно-ценных признаков, а также разработаны технологии наработки рекомбинантных белков, в том числе и медицинского назначения.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ГЕНОМОВ: ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ

Традиционные методы селекции, основанные на рекомбинации генов. Рассматривая ретроспективно основные этапы исследований, направленных на улучшение хозяйственно-ценных признаков у растений, используемых человеком для своих целей, условно разделим применяемые для этого методы и подходы на две группы. Согласно схеме, представленной на рис. 1, к первой группе отнесены методы, основанные на использовании природного разнообразия и выявления спонтанных мутаций, где роль исследователя или селекционера определяется искусством их обнаружения, поддержания и закрепления в новом создаваемом сорте. Ко второй группе условно отнесем методы, основанные на внесении в геномную ДНК улучшаемых видов растений повреждений с последующим их восстановлением системами клеточной репарации, т.е. внесением в геном растения искусственных мутаций, индуцированных исследователем. Такое деление методов, используемых человеком для улучшения хозяйственно-ценных характеристик возделываемых видов растений, в рамках данного обзора нацелено на более глубокое понимание при обсуждении в дальнейшем как преимуществ, так и степени возможных рисков при внесении генетических модификаций для человека и окружающей среды.

Первые приемы улучшения различных видов растений были основаны на простом отборе форм растений, проявляющих какие-либо предпочтительные характеристики с последующей их рекомбинацией путем свободного опыления и повторными многократными отборами. Селекционерами было разработано достаточно большое число методов и приемов, позволяющих комбинировать гены, участвующие

в проявлении хозяйственно-ценных признаков у растений, и отбирать формы с максимальным их проявлением. В сочетании с современными методами молекулярного анализа селекционеры имеют возможность использовать такие приемы как выявление QTL-генов, т.е. тех генов, сцепленное наследование которых будет обеспечивать улучшение таких сложных признаков как, например, засухоустойчивость или урожайность [26, 27]. Выявление некоторых молекулярных маркеров (SSR, SCAR, SNP и др.), сцепленных с теми или иными хозяйственно полезными признаками у растений, также обеспечивает селекционеру возможность “концентрировать” эти гены в создаваемом сорте, ориентируясь на выявленные маркеры [28, 29]. Такой подход получил название маркер-ориентированной селекции. Заслуживают внимания современные подходы геномной селекции [30, 31], в том числе для улучшения древесных культур [32].

Современные методы, основанные на репарации повреждений ДНК. Следующий этап улучшения хозяйственно-ценных признаков у растений связан с применением химических мутагенов и радиоактивного излучения (рис. 1). Этот подход принципиально отличался от предыдущих, поскольку был нацелен на индукцию поломок в молекулах ДНК с последующим их восстановлением системами репарации растительной клетки. Среди растений, подвергшихся воздействию различных доз химических мутагенов или облучения, селекционеры могли отбирать те, в геноме которых восстановление повреждений в молекулах ДНК, приводящих к различным перестройкам (точечные мутации, делеции, инверсии, инсерции, транслокации и т.д.) могли быть связаны с рекомбинацией генов и улучшением каких-либо характеристик растения.

Открытие ферментов, позволяющих клонировать гены, соединять их в нужном для исследователя порядке и затем интегрировать в геном растения, стимулировало развитие методов

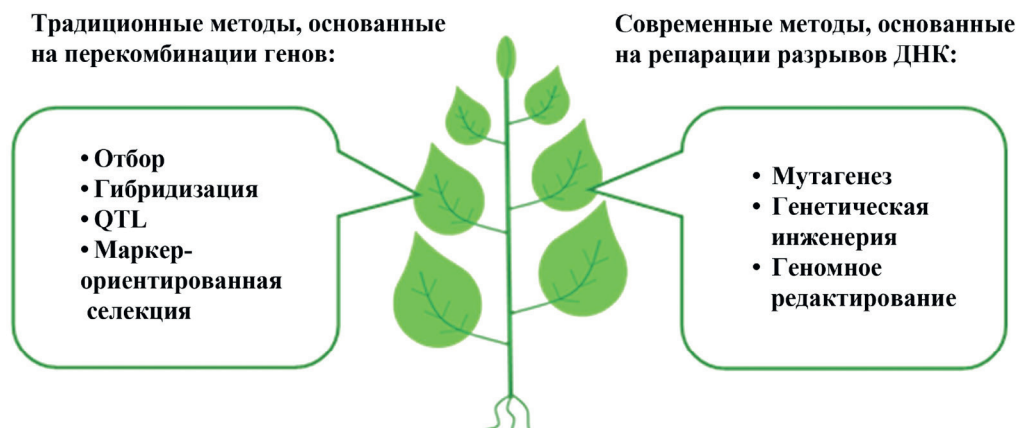


Рис. 1. Общая схема индукции генетических модификаций в растительных геномах.

рекомбинантных ДНК или генетической инженерии и привело к созданию нового направления, которое позволяло модифицировать геномы растений путем включения искусственно созданных генетических конструкций с генами различного происхождения из разных гетерологических систем (рис. 2). Такой подход снимал природные барьеры, сложившиеся между видами, родами и царствами живых организмов и позволял исследователям манипулировать различными источниками генов. Для того, чтобы перенести созданные генетические конструкции в растительный геном, исследователи наиболее часто используют методы векторного переноса, основанные на природной способности почвенной бактерии *A. tumefaciens* доставлять часть своих генов в геном растения. Перенос в геном растительных клеток части своей ДНК, обозначаемой как Т-ДНК, является этапом жизненной стратегии *A. tumefaciens*, нацеленной на биосинтез необходимых питательных веществ (опинов) за счет транскрипционно-трансляционной машины и ресурсов растительной клетки. Таким образом, в результате замены собственных генов в составе плазмиды *A. tumefaciens* на искусственно созданные генетические конструкции, был получен инструмент для их доставки в растительный геном. Так как круг хозяев для *A. tumefaciens* ограничен в основном двудольными растения-

ми, для однодольных разработана доставка генетических конструкций на поверхности частиц золота или вольфрама с помощью генной пушки. Важная особенность этих двух методов состоит в том, что процесс доставки и встраивания созданной генетической конструкции протекает случайным образом и не контролируется исследователем, т.е. с использованием этих методов исследователь не имеет возможности направить созданную генетическую конструкцию с целевым геном в желаемый район генома.

Доставленные в ядро растительной клетки трансгены попадают в открытые петли хроматина и ферментами репарации включаются в восстанавливаемые места разрывов в ДНК по механизму негомологичной рекомбинации [33, 34]. Переносимые в геном растительной клетки искусственно созданные генетические конструкции в виде фрагментов экзогенных ДНК еще до их интеграции в геном могут объединяться друг с другом и образовывать конкатемеры, включающие несколько копий генов, в том числе и в различной ориентации по отношению друг к другу. Число и включение в геном трансгенов может быть самым разнообразным — от единичных копий, интегрированных в один или в разные районы генома, так и до сложноорганизованных инсерций [35]. Более того, в геном могут быть интегрированы модифицированные

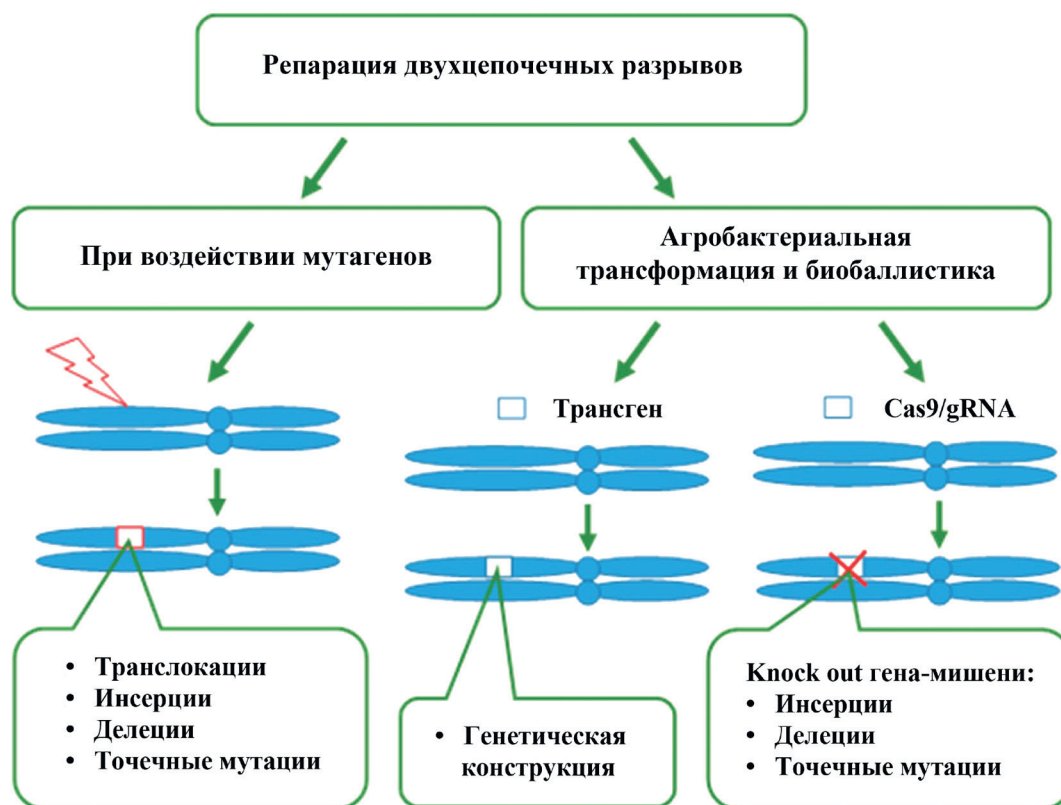


Рис. 2. Схема нарушений в геномной ДНК растений под воздействием мутагенов и Т-ДНК-инсерций при агробактериальной трансформации и биобаллистике.

нефункциональные фрагменты генетических конструкций, выявляемые только в случае полногеномного секвенирования [36].

Интегрированные в геном растения трансгены становятся его резидентной частью, проявляются как доминантные признаки, передаются потомкам согласно законам менделевского наследования [37] и мутируют с такой же частотой, как и аутентичные (собственные) гены [38].

На основании большого фактического материала об экспрессии трансгенов в геноме трансгенных растений стало очевидным, что дальнейшая “судьба” привнесенных в геном чужеродных генов зависит от того, в каком виде (одиночной копии или в составе нескольких сцепленных между собой копий) и в какой район генома интегрировалась та или иная инсерция [39]. Исследование таких событий позволило выявить различные пути проявления генов, входящих в состав инсерции, как среди потомков от самоопыления исходного трансгенного растения, так и среди гибридов, полученных от их переопыления [40]. Интеграция в растительный геном нескольких сцепленных копий трансгена, в том числе и инвертированных, увеличивает вероятность инактивирования целевого гена [41]. Различные варианты эпигенетического инактивирования трансгенов у трансгенных растений рассмотрены в обзоре [42]. Итак, технология модификации геномов растений, основанная на случайной интеграции в геном генетических конструкций с целевыми генами, предполагает проведение крупномасштабных скринингов среди полученных трансформантов, нацеленных на поиск однокопийных инсерций с высоким уровнем экспрессии целевого гена, сохраняющегося в последующих поколениях трансгенного растения. Более того, оценивая реализацию целевого гена в зависимости от особенностей района его интеграции в геноме, следует также рассмотреть вопрос об инсерционной природе самого процесса генетической модификации растений.

Генетическая конструкция может быть интегрирована в геном как в межгенные районы, так и в районы расположения собственных генов, индуцируя при этом различные типы мутационных изменений, известных как инсерционные мутации [43]. Первая коллекция Т-ДНК инсерционных мутаций *A. thaliana* была создана Фельдман [44]. В настоящее время эта коллекция существенно пополнена и представляет собой мощный мировой ресурс для изучения как функционирования растительных генов, так и для выявления особенностей структурной организации генома в целом [45, 46]. Таким образом, среди разнообразных случайных событий интеграции генетических конструкций в растительный геном улучшаемого вида растения исследователю необходимо отобрать отдельные

события с желаемым результатом, оценить стабильное сохранение индуцируемого признака среди потомков, а также выявить возможные побочные негативные влияния инсерции.

Итак, технология модификации растительных геномов путем экзогенного включения специально созданных генетических конструкций с определенным набором генов, за сорокалетний промежуток времени от начала появления первого трансгенного растения продемонстрировала свою успешность в создании сортов с улучшенными характеристиками, а также биопродукторов рекомбинантных белков. Однако сложность и высокая стоимость этой технологии, включающей широкомасштабные отборы благоприятных событий интеграции генетических конструкций, стимулировала необходимость поиска более простых путей целенаправленной модификации генома, что и послужило следующим этапом в развитии методов модификации растительных геномов.

Открытие механизма, позволяющего бактериям целенаправленно разрушать ДНК бактериофагов, используя при этом ранее сохраненные копии фаговой ДНК в специфическом районе своего генома, получившего название (CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), открыла новые перспективы для исследователей [47]. Именно эта особенность послужила основой для создания инструмента для целенаправленного внесения двуцепочечных разрывов в выбранном районе-мишени молекулы ДНК и развития технологии направленной модификации геномов, получившей название геномного редактирования. Суть этого подхода состоит в том, что исследователями создается специальный инструментарий для геномного редактирования – генетические конструкции, включающие участок ДНК, комплементарный району гена-мишени в геноме модифицируемого растения, в котором необходимо произвести двуцепочечный разрез. В качестве “молекулярных ножниц” для осуществления таких разрезов выступают нуклеазы, в частности, нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. Таким образом, объединенные в составе генетической конструкции последовательности гена, кодирующего нуклеазу, а также последовательность, гомологичную району гена-мишени, можно интегрировать в геном, используя уже хорошо зарекомендовавшие себя способы агробактериальной и биобаллистической трансформации. Важно подчеркнуть, что такие инструменты для геномного редактирования могут быть наработаны и в другой системе экспрессии, например, в *E. coli*, а затем интегрированы в геном растения в виде рибонуклеиновых комплексов [48].

В зависимости от поставленной перед исследователем цели, геномное редактирование

может быть выполнено в двух вариантах, в одном из которых нацеливание нуклеазы на определенный ген-мишень предполагает внесение в его последовательность двухцепочечного разрыва с последующей репарацией, сопровождающейся сдвигом рамки считывания, делецией или инсерцией, что приведет к нокауту этого гена. Во втором варианте в состав генетической конструкции может быть дополнительно включен ген интереса, последовательность которого ферментами репарации растительной клетки будет включена в двухцепочечный разрыв района-мишени. Более подробное описание этого метода можно найти в обзорах [49, 50]. Следует подчеркнуть, что метод геномного редактирования, так же, как и методы генной инженерии, были достаточно быстро подхвачены практикой. Сравнительный вклад двух методов – трансгеноза и геномного редактирования, в улучшение хозяйственно-ценных признаков у растений рассмотрены нами ранее [51]. Достаточно отметить лишь тот факт, что с момента опубликования сообщения о возможности целенаправленного внесения двухцепочечных разрывов в целевой район-мишень до появления первого сорта сои с улучшенным составом жирных кислот в растительном масле, прошло всего лишь несколько лет. Вклад геномного редактирования в улучшение хозяйственно-ценных признаков у важных сельскохозяйственных видов растений можно найти в обзорах [52–54], в том числе в улучшение древесных [55], плодово-ягодных культур и декоративных видов [56].

Широкие перспективы открываются при совместном применении трансгеноза и геномного редактирования. Например, для того, чтобы избежать широкомасштабных отборов при создании сорта риса, в геном которого предполагалось доставить генетическую конструкцию с геном β -каротина, группа исследователей провела предварительный анализ районов интеграции для будущей генетической конструкции [57]. Для этого в геноме местного сорта риса, наиболее адаптированного к условиям района возделывания, были индуцированы мутации, среди которых с помощью метода фенотипирования [58] были отобраны только те мутации, которые не повлияли на изменение хозяйственно-ценных характеристик и урожайность сорта. Именно эти районы, получившие название “тихие гавани” (genomic safe harbors), и были выбраны исследователями для доставки целевого гена с применением метода геномного редактирования [57].

Поиск районов, обеспечивающих высокий выход рекомбинантных белков, для доставки в них целевых генов, проводится исследователями для клеток млекопитающих [59, 60] и насекомых [61]. Данный подход использован нами для

поиска районов в геноме *A. thaliana*, характеризующихся высокой транскрипционной активностью, которые могли бы послужить мишенями для доставки целевых генов методом геномного редактирования в варианте knock-in [62].

ОЦЕНКА РИСКОВ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ МОДИФИКАЦИИ ГЕНОМОВ РАСТЕНИЙ

Приведенные данные о широкомасштабном использовании генетически модифицированных организмов свидетельствуют о востребованности этой технологии по сравнению с технологиями интенсивного земледелия с применением химических веществ (гербицидов и инсектицидов). Однако успешное продвижение новых технологий создания сортов с новыми улучшенными характеристиками породили и настороженное отношение части общества к данным модификациям.

Во многих странах, использующих методы генетической модификации геномов для улучшения хозяйственно ценных характеристик важных сельскохозяйственных растений, обсуждаются и разрабатываются системы, обеспечивающие надзор за генетическими инновациями. Регистрация нового сорта в той или иной стране связана не только с закреплением прав собственности авторов, но и оценкой рисков, которые могут быть нанесены здоровью человека и окружающей среде. Обеспокоенность выявлением потенциальных рисков связана с тем, что технологии генетической модификации растений предполагают внедрение в геном генов из различных гетерологичных систем. Именно это обстоятельство и вызывает негативное отношение некоторой части человечества к коммерческому использованию генетически модифицированных сортов растений, так как ранее используемые методы селекции растений основывались на применении новых источников генов из природных дикорастущих популяций, либо на индукции новых мутаций с помощью мутагенеза. Даже несмотря на то, что улучшение хозяйственно-ценных признаков у растений с применением геномного редактирования, представляет собой усовершенствованную технологию генетической модификации растительного генома, в ряде стран все еще сохраняется некоторое недоверие части общества к таким технологиям.

На рис. 2 схематично представлены результаты изменений в последовательности ДНК после воздействия на растение мутагенов, либо после доставки генетических конструкций с помощью агробактериальной трансформации или биобаллистики. Сравнивая между собой все три варианта следует отметить, что в их основе лежит репарация индуцированных воздействием

извне повреждений в молекуле ДНК. Репарация повреждений ДНК после воздействия мутагенами (рис. 2) индуцирует различные перестройки — инсерции, делеции, транслокации и т.д., тогда как генетическая трансформация сопровождается внесением в геном инсерций экзогенного происхождения. В варианте геномного редактирования в результате репарационных событий также происходит возникновение инсерций, делеций и однонуклеотидных замен, приводящих к сдвигу рамки считывания и как результат — к нокаутам генов-мишеней (рис. 2). В результате всех этих рассмотренных вариантов генетической модификации генома у важных сельскохозяйственных видов растений селекционером отбираются только те варианты, которые соответствуют критериям улучшенного признака или свойства модифицируемого сорта. Таким образом, важным критерием при оценке биобезопасности генетически модифицированных сортов является рассмотрение тех доказательств, по которым данный продукт может быть допущен на рынок.

Следует отметить, что отношение потребителей к использованию продукции, полученной на основе ГМО-технологий, существенно изменилось с момента крупномасштабного выпуска генетически модифицированных растений и разгоревшихся дебатов о последствиях их выращивания за период с 2006 по 2020 г. [63]. Рассматривая развитие ГМО-технологий в мировом масштабе, отмечается тенденция предпочтения крупными биотехнологическими компаниями коммерческих культур, предназначенных для скормливания животным или для переработки в изделия (например, волокна), тогда как коммерциализация продовольственных культур все еще сталкивается с трудностями при выведении готовых продуктов на рынок [64]. В связи с этим проводятся исследования по безопасности продуктов, полученных на основе ГМО-технологий, а также разрабатываются различные рекомендации по повышению осведомленности общественности и потребителей результатами этих исследований [65].

В аналитическом обзоре [66] представлены данные оценки рисков при использовании технологий, основанных на ГМО-культурах, в частности, культурах, устойчивых к гербицидам и пестицидам. Автором отмечено, что выращивание ГМО-культур, у которых устойчивость к гербициду или инсектициду обеспечивается самим растением, существенно снижает дозы распыления этих химикатов на посевных площадях и оказывает меньшую экологическую нагрузку по сравнению с традиционными технологиями. Рассматривая опасения относительно генов, обеспечивающих устойчивость нового сорта, например, к гербицидам или инсектици-

дам, следует учитывать возможность адаптации других организмов, против которых направлена та или иная инновация. Автором подчеркивается, что использование только одного гербицида в течение нескольких лет приводило к повышению устойчивости сорняков именно к этому гербициду [66]. Применение глифосата для борьбы с сорняками при возделывании устойчивых к нему генетически модифицированных сортов, оказывало на сорняки сильное селективное давление. Под действием этого давления происходил отбор растений с повышенной устойчивостью к глифосату, либо отбор смещался в сторону тех видов сорняков, которые плохо контролируются глифосатом. Приведенные выше наблюдения послужили основой корректировок ГМО-технологий, основанных на применении гербицидов и инсектицидов путем введения большего их разнообразия. Влияние выращивания трансгенных растений, а также их остатков, на физико-химические свойства почвы, ее ферментативную активность и микробную биомассу за 20-летний период их возделывания, рассматриваются и обсуждаются в обзоре [67].

Оценивая степени риска и настороженное отношение потребителей к использованию в качестве источников питания сельскохозяйственных продуктов, полученных на основе применения ГМО-технологий, необходимо отметить, что практически в то же время, когда было получено сообщение о первом генетически модифицированном растении [1], созданном исследователями в условиях лаборатории, в геноме не трансформированного вида табака *N. glauca*, Graham. была идентифицирована последовательность, характеризующаяся высокой степенью гомологии (80%) с Т-ДНК *A. rhizogenes* [68]. Эта последовательность получила название клеточной ДНК (кл-ДНК). Впоследствии такие кл-ДНК-последовательности агробактериального происхождения были выявлены у достаточно большого числа видов растений, среди которых были и употребляемые в пищу, такие как батат и арахис. Возможность передачи кл-ДНК от *A. rhizogenes* в геномы природных популяций описана для растений рода *Linaria* [69]. Всего на данный момент кл-ДНК обнаружена среди представителей более 40 видов растений [70, 71]. Тот факт, что культивируемый сладкий картофель (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.), являющийся традиционной пищевой культурой в странах Африки, Китае, Южной и Центральной Америки и употребляемый ежегодно миллионами людей, относится к природно-трансгенным растениям [72], вполне может повлиять на все еще существующее недоверие к безопасности пищевых растений, полученных с применением ГМО-технологий.

ДАЛЬНЕЙШИЕ ПУТИ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ ТРАНСГЕНЕЗА И ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ

Интеграция в растительный геном фрагментов экзогенных ДНК, основанная на случайном их распределении по геному, поставила перед исследователями ряд вопросов фундаментального характера, связанных с функционированием гена в новом окружении генома, т.е. с его местоположением, а также вопросы структурно-функциональной организации генома в целом. Дальнейшее развитие исследований особенностей интеграции в растительный геном трансгенов, а также их “судьбы” в последующих поколениях исходных трансгенных растений, позволило исследователям выявить новые закономерности в реализации наследственной информации, такие как РНК-интерференция [73], замолкание трансгенов [74–76] и Т-ДНК-индуцированные мутации [77–79]. Таким образом, трансгенез следует рассматривать не только как метод переноса в геном растения-донора целевых генов из различных гетерологичных систем, но и как инструмент, позволяющий манипулировать уровнем экспрессии генов клетки-хозяина, а также индуцировать мутации.

Инсерционный мутагенез. Случайное попадание трансгена в функционально-значимые районы генома может быть причиной нарушений проявления генов, локализованных в данной области. В терминах классической генетики подобные нарушения относятся к инсерционным мутациям. Важным преимуществом таких мутаций является их доступность для молекулярного анализа, поскольку последовательности, фланкирующие Т-ДНК-инсерцию, могут быть использованы в качестве маркеров для выделения интактного гена, что позволяет рассматривать трансгенез как инструмент для поиска и изучения новых генов у растений. Широкий спектр мутаций, полученных при интеграции фрагментов экзогенных ДНК в геном растений *A. thaliana* при генетической трансформации [80], и к настоящему времени представленный обширными коллекциями в банке данных (GABI-Kat), привлекает пристальное внимание исследователей. С применением методов биоинформатики, позволяющих анализировать большие выборки данных о составе нуклеотидных последовательностей для районов интеграции Т-ДНК-инсерций у трансгенных растений *A. thaliana*, выявлены различные типы хромосомных перестроек, индуцированных такими инсерциями [81, 82]. С развитием технологий полногеномного секвенирования стало возможным проведение более глубокого анализа событий Т-ДНК инсерций и особенностей их интеграции путем ресеквенирования генома трансгенного растения [83]. Ав-

торами выявлены различные делеции в правой и левой областях, прилегающих к Т-ДНК-инсерции, а также во фланкирующих последовательностях самой инсерции. Необходимо подчеркнуть, что за 40 лет применения метода генетической трансформации для модификации геномов растений исследователями накоплены обширные коллекции инсерционных мутаций, представляющих огромный интерес для проведения секвенирования и оценки масштабов возможных геномных нарушений. Последние данные по локализации и структуре Т-ДНК-инсерций, а также представленности в геноме крупномасштабных геномных перестроек как результата интеграции чужеродной ДНК, обсуждаются в обзоре [84]. Обобщение и более глубокое понимание молекулярных процессов, лежащих в основе модификации растительных геномов с привлечением методов трансгенеза, несомненно, имеет огромное значение для дальнейшего развития и усовершенствования этих методов, например, в направлении поиска “тихих гаваней” для доставки целевых генов в геномы модифицируемых видов растений.

Исследование изменений нуклеотидного состава, выявленного нами во фланкирующих районах целевого гена, доставленного в район-мишень с помощью системы CRISPR/Cas9, может дать новую информацию о функционировании репарационных систем у растений [85]. В связи с этим накопление новых данных о перестройках в районах доставки целевых генов при геномном редактировании представляет большой интерес и является предметом наших будущих исследований.

Широкие возможности открываются перед исследователями, анализирующими природно-трансгенные виды растений, поскольку события интеграции последовательностей из генома *A. rhizogenes*, произошедшие в древние времена (возможно, сотни тысяч или миллионы лет назад), отражают особенности проявления чужеродных ДНК среди потомков первых древних модифицированных растений. Горизонтальный перенос генов между различными видами является мощным фактором эволюции прокариот, однако, несмотря на приобретение ядерной мембраны, изолирующей поток генов извне, этот процесс встречается и у эукариотических организмов, например, перенос генов агробактериального происхождения с их интеграцией в ядерный геном у различных видов покрытосеменных [86, 87]. Спонтанно созданные природно-трансгенные виды растений представляют собой уникальные модели для выявления роли агробактериальных генов в их эволюции, возможной роли кл-Т-ДНК как инсерций в природных трансформантах, а также исследования разнообразия различных штам-

мов *Agrobacterium* [88]. Установлено, что в геноме природно-трансгенного растения *N. noctiflora* Hook. при использовании метода глубокого секвенирования обнаруживались две разные кл-Т-ДНК, включающие интактные гены [89], экспрессия которых наиболее активно проявлялась в корнях по сравнению с другими органами растения. Избыточное накопление транскриптов RolB/RolC в клеточной культуре, индуцированной из тканей *I. batatas*, усиливало вторичный метаболизм сладкого картофеля посредством еще неизвестного к настоящему времени механизма [90]. Обсуждение функций генов агробактериального происхождения в геномах природно-трансгенных растений, а также возможная роль кл-Т-ДНК в эволюции растений представлены в мини-обзоре [91].

Замолкание трансгенов. Отдельные случаи потери экспрессии трансгена среди потомков трансгенных растений, зарегистрированные уже через несколько лет после получения первого трансгенного растения, а впоследствии выявленные среди большого числа трансформантов [92–94], явились отражением эволюционно сложившихся в растениях механизмов подавления эндогенных генов (TGS-транскрипционная инактивация генов; transcriptional gene silencing), а также механизма разрушения ДНК экзогенного происхождения (PTGS – пост-транскрипционная инактивация генов; post transcription gene silencing). В ходе эволюции у растений сформировались механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов, направленные на защиту от неконтролируемого размножения в геноме мобильных генетических элементов, а также от проникновения в растительные ткани вирусов и вириодов. Истории выявления путей инактивирования трансгенов на примере генетически модифицированных растений за сорок лет со дня создания первого трансгенного растения посвящен обзор Н. Vaucheret [95]. Выявление механизмов, позволяющих растению быстро и пластично регулировать экспрессию собственных генов в ответ на непредсказуемые условия внешней среды, стимулировало разработку новых подходов подавления экспрессии целевых генов, основанных на РНК-интерференции [96]. Включение в геном трансгенного растения дополнительных копий генов с целью получения сверхэкспрессии, а также снижение экспрессии других нежелательных генов за счет нокдаунов (РНК-интерференции) являются важными этапами в изучении метаболических путей у растений, а также создания трансгенных растений с измененными путями в биосинтезе вторичных метаболитов [97].

Геномное редактирование с применением CRISPR/Cas9, как усовершенствованный метод транскрипции, в настоящее время широко ис-

пользуется для получения мутаций по многим хозяйственно-ценным признакам у растений, в том числе и таким как устойчивость к неблагоприятным факторам среды, ответными реакциями растений на стрессовые воздействия и т.д. [98]. Изменения в биосинтезе антоцианов были достигнуты сайт-направленным редактированием гена F3H моркови с помощью системы CRISPR/Cas9 [99]. Известны работы по улучшению профиля гликозилирования путем нокауту генов *XylT* и *FucT*, кодирующих ферменты $\alpha(1,3)$ -фукозилтрансферазу и $\beta(1,2)$ -ксилозилтрансферазу в клеточной культуре табака [100, 101]. Следует подчеркнуть, что дальнейший прогресс в развитии инструментария для геномного редактирования клеточных культур ожидается в направлении индукции биаллельных мутаций, т.е. индукции нокауту по двум аллелям выбранного гена-мишени. Разработка такого инструментария актуальна и для работ по геномному редактированию вегетативно-размножающихся и древесных видов растений. Следует отметить успешное редактирование аллелей генов, представленных в разных гомеологах злаковых культур – тритикале [102] и пшеницы [103]. Современное состояние исследований в области клеточной инженерии в направлении улучшения качества рекомбинантных терапевтических белков представлено в обзоре [104].

Таким образом, к концу 20-го столетия в биологии завершилось создание новых направлений, таких, как биотехнология и генетическая инженерия растений. В настоящее время генетическая инженерия представляет собой не только мощный инструмент для проведения фундаментальных исследований в области генетики растений, но и открывает широкие перспективы практического применения в направлении улучшения хозяйственно-ценных признаков у важных сельскохозяйственных культур, а также использования растительных клеток в качестве платформ экспрессии для биосинтеза широкого спектра рекомбинантных белков, в том числе и для биофармацевтики. Дальнейшее развитие методов транскрипции предоставило исследователям новые современные инструменты молекулярной биологии, такие как технологии РНК-интерференции и редактирования геномов с применением CRISPR/Cas. Широкие возможности открываются при использовании клеточных культур растений в качестве биореакторов рекомбинантных белков. Дальнейшее развитие метода “тихих гаваней” для геномного редактирования в варианте knock-in открывает широкие перспективы в направлении повышения выхода рекомбинантного белка в клеточных культурах растений. Совершенствование методов клеточной инженерии с применением сайт-направленного мутагенеза обеспечивает

прогресс в направлении улучшения биотехнологических характеристик клеточных культур растений для производства терапевтических рекомбинантных белков. В целом современные методы генетической инженерии, в том числе и геномного редактирования, являются мощным дополнением к традиционным методам повышения урожайности сельскохозяйственных культур и улучшения их характеристик, а также к биотехнологическим методам наработки рекомбинантных белков с использованием растительных систем экспрессии. Выявление более 40 видов природно-трансгенных растений, в том числе и длительно употребляемых человечеством в качестве пищи, дает основание к пересмотру сложившегося все еще настороженного отношения сообщества к современным технологиям модификации растительных геномов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования (грант № FWNR-2022–0022). Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector // *Nature*. 1983. V. 303. N. 5914. P. 209. <https://doi.org/10.1038/303209a0>
- Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement // *Theor. Appl. Genet.* 2016. V. 129. P. 1639. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2747-6>
- Marone D., Mastrangelo A. M., Borrelli G. M. From transgenesis to genome editing in crop improvement: applications, marketing, and legal issues // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24: 7122. <https://doi.org/10.3390/ijms24087122>
- Zahmanova G, Aljabali A., Takova K, Minkov G, Tambuwala M., Minkov I., Lomonosoff G. Green biologics: harnessing the power of plants to produce pharmaceuticals // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 17575. <https://doi.org/10.3390/ijms242417575>
- Eidenberger L., Kogelmann B., Steinkellner H. Plant-based biopharmaceutical engineering // *Nat. Rev. Bioeng.* 2023. V. 1. P. 426. <https://doi.org/10.1038/s44222-023-00044-6>
- Агроботехнологии в мире / Под ред. К. Г. Скрыбина. Москва: Рост Медиа. 2009. С. 126.
- James C.M., Krattiger A.F. The first decade of crop biotechnology in global review of the field testing and commercialization of transgenic plants: 1986 to 1995 / ISAAA: Ithaca, NY, USA. 1996. V. 1.
- Kramer M.G., Redenbaugh K. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: the FLAVR SAVR™ tomato story // *Euphytica*. 1994. V. 79. P. 293.
- James C. Global review of commercialized transgenic crops: 1998. ISAAA Briefs № 8. ISAAA: Ithaca, NY. 1998.
- James C. Global status of commercialized Biotech/ GM Crops: 2010. ISAAA Briefs № 42. ISAAA: Ithaca, NY. 2010.
- AgbioInvestor.Global GM Crop Area Review May 2023. AgbioInvestor: Pathhead, UK, 2023. <https://gm.agbioinvestor.com/downloads>
- Zagorskaya A.A., Deineko E.V. Plant-expression systems: a new stage in production of biopharmaceutical preparations // *Russ. J. Plant Physiol.* 2021. V. 68. P. 17. <https://doi.org/10.1134/S1021443721010210>
- Hood E.E., Kusnadi A., Nikolov Z., Howard J. Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize // *Chemicals via Higher Plant Bioengineering* / Eds. F. Shahidi et al. New York: Plenum. 1999. P. 127.
- Kusnadi A.R., Evangelista R., Hood E., Howard J., Nikolov Z. Processing of transgenic corn seed and its effect on the recovery of recombinant glucuronidase // *Biotechnol. Eng.* 1998. V. 60. P. 44.
- Hood E.E., Witcher D.R., Maddock S., Meyer T., Baszczynski C., Bailey M., Flynn P., Register J., Marshall L., Bond D., Kulisek E., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C. et al. Commercial production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification // *Mol. Breed.* 1997. V. 3. P. 291.
- Witcher D., Hood E., Peterson D., Bailey M., Bond D., Kusnadi A., Evangelista R., Nikolov Z., Wooge C., Mehig R., Kappel W., Register J., Howard J. A. Commercial production β -glucuronidase (GUS): a model system for the production of proteins in plants // *Mol. Breed.* 1998. V. 4. P. 301.
- D'Aoust M.A., Couture M.M., Charland N., Trépanier S., Landry N., Ors F., Vézina L. P. The production of hemagglutininbased virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza // *Plant Biotechnol. J.* 2010. V. 8. P. 607. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00496.x>
- Ward B.J., Séguin A., Couillard J., Trépanier S., Landry N. Phase III: randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age // *Lancet*. 2021. V. 396. P. 1491. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.01.004>
- Stander J., Mbewana S., Meyers A. E. Plant-derived human vaccines: recent developments // *BioDrugs*. 2022. V. 36. P. 573. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00544-8>
- Su H., van Eerde A., Rimstad E., Bock R., Branza-Nichita N., Yakovlev I. A., Clarke J. L. Plant-made

- vaccines against viral diseases in humans and farm animals // *Front. Plant Sci.* 2023. V. 14: 1170815. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1170815>
21. Rybicki E. P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 2020. V. 12: e1587. <https://doi.org/10.1002/wnan.1587>
 22. Huebbers J. W., Buyel J. F. On the verge of the market – plant factories for the automated and standardized production of biopharmaceuticals // *Biotechnol. Adv.* 2021. V. 46: 107681. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107681>
 23. Schillberg S., Raven N., Fischer R., Twyman R. M., Schiermeyer A. Molecular farming of pharmaceutical proteins using plant suspension cell and tissue cultures // *Curr. Pharm. Des.* 2013. V. 19. P. 5531. <https://doi.org/10.1002/bit.27475>
 24. Corbin J. M., McNulty M. J., Macharoen K., McDonald K. A., Nandi S. Technoeconomic analysis of semicontinuous bioreactor production of biopharmaceuticals in transgenic rice cell suspension cultures // *Biotechnol. Bioeng.* 2020. V. 117. P. 3053. <https://doi.org/10.1002/bit.27475>
 25. Kopertekh L., Wilhelm R. Biosafety, risk analysis, and regulatory framework for molecular farming in Europe // *Techniques of Plant Molecular Farming. Concepts and Strategies in Plant Sciences* / Eds. C. Kole et al. Tools & Springer. 2023. P. 359. https://doi.org/10.1007/978-981-99-4859-8_14
 26. Gao F., Wen W., Liu J., Rasheed A., Yin G., Xia X., Wu X., He Zh. Genome-wide linkage mapping of QTL for yield components, plant height and yield-related physiological traits in the chinese wheat cross zhou 8425B/Chinese spring // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 1099. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01099>
 27. Soriano J. M., Alvaro F. Discovering consensus genomic regions in wheat for root-related traits by QTL metaanalysis // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 10537. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47038-2>
 28. Rozanova I. V., Khlestkina E. K. NGS sequencing in barley breeding and genetic studies // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2020. V. 24. P. 348. <https://doi.org/10.18699/VJ20.627>
 29. Stepochkin P. I., Gordeeva E. I., Khlestkina E. K. Marker-assisted breeding of hybrid lines of *Triticum dicoccon* (Schr.) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. with purple grain // *Proceedings on applied botany, genetics and breeding.* 2023. V. 184. P. 139. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-2-139-148>
 30. Xu Y., Liu X., Fu J., Wang H., Wang J., Huang C., Prasanna B. M., Olsen M. S., Wang G., Zhang A. Enhancing genetic gain through genomic selection: from livestock to plants // *Plant Communications.* 2020. V. 1. P. 100005. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100005>
 31. Sandhu K. S., Merrick L. F., Sankaran S., Zhang Z., Carter A. H. Prospectus of genomic selection and phenomics in cereal, legume and oilseed breeding programs // *Front. Genet.* 2022. V. 12. P. 829131. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.829131>
 32. Lebedev V. G., Lebedeva T. N., Chernodubov A. I., Shestibratov K. A. Genomic selection for forest tree improvement: methods, achievements and perspectives // *Forests.* 2020. V. 11. P. 1190. <https://doi.org/10.3390/f11111190>
 33. Shimatani Z., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Toki S., Terada R. Positive-negative-selection-mediated gene targeting in rice // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 748. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00748>
 34. Nester E. W. Agrobacterium: nature's genetic engineer // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 5. P. 730. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
 35. Chu P., Agapito-Tenfen S. Z. Unintended genomic outcomes in current and next generation gm techniques: a systematic review // *Plants.* 2022. V. 11. <https://doi.org/10.3390/plants11212997>
 36. Jupe F., Rivkin A. C., Michael T. P., Zander M., Motley S. T., Sandoval J. P., Keith Slotkin R., Chen H., Castanon R., Nery J. R., Ecker J. R. The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions // *PLoS Genet.* 2019. V. 15. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007819>
 37. Дейнеко Е. В., Новоселя Т. В., Загорская А. А., Филипенко Е. А., Шумный В. К. Стабильность экспрессии и наследования гена *nptII* в популяции трансгенных растений табака // *Доклады академии наук.* 1999. Т. 369. С. 420.
 38. Dehio Ch., Schell J. Stable expression of a single-copy *rolA* gene in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants allow an exhaustive mutagenic analysis of the transgene-associated phenotype // *Mol. Gen. Genet.* 1993. V. 241. P. 359. <https://doi.org/10.1007/BF00284689>
 39. Iglesias V. A., Moscone E. A., Papp I., Neuhauser F., Michalowski S., Phelan T., Spiker S., Matzke M., Matzke A. J. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 1251. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.8.1251>
 40. Matzke M. A., Neuhauser F., Matzke A. J. M. A variety of epistatic interaction can occur between partially homologous transgene loci brought together by sexual crossing // *Mol. Gen. Genet.* 1993. V. 236. P. 379. <https://doi.org/10.1007/BF00277137>
 41. Matzke A. J. M., Neuhauser F., Park Y. D., Ambros P. F., Matzke M. A. Homology-dependent gene silencing in transgenic plants: epistatic silencing loci contain multiple copies of methylated transgenes // *Mol. Gen. Genet.* 1994. V. 244. P. 218. <https://doi.org/10.1007/BF00285449>
 42. Rajeevkumar S., Anunanthini P., Sathishkumar R. Epigenetic silencing in transgenic plants // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 693. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>

43. Gelvin S.B. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome // *Annu. Rev. Genet.* 2017. V. 51. P. 195. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
44. Feldmann K.A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum // *Plant J.* 1991. V. 1. P. 71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1991.00071.x>
45. Gang H., Li G., Zhang M., Zhao Y., Jiang J., Chen S. Comprehensive characterization of T-DNA integration induced chromosomal rearrangement in a birch T-DNA mutant // *BMC Genom.* 2019. V. 20. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5636-y>
46. Pucker B., Kleinbölting N., Weisshaar B. Large scale genomic rearrangements in selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis // *BMC Genom.* 2021. V. 22. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07877-8>
47. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science.* 2012. V. 337. P. 816. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
48. Zhang Y., Iaffaldano B., Qi Y. CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants // *Plant Communications.* V. 2. P. 100168. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100168>
49. Pramanik D., Shelake R.M., Kim M.J., Kim J.Y. CRISPR-mediated engineering across the central dogma in plant biology for basic research and crop improvement // *Mol. Plant.* 2021. V. 14. P. 127. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.11.002>
50. Liu H., Chen W., Li Y., Sun L., Chai Y., Chen H., Nie H., Huang C. CRISPR/Cas9 technology and its utility for crop improvement // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 1. <https://doi.org/10.3390/ijms231810442>
51. Permyakova N.V., Deineko E.V. Crop improvement: comparison of transgenesis and gene editing // *Horticulturae.* 2024. V. 10. P. 57. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10010057>
52. Das T., Anand U., Pal T., Mandal S., Kumar M., Radha, Gopalakrishnan A.V., Lastra J.M.P., Dey A. Exploring the potential of CRISPR/Cas genome editing for vegetable crop improvement: an overview of challenges and approaches // *Biotechnol. Bioeng.* 2023. V. 120. P. 1215. <https://doi.org/10.1002/bit.28344>
53. Guo Y., Zhao G., Gao X., Zhang L., Zhang Y., Cai X., Yuan X. CRISPR/Cas9 gene editing technology: a precise and efficient tool for crop quality improvement // *Planta.* 2023. V. 258. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s00425-023-04187-z>
54. Das S., Kwon M., Kim J.Y. Enhancement of specialized metabolites using CRISPR/Cas gene editing technology in medicinal plants // *Front. Plant Sci.* 2024. V. 15. P. 1279738. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1279738>
55. Cao H.X., Vu G.T.H., Gailing O. CRISPR/Cas genome editing and applications in forest tree breeding // *Genome Modified Plants and Microbes in Food and Agriculture* / Academic Press, 2024. P. 343. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18444-4.00001-6>
56. Rukavtsova E.B., Zakharchenko N.S., Lebedev V.G., Shestibratov K.A. CRISPR-Cas genome editing for horticultural crops improvement: advantages and prospects // *Horticulturae.* 2023. V. 9. P. 38. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010038>
57. Dong O.X., Yu S., Jain R., Zhang N., Duong P.Q., Butler C., Li Y., Lipzen A., Martin J.A., Barry K.W., Schmutz J., Tian L., Ronald P.C. Marker-free carotenoid-enriched rice generated through targeted gene insertion using CRISPR-Cas9 // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14981-y>
58. Yang W., Feng H., Zhang X., Zhang J., Doonan J.H., Batchelor W.D., Xiong L., Yan J. Crop phenomics and high-throughput phenotyping: past decades, current challenges, and future perspectives // *Mol. Plant.* 2020. V. 13. P. 187. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.01.00>
59. Shin S., Hyun Kim S., Wook Shin S., Marie Grav L., Ebdrup Pedersen L., Seong Lee J., Min Lee G. Comprehensive analysis of genomic safe harbors as target sites for stable expression of the heterologous gene in HEK293 cells // *ACS Synth. Biol.* 2020. V. 9. P. 1263. <https://doi.org/10.1002/bit.28390>
60. Hilliard W., Lee K.H. A compendium of stable hotspots in the CHO genome // *Biotechnol. Bioeng.* 2023. V. 120. P. 2133. <https://doi.org/10.1002/bit.28390>
61. Miyata Y., Tokumoto S., Arai T., Shaikhutdinov N., Deviatiiarov R., Fuse H., Gogoleva N., Garushyants S., Cherkasov A., Ryabova A., Gazizova G., Cornette R., Shagimardanova E., Gusev O., Kikawada T. Identification of genomic safe harbors in the anhydrobiotic cell line, Pv11 // *Genes.* 2022. V. 13. P. 406. <https://doi.org/10.3390/genes13030406>
62. Permyakova N.V., Marenkova T.V., Belavin P.A., Zagorskaya A.A., Sidorchuk Y.V., Uvarova E.A., Kuznetsov V.V., Rozov S.M., Deineko E.V. Assessment of the level of accumulation of the difn protein integrated by the knock-in method into the region of the histone H3.3 gene of *Arabidopsis thaliana* // *Cells.* 2021. V. 10. P. 2137. <https://doi.org/10.3390/cells10082137>
63. Torres C.S., Osalla M.T.B., Gopela J.L.N., Torres D.M.S. Public perception of agricultural biotechnology: 16 years after the public debates on GM crops // Department of Agriculture Biotech Program Office, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Inc., College of Development Communication, UP Los Baños, and Southeast Asian Regional Center for Graduate Study and Research in Agriculture: Los Baños, Laguna, Philippines. 2023.
64. Zhang J. Overview of global GMO development // *AgNews.* 25 February. 2021. <https://news.agropages.com/News/NewsDetail---38175.htm>
65. Sendhil R.R., Nyika J., Yadav S., Mackolil J., Prashat R.G., Workie E., Ragupathy R., Ramasundaram P. Genetically modified foods:

- bibliometric analysis on consumer perception and preference // *GM Crops & Food*. 2022. V. 13. P. 65. <https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2038525>
66. *Graham Brookes P.G.* Genetically modified (GM) crop use 1996–2020: environmental impacts associated with pesticide use change // *GM Crops & Food*. 2022. V. 13. P. 262. <https://doi.org/10.1080/21645698.2022.2118497>
 67. *Lebedev V., Lebedeva T., Tikhonova E., Shestibratov K.* Assessing impacts of transgenic plants on soil using functional indicators: twenty years of research and perspectives // *Plants*. 2022. V. 11. P. 2439. <https://doi.org/10.3390/plants11182439>
 68. *White F.F., Garfinkel D.J., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W.* Sequence homologous to *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in the genomes of uninfected plants // *Nature*. 1983. V. 301. P. 348. <https://doi.org/10.1038/30348a0>
 69. *Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Pavlova O.A., Nester E.W., Lutova L.A.* Horizontal gene transfer from *Agrobacterium* to the plant *Linaria* in nature // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2012. V. 25. P. 1542. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0169-R>
 70. *Zhidkin R., Zhurbenko P., Bogomaz O., Gorodilova E., Katsapov I., Antropov D., Matveeva T.* Biodiversity of rolB/C-like natural transgene in the genus *Vaccinium* L. and its application for phylogenetic studies // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 6932. <https://doi.org/10.3390/ijms24086932>
 71. *Chen K., Zhurbenko P., Danilov L., Matveeva T., Otten L.* Conservation of an *Agrobacterium* cT-DNA insert in *Camellia* section *Thea* reveals the ancient origin of tea plants from a genetically modified ancestor // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 997762. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.997762>
 72. *Kyndt T., Quispe D., Zhai H., Jarret R., Ghislain M., Liu Q., Gheysen G., Kreuze J.F.* The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: an example of a naturally transgenic food crop // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 5844. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419685112>
 73. *Svoboda P.* Key mechanistic principles and considerations concerning RNA interference // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 1237. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01237>
 74. *Smith N.A., Singh S.P., Wang M.B., Stoutjesdijk P.A., Green A.G., Waterhouse P.M.* Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs // *Nature*. 2000. V. 407. P. 319. <https://doi.org/10.1038/35030305>
 75. *Teng C., Zhang C., Guo F., Song L., Fang Y.* Advances in the study of the transcriptional regulation mechanism of plant miRNAs // *Life*. 2023. V. 13. P. 1917. <https://doi.org/10.3390/life13091917>
 76. *Zhang Y., Niu N., Li S., Liu Y., Xue C., Wang H., Liu M., Zhao J.* Virus-induced gene silencing (VIGS) in Chinese Jujube // *Plants*. 2023. V.12. P. 2115. <https://doi.org/10.3390/plants12112115>
 77. *Mestiri I., Norre F., Gallego M.E., White C.I.* Multiple host-cell recombination pathways act in *Agrobacterium*-mediated transformation of plant cells // *Plant J.* 2014. V. 7. P. 511. <https://doi.org/10.1111/tj.12398>
 78. *Park S.Y., Vaghchhipawala Z., Vasudevan B., Lee L.-Y., Shen Y., Singer K., Waterworth W.M., Zhang Z.J., West C.E., Mysore K.S., Gelvin S.B.* *Agrobacterium* T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins // *Plant J.* 2015. V. 81. P. 934. <https://doi.org/10.1111/tj.12779>
 79. *Kleinboelting N., Huep G., Appelhagen I., Viehoever P., Li Y., Weisshaar B.* The structural features of thousands of T-DNA insertion sites are consistent with a double-strand break repair-based insertion mechanism // *Mol. Plant*. 2015. V. 8. P. 1651. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.011>
 80. *Azpiroz-Leehan R., Feldmann K.A.* T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth // *Trends Genet.* 1997. V. 13. P. 152. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01094-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01094-9)
 81. *Gang H., Liu G., Zhang M., Zhao Y., Jiang J., Chen S.* Comprehensive characterization of T-DNA integration induced chromosomal rearrangement in a birch T-DNA mutant // *BMC Genom.* 2019. V. 20. P. 311. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5636-y>
 82. *Pucker B., Kleinbölting N., Weisshaar B.* Large scale genomic rearrangements in selected *Arabidopsis thaliana* T-DNA lines are caused by T-DNA insertion mutagenesis // *BMC Genom.* 2021. V. 22. P. 599. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07877-8>
 83. *Chen X., Dong Y., Huang Y., Fan J., Yang M., Zhang J.* Whole-genome resequencing using next generation and Nanopore sequencing for molecular characterization of T-DNA integration in transgenic poplar 741 // *BMC Genom.* 2021. V. 22. P. 329. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07625-y>
 84. *Thomson G., Dickinson L., Jacob Y.* Genomic consequences associated with *Agrobacterium*-mediated transformation of plants // *Plant J.* 2024. V. 117. P. 342. <https://doi.org/10.1111/tj.16496>
 85. *Permyakova N.V., Marenkova T.V., Belavin P.A., Zagorskaya A.A., Sidorchuk Y.V., Deineko E.V.* CRISPR/Cas9-mediated targeted DNA integration: rearrangements at the junction of plant and plasmid DNA // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 8636. <https://doi.org/10.3390/ijms2318636>
 86. *Matveeva T.V.* *Agrobacterium*-mediated transformation in the evolution of plants // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018. V. 418. P. 421. https://doi.org/10.1007/82_2018_80
 87. *Matveeva T.V., Otten L.* Widespread occurrence of natural genetic transformation of plants by *Agrobacterium* // *Plant Mol. Biol.* 2019. V. 101. P. 415. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00913-y>
 88. *Matveeva T.V., Sokornova S.V.* Biological traits of naturally transgenic plants and their evolutionary roles // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 635. <https://doi.org/10.1134/S1021443717050089>
 89. *Khafizova G.V., Sierro N., Ivanov N.V., Sokornova S.V., Polev D.E., Matveeva T.V.* *Nicotiana noctiflora* Hook.

- genome contains two cellular T-DNAs with functional genes // *Plants*. 2023. V. 12. P. 3787.
<https://doi.org/10.3390/plants12223787>
90. Vasyutkina E.A., Yugay Y.A., Grigorchuk V.P., Grishchenko O.V., Sorokina M.R., Yaroshenko Y.L., Kudinova O.D., Stepochkina V.D., Bulgakov V.P., Shkryl Y.N. Effect of stress signals and Ib-rolB/C overexpression on secondary metabolite biosynthesis in cell cultures of *Ipomoea batatas* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 15100.
<https://doi.org/10.3390/ijms232315100>
 91. Матвеева Т.В. Зачем растениям агробактериальные гены? // *Экологическая генетика*. 2021. Т. 19. С. 365. <https://doi.org/10.17816/ecogen89905>
 92. Matzke M.A., Priming M., Tronovsky J., Matzke A.J.M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 643.
<https://doi.org/10.1002/i.1460-2075.1989.tb.03421.x>
 93. Scheid M.O., Pazkowsky J., Potrycus I. Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. Gen. Genet.* 1991. V. 228. P. 104.
<https://doi.org/10.1007/BF00282454>
 94. Finnegan J., McElroy D. Transgene inactivation: plants fight back! // *Nat. Biotechnol.* 1994. V. 12. P. 883. <https://doi.org/10.1038/nbt0994-883>
 95. Vaucheret H. Epigenetic management of self and non-self: lessons from 40 years of transgenic plants // *C. R. Biol.* 2023. V. 345. P. 149.
<https://doi.org/10.5802/crbiol.96>
 96. Animasaun D.A., Lawrence J.A. Antisense RNA (asRNA) technology: the concept and applications in crop improvement and sustainable agriculture // *Mol. Biol. Rep.* 2023. V. 50. P. 9545.
<https://doi.org/10.1007/s11033-023-08814-6>
 97. Rajput M., Choudhary K., Kumar M., Vivekanand V., Chawade A., Ortiz R., Pareek N. RNA interference and CRISPR/Cas gene editing for crop improvement: paradigm shift towards sustainable agriculture // *Plants*. 2021. V. 10. P. 1914.
<https://doi.org/10.3390/plants10091914>
 98. Zhao G., Cheng Q., Zhao Y., Wu F., Mu B., Gao J., Yang L., Yan J., Zhang H., Cui X, Chen Q. The abscisic acid—responsive element binding factors MAPKKK18 module regulates abscisic acid-induced leaf senescence in *Arabidopsis* // *J. Biol. Chem.* 2023. V. 9. P. 103060.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103060>
 99. Klimek-Chodacka M., Oleszkiewicz T., Lowder L. G., Qi Y., Baranski R. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells // *Plant Cell Rep.* 2018. V. 37. P. 575.
<https://doi.org/10.1007/s00299-018-2252-2>
 100. Mercx S., Smargiasso N., Chaumont F., De Pauw E., Boutry M., Navarre C. Inactivation of the $\beta(1,2)$ -xylosyltransferase and the $\alpha(1,3)$ -fucosyltransferase genes in *Nicotiana tabacum* BY-2 cells by a multiplex CRISPR/Cas9 strategy results in glycoproteins without plant-specific glycans // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 403.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00403>
 101. Sheva M., Hanania U., Ariel T., Turbovski A., Rathod V.K.R., Oz D., Tekoah Y., Shaaltiel Y. Sequential genome editing and induced excision of the transgene in *N. tabacum* BY2 cells // *Front. Plant Sci.* 2020. V. 11. P. 607174.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607174>
 102. Miroshnichenko D., Timerbaev V., Divashuk M., Pushin A., Alekseeva V., Kroupin P., Bazhenov M., Samarina M., Ermolaev A., Karlov G., Dolgov S. CRISPR/Cas9-mediated multiplexed multi-allelic mutagenesis of genes located on A, B and R subgenomes of hexaploid triticale // *Plant Cell Rep.* 2024. V. 43. P. 59.
<https://doi.org/10.1007/s00299-023-03139-x>
 103. Zhang S., Zhang R., Gao J., Gu T., Song G., Li W., Li D., Li Y., Li G. Highly efficient and heritable targeted mutagenesis in wheat via the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated CRISPR/Cas9 system // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 4257.
<https://doi.org/10.3390/ijms20174257>
 104. Karki U., Fang H., Guo W., UnnoldCofre C., Xu J. Cellular engineering of plant cells for improved therapeutic protein production// *Plant Cell Rep.* 2021. V. 40. P. 1087.
<https://doi.org/10.1007/s00299-021-02693-6>