

УДК 581.1

ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ – ЭФФЕКТИВНАЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ГЕНОМИКИ

© 2024 г. И. В. Голденкова-Павлова^{a,*}, О. С. Павленко^a, И. С. Демьянчук^a,
В. А. Фридман^a, А. А. Тюрин^a

^aФедеральное государственное бюджетное научное учреждение
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: irengold58@gmail.com

Поступила в редакцию 23.03.2024 г.

После доработки 29.03.2024 г.

Принята к публикации 31.03.2024 г.

Большой массив данных об экспрессии генов растений, накопленный благодаря сравнительным исследованиям, направляет усилия исследователей для изучения тонких механизмов влияния целевых генов и, как следствие, на разработку относительно простых и одновременно эффективных подходов, позволяющих понять физиологическую роль белковых продуктов гена. Многочисленные исследования убедительно продемонстрировали эффективность стратегии транзientной экспрессии для характеристики функций генов растений. Цели обзора: (i) рассмотреть преимущества и ограничения различных растительных систем и методов временной экспрессии, используемых для выяснения роли генных продуктов; (ii) обобщить текущие данные об использовании подходов к временной экспрессии для понимания тонких механизмов, лежащих в основе функции генов; (iii) описать достижения в области эффективной временной экспрессии генов растений. В обзоре обсуждаются основные и критические этапы каждого из методов транзientной экспрессии генов у растений, области их применения, а также основные результаты, полученные с использованием растительных объектов и их вклад в наши знания о тонких механизмах функций генов, лежащих в основе роста и развития растений, включая выяснение механизмов, регулирующих сложные метаболические пути.

Ключевые слова: белок-белковые взаимодействия, геномное редактирование, локализация белков, растительные системы, транзientная экспрессия, функции генов

DOI: 10.31857/S0015330324050023, EDN: MNDXFM

ВВЕДЕНИЕ

Использование технологий генетической инженерии, т.е. получения трансгенных растений, позволило получить уникальные экспериментальные модели, многосторонний молекулярный и физиолого-биохимический анализ которых предоставил беспрецедентные экспериментальные подтверждения о функциональной роли множества растительных генов [1]. Однако несмотря на кажущуюся простоту получения трансгенных растений, главные ограничения

широкого использования этой технологии следующие: зависимость эффективности трансформации от генотипа; значительные материальные и временные затраты при создании трансгенных линий, включающие эффективный отбор истинных трансгенных растений из огромного количества первичных трансформантов; доказательство интеграции переносимых последовательностей и событий интеграции в единственной копии в геном растений; определение уровня экспрессии как на уровне мРНК, так и на уровне белкового продукта; и т.п. Эти ограничения в создании стабильных трансформантов растений, и, прежде всего, с точки зрения затрат времени, несколько снижают ее полезность [1], отсюда стала очевидной востребованность более

Сокращения: PTGS – пост-транскрипционное замолкание генов; ББВ – белок-белковые взаимодействия; ТФ – транскрипционный фактор.

простых и эффективных подходов для экспериментальной верификации физиологической роли растительных генов.

Большой экспериментальный задел по изучению агробактериальной трансформации разных видов растений прояснил ключевые механизмы переноса, интеграции и экспрессии гетерологичных генов в них. Согласно экспериментальным данным, процесс переноса генной конструкции — а это, как правило, Т-ДНК — можно разделить на два основных этапа: проникновение агробактерий в растительную ткань (трансфекция) и трансформация Т-ДНК в геном растения (интеграция). Следует отметить, что первый этап (трансфекция) намного эффективнее второго. Действительно, второй этап — интеграция — зачастую настолько малоэффективен, что крайне мало трансформированных клеток из общей популяции могут быть отобраны с использованием селективных маркеров. Дифференциальная эффективность этих этапов означает, что в течение короткого времени миллионы растительных клеток трансфицируются Т-ДНК, но не обязательно трансформируются, и это дает возможность для кратковременной (транзиентной) экспрессии генных конструкций в растительной клетке [2], при которой неинтегрированные копии Т-ДНК временно остаются в ядре и могут транскрибироваться и транслироваться [2–5].

В представленном обзоре освещены современные экспериментальные подходы к исследованию физиологической роли генов у растений с использованием стратегии транзиентной экспрессии и обсуждены их преимущества и ограничения. В настоящее время было бы несправедливым говорить о недостатке публикаций, в которых представлены подробные базовые протоколы транзиентной экспрессии для различных видов растений, а также описаны технические аспекты, связанные с эффективным использованием этого подхода для оценки функциональной роли гена(ов) у определенных видов растений [1, 6]. Отметим также, что есть многочисленные обзоры, в которых транзиентная экспрессия генов в растительных системах применена для наработки рекомбинантных белков, прежде всего медицинского назначения [7]. Однако обзоры, в которых рассмотрены и обсуждены ключевые составляющие стратегии транзиентной экспрессии для разных растительных систем, применительно к исследованию физиологической роли растительных генов, в настоящее время в доступной научной литературе не представлены.

Цель обзора состоит в том, чтобы: (i) рассмотреть преимущества и ограничения различных растительных систем и разных методов транзиентной экспрессии, используемых для выяснения роли целевых генных продуктов; (ii) суммировать современные данные об использовании

подходов транзиентной экспрессии для выявления тонких механизмов функционирования целевых генных продуктов; (iii) представить успехи в обеспечении эффективного функционирования целевых последовательностей при транзиентной экспрессии в растениях, в том числе и за счет использования вирусных супрессоров замолкания генов, подбора штаммов агробактерий и условий выращивания растений. В обзоре будут обсуждены основные и критические шаги для каждого метода этой общей стратегии, области их использования и основные результаты, полученные на растительных объектах, а также их вклад в наши знания о тонких механизмах функционирования генов у растений, задействованных процессах роста и развития, в реакции на действие факторов среды, а также для прояснения механизмов регуляции сложных метаболических путей.

ТРАНЗИЕНТНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ: ГЕННЫЕ КОНСТРУКЦИИ, РАСТИТЕЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ И ИХ ДОСТАВКА В РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

Генетическая трансформация на основе *Agrobacterium* включает два конкретных механизма: стабильную (интеграция Т-ДНК в геном стабильно наследуется) [8] и транзиентную трансформацию (отсутствие интеграции Т-ДНК в геном, но способную осуществлять транскрипцию и трансляцию) [2].

Хорошо известно, что наследственные мутации, включая и Т-ДНК мутации или инсерции, могут передаваться только следующим поколениям, но это не относится к транзиентной экспрессии, поскольку гены в области Т-ДНК только временно экспрессируются в соматических клетках растительных тканей, но не в половых клетках, и поэтому не передаются по наследству.

Убедительно продемонстрировано, что временная экспрессия генов приводит к образованию больших количеств рекомбинантных белков за очень короткое время (несколько дней) [7, 9].

Временная генетическая трансформация демонстрирует высокую эффективность трансформации — до 21.8%, по сравнению с эффективностью стабильной генетической трансформации — 0.14% [10]. Стабильная трансформация — трудоемкий процесс, занимающий часто несколько месяцев для получения трансформированных растений [1]. С другой стороны, транзиентная трансформация — это быстрый метод с высоким уровнем экспрессии. Временная экспрессия гетерологичных генов в растениях является многообещающей по сравнению с реализацией утомительных и трудоемких методов стабильной экспрессии [3, 11].

Таким образом, согласно текущему мнению, технология транзientной экспрессии генов в растительных системах в сравнении со стабильной экспрессией имеет важные преимущества: не требуется регенерации трансформированной клетки (не использует культуру тканей растений); отсутствует влияние на стабильность генома хозяина (вследствие отсутствия интеграции переносимой Т-ДНК); отсутствует зависимость от позиционных эффектов мест интеграции Т-ДНК; требует меньших материальных затрат; более эффективна по сравнению со стабильной. Применение этой технологии позволяет радикально ускорить сроки исследования, поскольку изучение функции целевого гена может быть проанализировано в короткий временной промежуток (от 2 до 10 дней) после доставки генной конструкции в растительные клетки (рис. 1). Эти преимущества сделали систему транзientной экспрессии мощным инструментом для изучения функции генов *in vivo* посредством физиологической и молекулярной характеристики различного растительного материала [1, 3, 11].

Для транзientной экспрессии в основном используют два типа генных конструкций: экспрессионные векторы, полученные на основе бинарных Ti-плазмид с генными кассетами в виде Т-ДНК, и векторы, несущие модифицированные геномные последовательности растительных вирусов, в том числе и клонированные в кассеты Т-ДНК [1, 12].

Для транзientной экспрессии в качестве растительных систем используют протопласты [13], каллус, суспензионные культуры [12], интактные растения [14], а также изолированные органы [15] или специализированные ткани растений [13] (рис. 1).

Для доставки генных конструкций при транзientной экспрессии генов в растениях разработаны и используются несколько подходов: трансфекция протопластов с использованием полиэтиленгликоля или электропорации; биобаллистика и агроинфильтрация [1].

Получение лишенных клеточных стенок протопластов представляет собой эффективный подход преобразования сложно организованных тканей растений в объекты, более доступные наблюдению [16, 17], что обеспечивает их широкую применимость в исследованиях субклеточной локализации белковых продуктов целевых генов, а также в тестировании различных регуляторных последовательностей, таких как промоторы и трансляционные энхансеры. Протопласты могут быть крайне полезны и в исследованиях клеточно-автономных регуляторных процессов и ответов количественным и высокопроизводительным способом. Однако протопласты имеют ограниченную применимость для

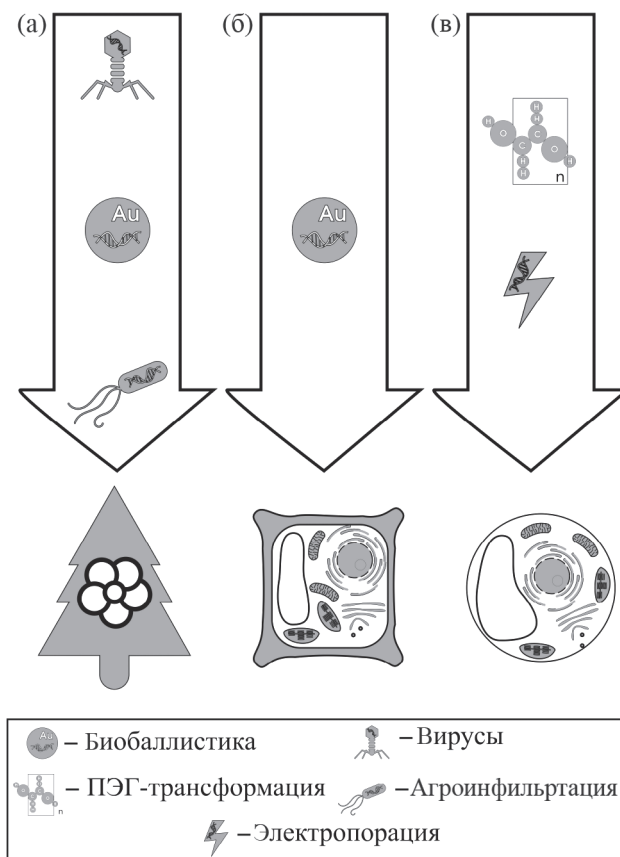


Рис. 1. Растительные системы, используемые для транзientной экспрессии и их доставка в растительные клетки: (а) – интактные растения, изолированные органы или специализированные ткани растений, основные способы доставки – агроинфильтрация, вирусные частицы, биобаллистика; (б) – каллус, суспензионные культуры растительных клеток, основные способы доставки – биобаллистика; (в) – протопласты растительных клеток, основные способы доставки – электропорация.

случаев, когда требуется тканевый и/или организменный контекст [15]. Следует при этом отметить, что трансфекция протопластов работает хорошо только для некоторых видов растений, при этом для высокого выхода жизнеспособных протопластов и их эффективной трансфекции необходимы сложные подготовительные процедуры [18].

Временная экспрессия гена(ов) в растительных клетках также может осуществляться методом высокоскоростной биобаллистики. Впервые этот метод был продемонстрирован в лаборатории Дж.К. Сэнфорда из Корнельского университета в конце 1980-х годов [19]. Преимущество метода доставки с использованием биобаллистики – применимость для различных видов растений. Этот способ доставки также оказался полезным при использовании каллуса и специализированных тканей растений.

Например, таких, как слой алейрона сои, который является биологическим показателем семядоли семян этих растений, поскольку одноклеточный слой алейрона сравним с семядольной тканью сои, согласно морфологического анализу и данным сравнительного анализа белков и метаболитов [20]. Как следствие, такая растительная система является потенциально полезной платформой для транзientной экспрессии в исследованиях функционального анализа генов, которые влияют на признаки семян у сои [21]. Однако при использовании биобаллистики есть определенные ограничения, среди которых следует отметить низкую эффективность доставки генных конструкций; относительно сложную процедуру подготовки биологического материала, например, для спелых мясистых плодов, анатомически не подходящих для бомбардировки; необходимость наличия специального лабораторного оборудования и материалов [20].

Суспензионные культуры клеток в основном получены для модельных растений, таких как *Arabidopsis thaliana* и *Nicotiana tabacum* (BY-2). Эти виды имеют схожие ограничения в области применения с методом протопластов. Например, поскольку клетки BY-2 являются недифференцированными, с этой тканью можно тестировать только конститутивные регуляторные элементы [21].

Транзientная экспрессия, опосредованная *Agrobacterium*, обычно известная как агроинфильтрация или агроинъекция, основана на проникновении раствора, содержащего агробактерии, в межклеточные пространства растительных тканей [22]. Агроинфильтрация может осуществляться с помощью многочисленных методов, таких как инфильтрация шприцем, вакуумная инфильтрация, агроинфильтрация на основе перекиси водорода, специальный метод агроинфильтрации, вакуумная инфильтрация с помощью листового диска, агроинфильтрация на основе опрыскивания и метод инфильтрации с использованием отдельных листьев [6].

Согласно текущему мнению, транзientную экспрессию генов в растениях технически легче проводить именно с использованием технологии агроинфильтрации, которая имеет ряд преимуществ. Во-первых, агроинфильтрация позволяет преодолеть ряд критических этапов, связанных с получением протопластов и их трансфекцией: (i) при выделении протопластов из интактного растения значение имеют условия их выращивания; (ii) часто требуется стерилизация растительной ткани; (iii) для эффективности трансфекции протопластов необходим строгий контроль качества и количества протопластов и плазмидной ДНК [23]. Во-вторых, при ис-

пользовании технологии агроинфильтрации минимизируются как процедуры трансформации, так и стрессовые воздействия на растительную клетку [24]. В-третьих, технология агроинфильтрации характеризуется высокой эффективностью, которая обусловлена тем, что до одной трети объема растительной ткани составляет межклеточное пространство, и агробактерии активно доставляются в межклеточное пространство растительной ткани [13]. Дополнительными преимуществами этой технологии являются быстрая масштабируемость процесса, которая дает возможность обрабатывать большое количество растений, а также гибкость введения нескольких трансгенных конструкций в разные области листовой пластинки, что позволяет проводить несколько анализов на одном листе [24]. Более того, такой эксперимент проводится в нативных условиях, благодаря чему сохраняется тканевая организация и клеточная целостность растения [13].

Необходимым условием успешной агроинфильтрации растения является его восприимчивость к инфекции *A. tumefaciens*. Среди восприимчивых растений важным критерием является податливость различных видов к агроинфильтрации, которая зависит от генетического фона растения-хозяина и значительно варьирует из-за структурных различий в кутикуле, компактности клеток мезофилла [25]. Наиболее популярным растением-хозяином для агроинфильтрации является *Nicotiana benthamiana* и родственные ему виды. В то же время усовершенствование технологии транзientной экспрессии позволило применить агроинфильтрацию ко многим видам растений (на сегодняшний день — более 40 видов), в том числе и древесным. Кроме тканей листа трансгенными конструкциями также успешно были агроинфильтрованы лепестки табака, петунии, цветки нескольких видов дендробиума, плоды томатов и клубники [13].

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В РАСТЕНИЯХ

Оценка генетических конструкций и регуляторных последовательностей. Исторически транзientная экспрессия генов в растительных системах была применена для тестирования функциональности генетических конструкций, сконструированных для получения трансгенных растений. Основная цель такой верификации — оценить, будет ли эффективно экспрессироваться переносимый целевой ген в растительных клетках. Многочисленные исследования продемонстрировали корректность

такого подхода и согласованность результатов транзientной и стабильной экспрессии перенесенных генов.

Интерес исследователей в оценке функциональной активности регуляторных последовательностей, таких как промоторы и энхансеры, а также модифицированных последовательностей целевых генов, на простых и надежных моделях, привел к развитию направления использования транзientной экспрессии для предварительного тестирования активности последовательностей (рис. 2). И технологию транзientной экспрессии исследователи используют для решения фундаментальных и прикладных задач. Например, в работе пакистанских исследователей продемонстрирована успешная модификация кодового состава гена *EPSPS*, продукт которого способен обеспечить устойчивость к гербицидам [26].

В нашем недавно проведенном исследовании с использованием технологии транзientной экспрессии генов в растениях предложены новые подходы для оптимизации кодового состава целевых генов (на примере интерферона αA) и поиска регуляторных последовательностей, на примере 5'-НТО, с целью модуляции ключевого клеточного процесса — трансляции — и, как следствие, для эффективного синтеза белковых продуктов целевых генов в растительных системах [27]. Убедительно продемонстрировали, что обеспечение стабильности белкового продукта в соответствии с правилом N-конца или за счет нового белок-стабилизирующего партнера (термостабильной лихеназы) достаточно эффективно и приводит к значимому увеличению белкового продукта в растительной системе. При транзientной экспрессии убедительно доказано, что термостабильная лихеназа

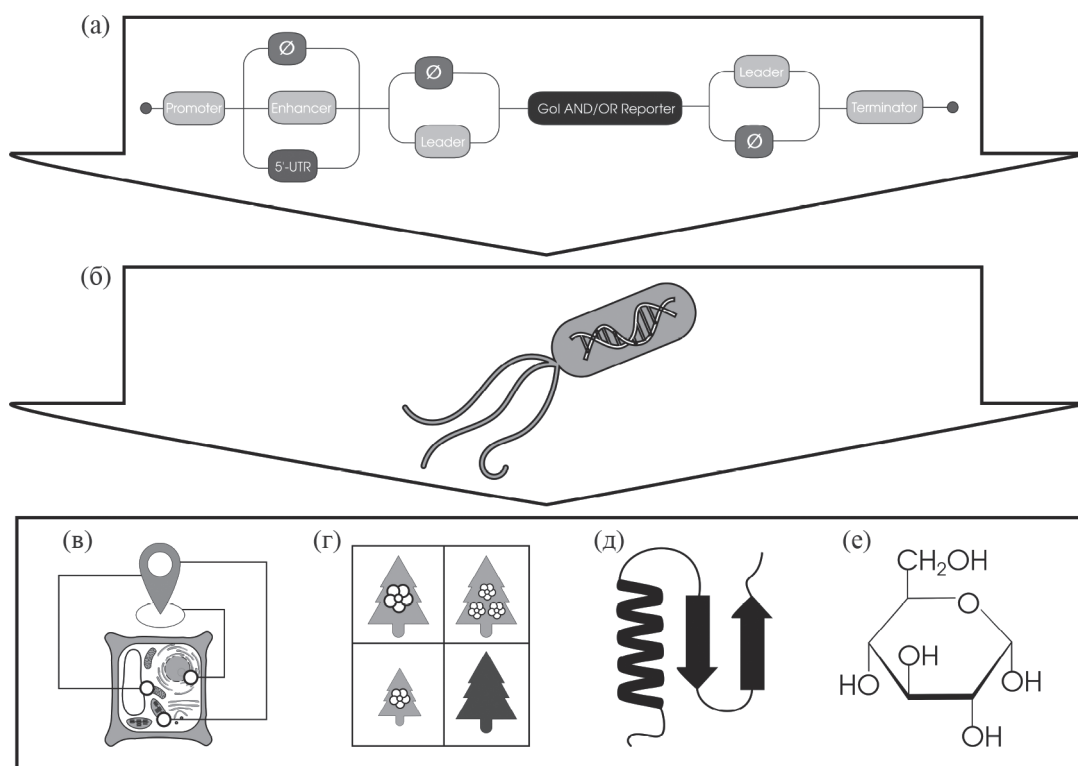


Рис. 2. Схема генных конструкций Т-ДНК для различных аспектов изучения продуктов гена в растительной клетке: (а) — общая схема Т-ДНК области, включающая промотор и терминатор (Promoter, Terminator — обязательные составляющие); энхансер (Enhancer, клонируется при тестировании функциональной активности последовательностей); лидерный сигнал (Leader, клонируется при изучении локализации генного продукта в растительной клетке); целевой ген и/или репортерный ген (GoI and/or Reporter — целевой ген клонируется при изучении функциональной роли генного продукта целевого гена; транскрипционно-трансляционное слияние целевого гена с репортерным геном используется при изучении локализации генного продукта в растительной клетке, а также в исследованиях белок-белкового взаимодействия; репортерный ген используется при тестировании функциональной активности последовательностей); (б) — генными конструкциями трансформируют агробактерии, которые используют при транзientной экспрессии для (в) изучения локализации генного продукта в растительной клетке; (г) — оценки фенотипа растений при изучении функциональной роли генного продукта целевого гена; (д) — исследовании свойств белкового продукта целевого гена, включая активности целевого белка, белок-белковые взаимодействия и др.; (е) для тестирования продуктов его функционирования с целью прояснение механизмов регуляции сложных метаболических путей.

как белок-стабилизирующий партнер не только не оказывает достоверного негативного влияния на активность целевого белка интерферона αA , входящего в его состав, но и увеличивает его накопление в растительных клетках [27].

Большой объем данных об экспрессии генов, полученный в сравнительных омиксных исследованиях, и, как правило, тщательно обработанный с помощью доступных инструментов биоинформатики, позволил выявить общие сети транскриптома, контролируемые ту или иную функцию. Более того, разработаны алгоритмы для предсказания функциональной роли нуклеотидных контекстов в регуляторных последовательностях. Следует подчеркнуть, что подходы *in silico* анализа в основном опираются на предсказательную функциональную классификацию генов или консервативность мотивов в регуляторных последовательностях, построенных на основе поиска и сравнительного анализа с известными последовательностями. И, как правило, такое предсказание требует экспериментальной верификации.

Технология транзientной экспрессии востребована исследователями для такой экспериментальной верификации с использованием репортерных генов. Так, предсказание сайтов связывания транскрипционного фактора (ТФ) и цис-регуляторных элементов (CRE) на промоторах генов FvSPR1-like2 (SPIRAL) и FvSPT (SPATULA) земляники лесной диплоидной (*Fragaria vesca* L.) с последующей верификацией их функциональности за счет делеционного анализа при транзientной экспрессии в растениях позволили подтвердить следующие регуляторные элементы и их функции: (i) в промоторе гена FvSPR1-like2: (1) мотивы для ТФ MYB59, WRKY25 и WRKY8, которые играют роль в передаче сигналов этилена; (2) мотивы для семейства ТФ ARF (auxin response factors), которые играют роль в передаче сигналов ауксина; (ii) в промоторе гена FvSPT: (1) мотивы для семейства ТФ ARR (Arabidopsis response regulators), которые играют роль в передаче сигналов цитокининов; (2) мотивы для семейства ТФ ERF (ethylene response factors), которые играют роль в передаче сигналов этилена. Эти результаты обеспечивают понимание функции генов, участвующих в не климактерическом созревании плодов клубники, и механизма, лежащего в основе этого процесса [28].

Согласно имеющемуся мнению, растения являются перспективной платформой для производства рекомбинантных белков. Одна из основных проблем эффективного использования их в качестве биофабрик связана с обеспечением высокого уровня выхода целевых продуктов. Недавно предложен новый подход к повышению уровня синтеза рекомбинантного белка, опосре-

дованного вирусным вектором. Этот подход основан на гипотезе о том, что противовирусная защита ослабляется во время антибактериального клеточного ответа [29]. Авторы работы предположили, что введенные в клетку чужеродные белки, локализованные в ядре, в том числе эффекторы, такие как бактериальные нуклеомодулины, могут препятствовать импорту клеточных ядерных белков и запускать реакции антибактериальной защиты, создавая благоприятные условия для цитоплазматической репродукции вируса. С целью подтверждения гипотезы проведены исследования по синтезу искусственного ядерного белка – красного флуоресцентного белка (mRFP), слитого с последовательностью ядерной локализации (NLS), как миметика бактериального эффектора. Было убедительно продемонстрировано, что суперпродукция mRFP:NLS индуцировала в *N. benthamiana* накопление мРНК γ -тионина (*Nb γ Thio*). Синтез NLS-содержащего белка и повышение экспрессии *Nb γ Thio* стимулировали размножение вирусного вектора на основе генома крестоцветной табачной мозаики вирус (crTMV) в листьях *N. benthamiana*. Таким образом, показано, что NLS-индуцированная активация *PryThio* и повышенное накопление мРНК *Nb γ Thio* приводят к стимуляции экспрессии GFP из crTMV [29].

Прояснение функций генных продуктов целевого гена. Для выяснения функций генных продуктов целевого гена при транзientной экспрессии, как правило, используют два основных подхода: обеспечение высокого уровня экспрессии и замолкание экспрессии целевого гена, которые применяют независимо или в комбинации (рис. 2). Таким образом, подходы, которые используют при транзientной экспрессии, сходны с подходами, используемыми при стабильной трансформации растений. Однако, согласно экспериментальным данным, при транзientной экспрессии эти два подхода, как правило, эффективны для выяснения функций генных продуктов, вариации в экспрессии которых приводят либо к видимому изменению фенотипа используемой растительной системы, либо к вариациям активности белков в метаболических путях, что отражается на качественном и/или количественном составе метаболома растений. Но в то же время очевидно и преимущество использования подходов транзientной экспрессии целевого генного продукта. Это, прежде всего, их применимость не только на ткани листьев, но и к отдельным органам растений, в частности к плодам и ягодам, что значительно сокращает временные и материальные затраты на исследование, по сравнению с получением стабильных трансформантов растений.

В качестве примера использования транзientной экспрессии можно привести недавние

исследования по функциональному анализу генов, важных в процессе старения растений. Система мониторинга транзientной экспрессии целевых генов в протопластах мезофилла растений *A. thaliana* включала в себя дифференциально экспрессирующийся репортер на основе люциферазы, который управлялся промоторами *SEN4* и *SAG12*. Данные гены (*SEN4* и *SAG12*) кодируют ксилотрансферазу эндотрансглюкозидазу/гидролазу 24 и цистеиновую протеазу соответственно, которые участвуют в деградации макромолекул, и активируются в процессе старения. Для контроля трансфекции использовали люциферазу под контролем промотора 35S (35S-RLUC). Каждую репортерную конструкцию, несущую ген люциферазы под контролем промоторов генов, чувствительных к старению, а также контрольную плазмиду под контролем 35S РНК СаMV промотора трансфицировали индивидуально в протопласты мезофилла модельного растения. Исследование показало, что экспрессия люциферазы под контролем чувствительных к старению промоторов в протопластах мезофилла демонстрирует динамику, аналогичную той, которую ранее наблюдали в исследованиях на интактных листьях. Так, экспрессия *SEN4-LUC* индуцировалась и достигала пика значительно раньше, чем *SAG12-LUC*. При этом уровни экспрессии *SEN4-LUC* и *SAG12-LUC* превышали уровень экспрессии репортера *LUC* без промотора (promoterless-LUC). А пики экспрессии *SEN4-LUC* и *SAG12-LUC* отличались от *35S-LUC*. Полученные результаты исследования убедительно продемонстрировали, что репортерная система на основе люциферазы в протопластах является надежной экспериментальной системой, которую можно эффективно использовать для изучения регуляторной роли генов, связанных со старением у растений [30].

В нашем недавнем исследовании транзientная экспрессия генов использована для изучения функциональной активности и субстратной специфичности гетерологичных десатураз, в том числе и при локализации десатуразы в разных компартментах растительной клетки (цитоплазма, хлоропласт и эндоплазматический ретикулум) на примере $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы (*desC*) *Synechococcus vulcanus* [31]. Локализация $\Delta 9$ -ацил-липидной десатуразы в хлоропластах и эндоплазматическом ретикулеуме обеспечивалась за счет лидерных последовательностей, направляющих белковый продукт целевого гена в соответствующие компартменты растительной клетки, а локализация в цитоплазме моделировалась экспрессией целевого гена без лидерных последовательностей. При транзientной экспрессии гена $\Delta 9$ -десатуразы в листьях *N. benthamiana* и *N. excelsior* наблюдалось достоверное снижение содержания пальмитиновой

кислоты (16:0) и увеличение доли олеиновой (18:1), линолевой (18:2), α -линоленовой (18:3) и пальмитолеиновой (16:3) жирных кислот (ЖК). Более того, было убедительно продемонстрировано, что *N. benthamiana* и *N. excelsior* являются хорошими модельными растениями в исследованиях по оценке функциональной активности и/или субстратной специфичности гетерологичных десатураз — не только $\Delta 9$ -десатуразы, но и десатуразы, которые катализируют превращение ЖК 18:1 в полиненасыщенные ЖК. Отметим, что апробированные в этом исследовании модельные растения *N. benthamiana* и *N. excelsior* характеризуются существенными различиями в композиции жирнокислотного состава, а также соотношением C18/C16 [31].

Методология транзientной экспрессии успешно применена в исследовании функциональности транскрипционных факторов на растении киноа (*Chenopodium quinoa*) [32]. Отметим, что эта культура рассматривается как главная продовольственная культура будущего, поскольку устойчива к большому числу неблагоприятных абиотических факторов. Известно, что фосфор является одним из важнейших элементов минерального питания растений, однако часто содержится в почве в недоступной для растений форме. Одной из реакций на фосфорное голодание (Pi starvation responses — PSR) у растений является повышенная экспрессия генов, индуцированных фосфатным голоданием (PSI). Частным случаем таких генов являются гены-переносчики фосфора (PHT), например, *PHR1* (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1), который представляет собой центральный фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов PSI и соответствующие фенотипические реакции у арабидопсиса. С помощью транзientной экспрессии гена *CqPHR1* в клетках листа киноа (*CqPHR1* клонирован в вектор под контролем 35S РНК СаMV и слит с геном *GFP* в качестве репортерного). Продemonстрировано, что белок *CqPHR1* локализовался в ядрах клеток киноа, а сверхэкспрессия *CqPHR1* способствовала активации экспрессии гена PSI в листьях киноа. Таким образом, авторы доказали, что ортолог *PHR1* у киноа действует как транскрипционный активатор экспрессии гена PSI, и получили дополнительные представления о молекулярной основе адаптации киноа к почвам с ограниченным содержанием фосфора [32].

В качестве простого и быстрого способа оценки вклада белков-кандидатов в повышение устойчивости культурных растений к новым гербицидам авторы предлагают использование транзientной экспрессии соответствующих генов посредством агробактериальной трансформации культурных растений [33]. Для демонстрации данного подхода авторы провели

эксперимент по транзientной экспрессии *OsHIS1* в листьях *N. benthamiana* для последующей оценки способности белка *OsHIS1* обеспечивать толерантность растений к мезотриону (MST) – гербициду, принадлежащему к семейству ингибиторов 4-гидроксибензилпируват-диоксигеназы (HPPD). Кодовый состав гена *OsHIS1* был предварительно модифицирован для экспрессии в двудольном растении. У контрольных растений *N. benthamiana* под действием MST в концентрации от 50 мкМ и выше наблюдалось обесцвечивание апикальных меристем. В свою очередь, листья *N. benthamiana*, подвергшиеся транзientной экспрессии геном *OsHIS1m* характеризовались толерантностью к MST, не проявляя признаков обесцвечивания. С помощью транзientной экспрессии протестированы различные делеционные варианты гена *OsHIS1m*, что позволило выявить последовательность функционального домена и домена, отвечающего за стабильность исследуемого белка. Таким образом, авторы показали, что *OsHIS1* является антагонистом MST, а использование транзientной экспрессии позволяет ускорить оценку новых генов, обеспечивающих толерантность сельскохозяйственных растений к гербицидам [33].

Стратегия транзientной экспрессии использована как эффективный экспериментальный инструмент и в исследованиях функций генов, участвующих в реакции растений на действие биотических факторов среды, а также для раскрытия сложной сети защитных сигнальных путей у разных видов растений, в том числе и тех, для которых получение стабильных трансформантов требует значительного времени. Например, с использованием транзientной экспрессии выполнено детальное исследование одного из белков клеточной стенки винограда – полигалактуроназы. А именно за счет замолкания экспрессии этого гена убедительно продемонстрирована его роль в ограничении атаки патогенов, на примере *Botrytis cinerea*, вызывающего болезнь серой плесени [34]. В исследованиях по замолчанию экспрессии гена β -глюкозидазы при транзientной экспрессии приведены убедительные данные об участии этого гена в устойчивости клубники к *B. cinerea*, которая, вероятно, обусловлена увеличением активности PAL (L-фенилаланин-аммоний-лиаза) и повышением содержания фенольных соединений [35]. Транзientная экспрессия двух генов, кодирующих белки-транспортёры фосфатидилинозитола из сахарного тростника, в листьях *N. benthamiana* усиливала устойчивость этих модельных растений к инфекции патогенных микроорганизмов табака *Ralstonia solanacearum* и *Fusarium solani* var. *coeruleum*. При этом после кратковременной избыточной экспрессии у *N. benthamiana*

было обнаружено накопление H_2O_2 и развитие реакции гиперчувствительности после инокуляции *R. solanacearum* и *F. solani* var. *coeruleum*, а также изменение уровня транскриптов маркерных генов, связанных с развитием иммунитета у растений табака. Таким образом было получено убедительное доказательство, что один из генов сахарного тростника (*ScSEC14p*) тесно связан с иммунитетом растений и развитием реакции сверхчувствительности, а второй ген (*ScSEC14-1*) может быть вовлечен в иной механизм иммунитета растений [36].

Следовательно, применение транзientной экспрессии генов в растениях за счет сверхэкспрессии либо посредством замолкания позволяет выяснить, в какой степени эндогенные уровни целевого белка способствуют их защите, а также прояснить функции эндогенных генов, связанных с патогенезом или защитными механизмами. При этом следует особо подчеркнуть, что при изучении функций генов, участвующих в реакции растений на действие растительных патогенов, и для раскрытия защитных сигнальных путей у растений крайне важно применять корректные контрольные варианты, поскольку сама агроинфильтрация может вызывать защитные реакции хозяина, и, как следствие, препятствовать корректной интерпретации результатов [15]. В качестве адекватных контролей может быть применен подход, основанный на включении в эксперименты растений, инокулированных агробактериями, несущими пустой вектор [37].

Экспериментальная верификация локализации белкового продукта в предсказанных компартаментах. Согласно текущему мнению, функция белка тесно связана с его локализацией внутри клетки. Так, например, внутриклеточная локализация ферментов предоставляет ключевую информацию для понимания сложных метаболических путей. Общая стратегия в исследованиях по оценке локализации целевого белка, как правило, включает: *in silico* анализ аминокислотной последовательности белкового продукта целевого гена для предсказания его локализации; конструирование гибридных генов, в которых целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние с последовательностью репортерного гена (как правило, генов флуоресцентных белков) (рис. 2); определение локализации белкового продукта гибридного гена в одной из описанных выше растительных систем.

В распоряжении исследователей в настоящее время имеются многочисленные ресурсы для *in silico* предсказаний локализации белков. Например, для таких предсказаний могут быть использованы инструменты SignalP, ChloroP, iPSORT, TargetP и MultiLoc [38]. Результаты предсказаний не только дают информацию о потенциальной

локализации белкового продукта, но и зачастую о возможном расположении сигнальных пептидов (в N- или C-концевой области), которые могут опосредовать специфическую локализацию целевого белка. На основе этих предсказаний строится дизайн генных конструкций для экспериментальной верификации локализации белкового продукта в предсказанных компартментах с учетом предсказания о расположении сигнального пептида в белковой последовательности — в N- или C-концевой области [39]. Генные конструкции для экспериментальной верификации несут гибридный ген, в котором целевой ген имеет транскрипционно-трансляционное слияние, как правило, с последовательностью гена флуоресцентного белка под контролем сильного конститутивного промотора. Следует отметить, что выбор флуоресцентного белка для оценки локализации целевого генного продукта диктуется предсказанной локализацией в растительной клетке. Так, зеленый флуоресцентный белок показал себя эффективным маркером во многих исследованиях по экспериментальной верификации локализации целевого белка в ядре [40], цитоплазме [36], плазматической мембране [41], комплексе Гольджи [38], эндоплазматическом ретикулуме [42], тонопласте [43], митохондриях [44] и хлоропластах [42] тогда как желтый флуоресцентный белок (YFP) и mCherry, как продемонстрировано в недавнем сравнительном исследовании, наиболее подходят для оценки локализации в пероксисомах [45].

Следует отметить, что для надежной идентификации локализации белковых продуктов в растительных клетках и нивелирования ложных результатов крайне важны контрольные эксперименты. Эти контрольные эксперименты, как правило, должны включать: (i) положительный контроль, заключающийся в совместной локализации целевой последовательности со специфическими маркерами компартментов растительной клетки; (ii) отрицательный контроль — генную конструкцию, несущую только ген репортерного флуоресцентного белка под контролем того же промотора. Согласно экспериментальным данным, в качестве специфических маркеров для разных компартментов растительной клетки могут быть использованы белки, локализация которых в соответствующем компартменте подтверждена надежными методами: например, такими как гистохимический и иммуногистохимический анализ. В настоящее время такие маркеры известны и апробированы для локализации в разных компартментах: эндоплазматическом ретикулуме [38], пероксисомах [40], хлоропластах (используется автофлуоресценция хлоропластов) [38]. Следует отметить, что наиболее эффективным для этих целей может быть подход, основанный на коинфильтра-

ции суспензиями *Agrobacterium*, содержащими различные конструкции, в которых целевая последовательность и последовательности маркеров органелл слиты с различными флуоресцентными белками. Такой подход позволяет анализировать локализацию нескольких по-разному меченных флуоресцентных белков в одних и тех же клетках [38]. На наш взгляд, в качестве специфических маркеров для разных компартментов растительной клетки можно предложить и использование конструкций, в которых репортерные гены флуоресцентных белков слиты с известными лидерными последовательностями, обеспечивающими специфическую локализацию: например, лидерный сигнал гена малой субъединицы РБФК/О (для локализации в хлоропласты); лидерный сигнал гена легумина типа В4 гороха (*Vicia faba*) совместно с последовательностью SKDREL в 3'-концевой области репортерного гена, кодирующего аминокислоты C-концевой области белка (для локализации в эндоплазматическом ретикулуме) [42].

Существуют многочисленные примеры, подтверждающие, что транзистентная экспрессия флуоресцентно меченных белков является простым и универсальным способом изучения внутриклеточной локализации интересующих белков. С помощью этого подхода получены достоверные результаты о локализации в ядрах различных ТФ [40, 46] новой локализации белков в компартментах растительной клетки, например, для оксидаз с различной субстратной специфичностью [47], трансфераз [39] и многих других белков. На основании этих данных предложено вовлечение множества органелл и транспорт метаболитов между клеточными компартментами для ряда путей. Таким образом, подходы транзистентной экспрессии оказались весьма эффективными для оценки локализации генных продуктов в растительной клетке.

Прояснение механизмов регуляции сложных метаболических путей. Согласно многочисленным экспериментальным данным, транзистентная экспрессия генов в растениях оказалась крайне эффективной и для выяснения механизмов регуляции сложных метаболических путей, прежде всего вторичных метаболитов, которые имеют потенциал как ценные продукты в различных отраслях. А именно, с использованием транзистентной экспрессии выяснена роль ключевых участников метаболических путей и продемонстрирована возможность их изменения с целью направленного увеличения продукции нужного вторичного метаболита. Например, используя транзистентную экспрессию продемонстрировано, что ключевыми регуляторами флавоноидного пути являются специфические ТФ MYB и идентифицированы их гены-мишени в метаболических путях основных производных

флавоноидов: флавонолов, антоцианов и проантоцианидинов у винограда [48]. Так, экспериментальное подтверждение, что ТФ MYBA1 и MYBA2 специфически регулируют UDP-глюкозо-флавоноид-3-*O*-глюкозилтрансферазу (UFGT) в биосинтезе антоцианинов, а MYBPA1 участвует в регуляции биосинтеза проантоцианидинов, но не антоцианина, в то время как MYB5a и MYB5b активируют промоторы генов центрального пути, участвующих в биосинтезе флавоноидов [49]. Кроме того, было показано, что индуцируемый светом ТФ MYBF1 специфически активирует экспрессию гена, кодирующего флавонолсинтазу, а также генов, участвующих в синтезе халконов и флаванонов перед дигидрофлавонолами и другими флавоноидами [50]. В недавнем исследовании идентифицирован новый ТФ MYR R2R3 из китайского нарцисса (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis* Roem), с потенциалом подавления пути биосинтеза антоцианина, флавонола и проантоцианидина, который действует как репрессор экспрессии транскриптов ключевых генов ферментов, участвующих в биосинтезе флавоноидов [49]. Результаты этого исследования могут дать направление для улучшения цвета и структуры цветов у этого вида растений. С использованием транзientной экспрессии и замолкания в плодах груши и молодых листьях подтверждена биологическая функция ТФ MYB12b из плодов груши. Так, продемонстрировано, что его сверхэкспрессия положительно регулирует биосинтез флавонола, включая четыре основных кверцетиновых гликозида и два основных изорхаметиновых гликозида, путем позитивной регуляции общего гена биосинтеза флавоноидов (хальконсинтетазы) и гена биосинтеза флавонола (обозначенного как PbFLS) [51]. Временная экспрессия двух изоформ сплайсинга специфического ТФ WRINKLED1 (WRI1), который является членом класса ТФ AP2/EREBP плодов груши, в листьях *N. benthamiana* усиливала экспрессию генов-мишеней, таких как *PKp-b1*, *ACP1* и *KAS1*, и, как следствие, увеличивала содержание масла в 4.3–4.9 раза по сравнению с контролем. Таким образом, продемонстрирована роль этого ТФ как ключевого регулятора транскрипции генов, вовлеченных в биосинтез ЖК и масел в листовой биомассе, и, как следствие, его применение для создания растений с большой биомассой для увеличения промышленного производства растительных масел [52]. В недавнем исследовании транзientная экспрессия генов в растениях была применена для оценки полезности гибких линкерных последовательностей различного размера при конструировании слитых ферментов — 3,3-β-каротин-гидроксилазы (CRTZ) и 4,4-β-каротиноксигеназы, которые вовлечены в биосинтез ценного кетокаротиноида астаксан-

тина, природного красного красителя с мощной антиоксидантной активностью. Транзientная экспрессия гибридных генов в *N. benthamiana* позволила установить, что оба гена, слитые вместе и временно экспрессируемые, показали сходные уровни накопления астаксантина по сравнению с временной экспрессией отдельных ферментов. При этом размер линкеров, по-видимому, не влиял на активность ферментов. Полученные результаты говорят в пользу потенциала рассмотренного подхода к производству ценных продуктов растительного происхождения [53].

С использованием транзientной экспрессии проводились исследования по функциональному анализу генов CYP (цитохромов P450s), вовлеченных в биосинтез плюмбагина (5-гидрокси-2-метил-1,4-нафтахинон) из *P. zeylanica* — лекарственного растения из семейства *Plumbaginaceae*, использующегося в нетрадиционной медицине как противовоспалительное средство [54]. Уточнение функций белков-кандидатов на роль CYP проводили с использованием транзientной down-регуляции посредством искусственной microRNA, а также с помощью транзientной экспрессии в растениях *P. zeylanica*. Данные индивидуального и совместного молчания белков-кандидатов на роль CYP показали, что оба потенциальных CYP дополняют функции друг друга, и, следовательно, оба гена CYP необходимы для биосинтеза плюмбагина. Анализ временной сверхэкспрессии обоих CYP подтвердил их роль в биосинтезе плюмбагина, поскольку наблюдалось значительное повышение содержания этого вещества в листьях *P. zeylanica*. Таким образом, исследование позволило прояснить вклад каждого гена в синтез важного метаболита [54].

Изучение белок-белковых взаимодействий (ББВ) in vivo и их субклеточной локализации. В биологических системах белки представляют собой класс строго регулируемых биомолекул, которые редко работают независимо. Чтобы выполнять важные функции в клетке в различных биологических системах, белки часто организовано взаимодействуют друг с другом. Характеристика ББВ с помощью высокопроизводительных биологических и вычислительных методов, таких как, анализ взаимодействия белков *in silico*, скрининг дрожжевых двухгибридных библиотек и скрининг библиотек фагового дисплея, может дать глобальное представление о белковом интерактоме организма. Однако все эти методы требуют независимой проверки из-за ограничений, связанных с тем, что эти системы не могут имитировать нативную среду. ББВ также во многом зависит от физических свойств, модификации и состояния белков, поэтому важно обосновывать ББВ в нативных или близких к нативным условиях.

Транзиентная экспрессия оказалась весьма эффективным подходом и для изучения ББВ *in vivo* и их субклеточной локализации. Для этих целей в большинстве исследований применяют метод бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC) [55–57]. BiFC – подход, который позволяет качественно и количественно оценить и локализовать ББВ в живых клетках. Этот подход основан на оценке взаимодействия двух целевых белков, каждый из которых имеет транскрипционно-трансляционное слияние с одним из доменов флуоресцентного белка за счет совместного сворачивания флуоресцентного белка в структуру β -бочонка в случае ББВ целевых белков, что приводит к восстановлению флуорофора, т.е. основан на необратимой самосборке двух фрагментов флуоресцентного белка (рис. 3). Такое ББВ визуализируется с использованием обычной флуоресцентной или конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Хотя при использовании BiFC система расщепления GFP проявила себя в целом эффективным репортером, первоначально был отмечен ряд подводных камней или ограничений при его использовании: (i) плохое обнаружение в реальном времени из-за медленного и необратимого образования восстановленного флуоресцентного хромофора; (ii) неспецифические взаимодействия за счет высокого уровня экспрессии расщепленных флуоресцентных фрагментов, которые приводили к спонтанной самосборке и накоплению фоновых сигналов; (iii) нерастворимость или агрегация больших расщепленных флуоресцентных фрагментов, которые препятствуют ББВ [55]. Недавнее усовершенствование этого подхода, заключающегося в использовании трехсторонней сборки расщепленного GFP (вариант sfGFP – GFP с супер-fold) в растительных клетках в сочетании с использованием кассеты экспрессии, индуцируемой β -эстрадиолом, позволило преодолеть такие ограничения (рис. 3). А именно, кассета экспрессии, индуцируемая β -эстрадиолом, позволяет контролировать индукцию слитых белков, и это решает проблему клеточной токсичности, вызванной конститутивной сверхэкспрессией слитых белков; влияние стерических помех на ББВ в трехсторонней системе с расщепленным GFP сводится к минимуму за счет малого размера расщепленных фрагментов GFP, слитых с целевыми белками. Принцип трехсторонней системы расщепленного GFP состоит в следующем: каждый из двух фрагментов GFP, а именно, β -strand 10 (обозначенная авторами как S10, 20 amino acids) и β -strand 11 (обозначенная авторами как S11, 19 amino acids) используют для транскрипционно-трансляционного слияния с исследуемыми белками партнерами, а дополнительный фрагмент, обозначенный как

GFP1–9 (196 amino acids) экспрессируют отдельной кассетой (рис. 3) [55]. Как только происходит ББВ, фрагменты S10 и S11 привязываются к ассоциации с GFP1–9, что приводит к восстановлению полноразмерного GFP, который флуоресцирует (рис. 3) [55]. Получено экспериментальное подтверждение эффективности этого подхода в качестве потенциального эффективного инструмента для оценки взаимодействия мембранных белков у растений.

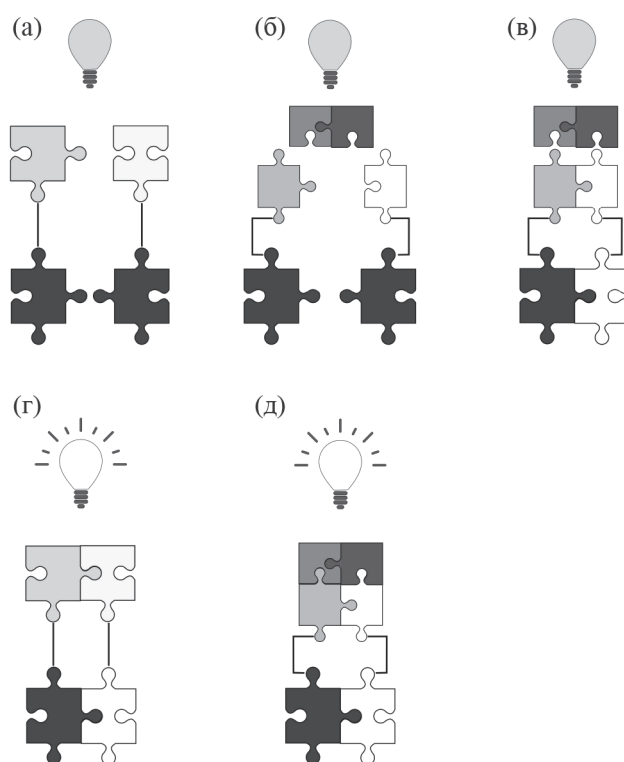


Рис. 3. Схема белок-белковых взаимодействий с использованием бимолекулярного флуоресцентного анализа комплементации (BiFC) и трехсторонней системы комплементации: (а, б) – система BiFC включает два взаимодействующих белка, каждый из которых имеет транскрипционно-трансляционное слияние с одним из белковых доменов флуоресцентного белка (а), за счет совместного сворачивания флуоресцентного белка в структуру β -бочонка в случае взаимодействия целевых белков, что приводит к восстановлению флуорофора (г). (б, в, д) – трехсторонняя система комплементации включает два фрагмента GFP, каждый из которых имеет транскрипционно-трансляционное слияние с одним из исследуемых белком-партнером, и дополнительную систему с дополнительными фрагментами GFP (б), при белок-белковом взаимодействии (в) дополнительные фрагменты GFP взаимодействуют с фрагментами GFP, которые слиты с белками-партнерами, что приводит к восстановлению полноразмерного GFP, который флуоресцирует (д). Принцип использования систем более подробно описан в тексте.

С использованием транзientной экспрессии также проводили исследования по функциональному анализу белка MORC1, который представляет собой консервативную АТФазу GHKL-типа, играющую важную роль в иммунитете растений и эпигенетике. Для того, чтобы охарактеризовать ББВ, ассоциированные с этим важным белком иммунитета, авторы идентифицировали 14 взаимодействующих с MORC1 белков с помощью двугибридного анализа дрожжей (Y2H-скрининга), используя MORC1 в качестве приманки [58]. Было обнаружено, что одним из взаимодействующих с MORC1 белков является белок поддержания структуры хромосомы 1 (SMC1), относящийся к группе белков SMCs, необходимых для удержания сестринских хроматид вместе во время митоза и мейоза. Используя целевой Y2H-анализ, авторы проверили, взаимодействуют ли SMC1 и его гомологи – SMC2 и DMS3 – физически с MORC1. В то время как все полноразмерные SMCs показали незначительное взаимодействие с MORC1, делеционный вариант SMC1 (838–1123 а.к.), показал существенное взаимодействие. Это наблюдение дает повод предполагать, что эти полноразмерные SMCs имеют домен, ингибирующий физическое взаимодействие с MORC1. Для того, чтобы идентифицировать домен SMC1, взаимодействующий с MORC1, и удалить предполагаемый ингибирующий домен, авторы создали конструкции для делеционных мутантов. Эти конструкции продуцировали SMC1-усеченные белки в растениях за счет агроинфильтрации *N. benthamiana*. В результате авторы отмечают, что SMC1-2, который содержит шарнирный домен, продемонстрировал взаимодействие с MORC1. Важно отметить, что в качестве отрицательного контроля использовали зеленый флуоресцентный белок (GFP). Таким образом, авторы идентифицировали взаимодействующий домен и обоснованно предположили, что SMC1 может иметь домен, препятствующий взаимодействию MORC1 [58].

Геномное редактирование. В последние годы возрос интерес исследователей к использованию технологии геномного редактирования растений в прикладных и фундаментальных исследованиях. Для решения критически важных проблем этой технологии, включая методические проблемы и проблемы безопасности, исследователи вполне успешно применяют технологию транзientной экспрессии генов в растениях. В настоящее время несколько модификаций метода транзientной экспрессии разработано, апробировано и доказана их эффективность [6]. Одно из усовершенствований редактирования генома CRISPR/Cas9 – Transiently Expressed CRISPR/Cas DNA (TECCDNA) – простой и эффективный подход к редактированию генома, при ко-

тором мутантные растения регенерируются после временной экспрессии ДНК CRISPR/Cas9 [59]. ДНК CRISPR/Cas9 (плазмидные конструкции) или РНК (транскрипты, синтезированные *in vitro*) могут быть доставлены с помощью биобаллистической техники. При использовании этого подхода удалось избежать длительных и трудоемких этапов отбора трансформантов и получить доказательство, что чужеродная ДНК не интегрируется в геном. Таким образом, подход TECCDNA позволяет исключить добавление гербицидов или антибиотиков в среду, предназначенную для отбора трансформированных растений.

Продemonстрировано, что замолкание цитоплазматической РНК может происходить во время транзientной экспрессии при агроинфильтрации [59, 60]. Недавно исследователи [61] определили эффекты химических добавок и предварительной обработки тепловым шоком для улучшения трансформации за счет агроинфильтрации у *N. tabacum*. Конструкция, состоящая из системы репликации геминивируса и двойного терминатора, включающего терминатор белка теплового шока в сочетании с терминатором экстенсина, также может увеличивать временную экспрессию белка в процессе агроинфильтрации [62]. Так, предварительная гиперосмотическая обработка сахарозой в течение 3 ч перед агроинфильтрацией значительно улучшила эффективность транзientной экспрессии [63].

Изучение регуляции путей биосинтеза каротиноидов привлекает многих исследователей. В качестве целевого гена часто выбирают ген *PDS*, необходимый для биосинтеза каротиноидов. Li с соавт. [64] использовали агроинфильтрацию для целевых модификаций генома *A. thaliana* (область модификации AtPDS3) и *N. benthamiana* (область модификации NbPDS). С помощью транзientной экспрессии соответствующих конструкций продемонстрировано, что нарушение *PDS* усиливало окисление хлорофилла, что приводило к развитию видимого фотообесцвеченного фенотипа [64, 65].

Редактирование генома растений поколения T0 без трансгенов весьма желательно, но сложно, особенно в отношении многолетних и вегетативно размножаемых растений. В своем недавнем исследовании [66] использовали стратегию совместного редактирования для создания растений без трансгенов посредством *Agrobacterium*-опосредованной временной экспрессии редактора цитозиновых оснований (CBE)/гРНК-Cas12a/crRNA-GFP. В частности, CBE/гРНК использовали для редактирования гена *ALS* для придания устойчивости к гербициду хлорсульфурону в качестве маркера селекции, который не оказывает негативного воздействия

на фенотипы растений; Cas12a/crRNA использовали для редактирования представляющих интерес генов; GFP использовали для отбора трансгенных растений. Используя этот подход, были получены нетрансгенные растения с отредактированным геномом для различных генов (индивидуальных или множественных) в томатах, табаке, картофеле и цитрусовых в поколении T₀. Частота двуаллельных/гомозиготных нетрансгенных мутаций целевых генов среди устойчивых к гербицидам трансформантов колебалась от 8 до 50%. Полногеномное секвенирование дополнительно подтвердило отсутствие трансгенов и нецелевых мутаций в отредактированных растениях. Таким образом, убедительно продемонстрировано, что стратегия совместного редактирования эффективна для создания нетрансгенных растений с отредактированным геномом в поколении T₀, что является мощным инструментом для генетического улучшения растений [66].

Таким образом, транзистентная трансформация на основе *Agrobacterium* является безопасным, высокоуровневым и быстрым методом временной экспрессии гетерологичных генов в растительных системах [6] и широко используется как эффективный экспериментальный инструмент функциональной геномики для решения ее ключевых задач (рис. 4). Тем не менее

продолжаются исследования, направленные на увеличение эффективности методов транзистентной экспрессии, в частности, агроинфильтрации. Так, критическим шагом в успешном и эффективном использовании транзистентной экспрессии, и, в частности, агроинфильтрации, является обеспечение высокого уровня экспрессии целевой последовательности (как целевого гена, так и конструкции для замолкания). Согласно имеющемуся мнению, низкий уровень кратковременной экспрессии гетерологичных генов часто является результатом пост-транскрипционного замолкания генов (PTGS). PTGS часто происходит в растениях и является естественным защитным механизмом против вирусов и патогенов. Это узкое место можно преодолеть путем коэкспрессии супрессоров PTGS [67]. Многие вирусы растений кодируют генные продукты, которые способны подавлять PTGS, однако их способ действия и активность могут варьироваться в зависимости от семейства вирусов. Мощным подавителем замолкания генов считается белок p19, кодируемый геном вируса томата *Cymbidium ringspot* (*CymRSV*), который повышает уровни транзистентной экспрессии у различных видов растений путем секвестрации siRNA и предотвращения их ассоциации с комплексом RISC [61, 62].

Другое направление исследований направлено на усовершенствование технологии вакуумной инфильтрации. Например, авторами модифицирована процедура вакуумной инфильтрации листовых дисков, которая включает в себя вытягивание поршня шприца для создания небольшого вакуума [68]. Исследователями был разработан специальный метод агроинфильтрации для достижения высокого уровня экспрессии переносимых генов в течение 5 дней. Этот метод включает инъекцию интересующего гена в границы раздела между адаксиальным эпидермисом и мезофиллом с помощью пластикового шприца с иглой. Это приводит к образованию пузырька агроинфильтрации (площадью примерно 1 см²) с высоким содержанием агробактерий, несущих интересующий ген, который инфильтрируется в клетки эпидермиса. Предложен новый метод агроинфильтрации на основе распыления – это технология, которая применима без использования вакуумной камеры [69]. Метод инфильтрации на основе отдельных листьев также разработан для решения проблемы некроза, фотообесцвечивания, потемнения и гибели клеток в результате старения в интактных листьях [70].

Эффективность транзистентной экспрессии зависит не только от компонентов экспрессионной кассеты, но и от дополнительных условий: используемого штамма агробактерий и плотности его культуры для агроинфильтрации; химических добавок в жидкой среде

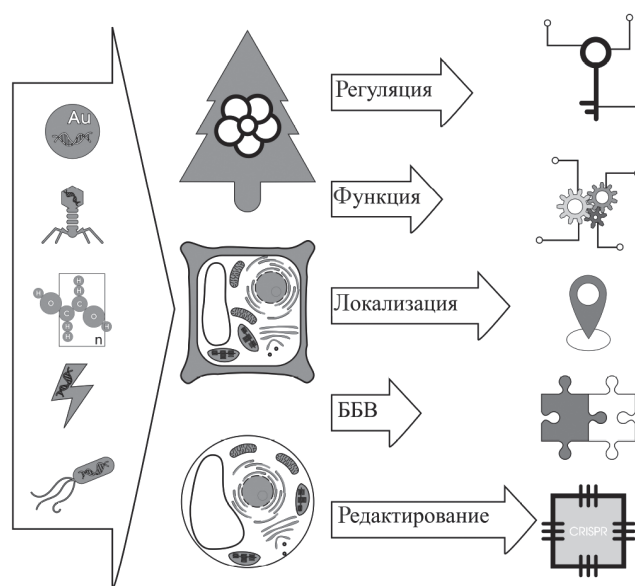


Рис. 4. Основные направления исследований с использованием транзистентной экспрессии генов в растениях. Доставка генных конструкций в растительные системы с использованием разных методических подходов расширяет экспериментальные возможности исследователей в области функциональной геномики растений. ББВ – белок-белковое взаимодействие.

для агроинфильтрации; вида и возраста растения, условий выращивания (в том числе и после агроинфильтрации) [14, 61]. Следует отметить, что, хотя оценка факторов и условий, обеспечивающих более эффективную транзientную экспрессию, в основном, основана на методах проб и ошибок, теоретическое обоснование для некоторых из них представлено.

В недавнем исследовании сравнили три распространенных лабораторных штамма на эффективность транзientной экспрессии репортерного гена у *N. benthamiana*. Эти штаммы представляли три из четырех типов использования опина: октопин (LBA4404), нопалин (C58C1) и сукцинамопин (AGL1) и члены, происходящие из изолятов-предшественников дикого типа C58 (AGL1 и C58C1) и Ach5 (LBA4404). Из протестированных штаммов *Agrobacterium* гипервирулентный штамм AGL1 показал наивысшую эффективность при транзientной экспрессии. Это позволяет предположить, что AGL1 обладает более агрессивной предрасположенностью к инфекции, или, возможно, более эффективным механизмом переноса Т-ДНК, кодируемым бактериями, по сравнению с двумя другими штаммами [61]. Схожие исследования проведены и для других видов растений [14, 71].

Усилить эффективность трансфекции можно за счет подбора плотности культуры агробактерий и химических добавок в жидкой среде для агроинфильтрации. Например, для *N. benthamiana* показано, что слишком разбавленная культура может привести к низкому соотношению бактерий к клеткам-мишеням, и это может вызвать снижение частоты трансформации, тогда как концентрированные бактериальные культуры могут способствовать усиленному росту бактерий и вызвать чрезмерное повреждение тканей [61]. На тех же модельных растениях убедительно продемонстрировано, что ацетосирингон, антиоксидант липоевая кислота и поверхностно-активное вещество Плурионик F-68 значительно повышают эффективность транзientной экспрессии целевого гена. Хотя неясно, как именно функционируют эти соединения, предполагается, что они снижают поверхностное натяжение среды для совместного культивирования и, возможно, устраняют определенные вещества, которые ингибируют прикрепление клеток, чтобы улучшить бактериальную инвазию и, в конечном итоге, доставку Т-ДНК [61].

Согласно имеющимся экспериментальным данным, возраст растений или их органов, например, листьев, может в значительной степени оказывать влияние на эффективность транзientной экспрессии. В настоящее время убедительно продемонстрировано, что в экспериментах для транзientной экспрессии лучше использовать листья более молодого возраста, но, поскольку

они, как правило, очень маленькие, выбирают второй, третий и четвертый лист сверху. Дополнительно рекомендуется не использовать для транзientной экспрессии листья растений, которые цветут. Такие рекомендации основаны на снижении транскрипции и трансляции клетки-хозяина в листьях более старого возраста и при цветении растений, что и ставит под угрозу эффективность экспрессии целевого гена [71].

В недавнем исследовании показано, что применение теплового шока всего растения (*N. benthamiana*) через 1-2 дня после агроинфильтрации приводило к значительному (в четыре-пять раз) увеличению эффективности экспрессии репортерного гена [71]. Причиной такого положительно влияния этого фактора может быть активация экспрессии белков теплового шока и шаперонов, поскольку хорошо известно, что такие белки активируются в растительных клетках в ответ на экстремальные температуры и другие абиотические стрессы для поддержания клеточного гомеостаза [71] и способствуют правильному конформационному сворачиванию нативных белков, связываясь с реакционноспособными поверхностями частично свернутых белков и эффективно изолируя их активные сайты. Это ограничивает взаимодействие между частично свернутыми интермедиатами, предотвращает агрегацию и деградацию окончательно неправильно свернутых белков, эффективно защищая их от окислительного стресса [61].

Несмотря на определенные успехи в обеспечении эффективной транзientной экспрессии целевых последовательностей в растениях, включая подбор супрессоров сайленсинга вирусных генов, агробактериальных штаммов, условий агроинфильтрации и роста растений, следует отметить, что транзientная сверхэкспрессия целевого гена может просто исчерпать возможности механизма транскрипции и трансляции клеток-хозяев, тем самым подвергая риску общую эффективность экспрессии. Следовательно, дальнейшие исследования, направленные на разработку дополнительных молекулярных инструментов, способных преодолеть негативные последствия временной экспрессии, имеют первостепенное значение для технического прогресса и будут способствовать более широкому использованию этого метода исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 122042700043-9).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Viacheslavova A.O., Berdichevets I.N., Tiurin A.A., Shimshilashvili K.R., Mustafayev O., Goldenkova-Pavlova I. V. Expression of heterologous genes in plant systems: new possibilities. // *Genetika*. 2012. V. 48. P. 1245. <https://doi.org/10.1134/S1022795412110130>
2. Hwang H.-H., Yu M., Lai E.-M. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications // *Arabidopsis Book*. 2017. V. 15. P. e0186. <https://doi.org/10.1199/tab.0186>
3. Wu H.Y., Liu K.H., Wang Y.C., Wu J.F., Chiu W.L., Chen C.Y., Wu S.H., Sheen J., Lai E.M. AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings // *Plant Methods*. 2014. V. 10. P. 1. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-19/FIGURES/10>
4. Tsuda K., Qi Y., Nguyen L. V., Bethke G., Tsuda Y., Glazebrook J., Katagiri F. An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Arabidopsis* // *Plant J*. 2012. V. 69. P. 713. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2011.04819.X>
5. Jones H.D., Doherty A., Sparks C.A. Transient transformation of plants // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 513. P. 131. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-427-8_8
6. Kaur M., Manchanda P., Kalia A., Ahmed F.K., Nepovimova E., Kuca K., Abd-Elsalam K.A. Agrobacterium-mediated scalable transient gene expression in genome edited crop plants // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 10882. <https://doi.org/10.3390/IJMS221910882>
7. Zagorskaya A.A., Deineko E. V. Suspension-cultured plant cells as a platform for obtaining recombinant proteins // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 795. <https://doi.org/10.1134/S102144371705017X/METRICS>
8. Rivero L., Scholl R., Holomuzki N., Crist D., Grotewold E., Brkljacic J. Handling *Arabidopsis* plants: growth, preservation of seeds, transformation, and genetic crosses // *Methods Mol. Biol.* 2014. V. 1062. P. 3. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-580-4_1
9. Gleba Y., Klimyuk V., Marillonnet S. Magniffection – a new platform for expressing recombinant vaccines in plants // *Vaccine*. 2005. V. 23. P. 2042. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2005.01.006>
10. Heenatigala P.P.M., Yang J., Bishopp A., Sun Z., Li G., Kumar S., Hu S., Wu Z., Lin W., Yao L., Duan P., Hou H. Development of efficient protocols for stable and transient gene transformation for *Wolffia globosa* using *Agrobacterium* // *Front. Chem.* 2018. V. 6. P. 356676. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00227/BIBTEX>
11. Kreněk P., Samajová O., Luptovciak I., Doskocilová A., Komis G., Samaj J. Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: principles, methods and applications // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. P. 1024. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.03.012>
12. Zhang Y., Chen M., Siemiatkowska B., Toleco M.R., Jing Y., Strotmann V., Zhang J., Stahl Y., Fernie A.R. A highly efficient agrobacterium-mediated method for transient gene expression and functional studies in multiple plant species // *Plant Commun.* 2020. V. 1. P. 100028. <https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2020.100028>
13. Chen Q., Lai H. Gene delivery into plant cells for recombinant protein production // *Biomed Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 32161. <https://doi.org/10.1155/2015/932161>
14. Jelly N.S., Valat L., Walter B., Maillot P. Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 1231. <https://doi.org/10.1111/PBI.12294>
15. Guidarelli M., Baraldi E. Transient transformation meets gene function discovery: the strawberry fruit case // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 139872. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00444/BIBTEX>
16. Cao J., Yao D., Lin F., Jiang M. PEG-mediated transient gene expression and silencing system in maize mesophyll protoplasts: a valuable tool for signal transduction study in maize // *Acta Physiol. Plant.* 2014. V. 36. P. 1271. <https://doi.org/10.1007/S11738-014-1508-X/FIGURES/6>
17. Tan B., Xu M., Chen Y., Huang M. Transient expression for functional gene analysis using *Populus* protoplasts // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2013. V. 114. P. 11. <https://doi.org/10.1007/S11240-013-0299-X/FIGURES/4>
18. Burris K.P., Dlugosz E.M., Collins A.G., Stewart C.N., Lenaghan S.C. Development of a rapid, low-cost protoplast transfection system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 693. <https://doi.org/10.1007/S00299-015-1913-7>
19. Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // *Nature*. 1987. V. 327. P. 70. <https://doi.org/10.1038/327070a0>
20. Schmidt M.A., Herman E.M. Characterization and functional biology of the soybean aleurone layer // *BMC Plant Biol.* 2018. V. 18. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S12870-018-1579-8/FIGURES/4>
21. Fischer R., Emans N. Molecular farming of pharmaceutical proteins // *Transgenic Res.* 2000. V. 9. P. 279. <https://doi.org/10.1023/A:1008975123362>
22. Donini M., Marusic C. Current state-of-the-art in plant-based antibody production systems // *Biotechnol. Lett.* 2019. V. 41. P. 335. <https://doi.org/10.1007/S10529-019-02651-Z>
23. Wang H., Wang W., Zhan J., Huang W., Xu H. An efficient PEG-mediated transient gene expression system in grape protoplasts and its application in subcellular localization studies of flavonoids biosynthesis enzymes // *Sci. Hortic.* 2015. V. 191. P. 82. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2015.04.039>

24. Vaghchhipawala Z., Rojas C.M., Senthil-Kumar M., Mysore K.S. Agroinoculation and agroinfiltration: simple tools for complex gene function analyses // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 678. P. 65.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-682-5_6
25. Wang Y.C., Yu M., Shih P.Y., Wu H.Y., Lai E.M. Stable pH suppresses defense signaling and is the key to enhance *Agrobacterium*-mediated transient expression in *Arabidopsis* seedlings // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 1.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34949-9>
26. Shoukat S., Amir Zia M., Ali S. Functional characterization of a novel synthetic herbicide resistance gene in a model plant // *Sains Malays.* 2023. V. 52. P. 1133.
<https://doi.org/10.17576/jsm-2023-5204-08>
27. Tyurin A.A., Mustafaev O., Suhorukova A. V., Pavlenko O.S., Fridman V.A., Demyanchuk I.S., Goldenkova-Pavlova I. V. Modulation of the translation efficiency of heterologous mRNA and target protein stability in a plant system: the case study of interferon- α A // *Plants.* 2022. V. 11. P. 2450.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS11192450/S1>
28. Hidvégi N., Gulyás A., Teixeira da Silva J.A., Wicaksono A., Kiss E. Promoter analysis of the SPATULA (FvSPT) and SPIRAL (FvSPR) genes in the woodland diploid strawberry (*Fragaria vesca* L.) // *Biol. Futur.* 2021. V. 72. P. 373.
<https://doi.org/10.1007/S42977-021-00089-X>
29. Sheshukova E.V., Ershova N.M., Lipskerov F.A., Komarova T.V. Enhanced synthesis of foreign nuclear protein stimulates viral reproduction via the induction of γ -thionin expression // *Plants.* 2022. V. 11. P. 11121530.
<https://doi.org/10.3390/PLANTS11121530>
30. Doan P.P.T., Kim J.H., Kim J. Rapid investigation of functional roles of genes in regulation of leaf senescence using *Arabidopsis* protoplasts // *Front. Plant Sci.* 2022. V. 13. P. 818239.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.818239/BIBTEX>
31. Berestovoy M., Pavlenko O.S., Tyurin A.A., Gorshkova E.N., Goldenkova-Pavlova I.V. Altered fatty acid composition of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana glauca* leaves under transient overexpression of the cyanobacterial *desC* gene // *Biol. Plant.* 2020. V. 64. P. 167.
<https://doi.org/10.32615/bp.2019.144>
32. Xiao X., Meng F., Satheesh V., Xi Y., Lei M. An *Agrobacterium*-mediated transient expression method contributes to functional analysis of a transcription factor and potential application of gene editing in *Chenopodium quinoa* // *Plant Cell Rep.* 2022. V. 41. P. 1975.
<https://doi.org/10.1007/S00299-022-02902-W>
33. Yao X., Qu F., Lewis M.L., Xia I.Y. Assessing herbicide tolerance potential of the rice HIS1 protein in *Nicotiana benthamiana* and soybean // MS thesis. Ohio State. 2021.
34. Bertazzon N., Raiola A., Castiglioni C., Gardiman M., Angelini E., Borgo M., Ferrari S. Transient silencing of the grapevine gene VvPGIP1 by agroinfiltration with a construct for RNA interference // *Plant Cell Rep.* 2012. V. 31. P. 133.
<https://doi.org/10.1007/S00299-011-1147-2>
35. Li Q., Ji K., Sun Y., Luo H., Wang H., Leng P. The role of FaBG3 in fruit ripening and *B. cinerea* fungal infection of strawberry // *Plant J.* 2013. V. 76. P. 24.
<https://doi.org/10.1111/TPJ.12272>
36. Hua-Ying M., Wen-Ju W., Wei-Hua S., Ya-Chun S., Feng L., Cong-Na L., Ling W., Xu Z., Li-Ping X., You-Xiong Q. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analysis of Sec14-like PITP gene family in sugarcane // *Plant Cell Rep.* 2019. V. 38. P. 637.
<https://doi.org/10.1007/S00299-019-02394-1>
37. Olmedo P., Moreno A.A., Sanhueza D., Balic I., Silva-Sanzana C., Zepeda B., Verdonk J.C., Arriagada C., Meneses C., Campos-Vargas R. A catechol oxidase AcPPO from cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) is localized to the Golgi apparatus // *Plant Sci.* 2018. V. 266. P. 46.
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2017.10.012>
38. Zhang X.S., Ni R., Wang P.Y., Zhu T.T., Sun C.J., Lou H.X., Cheng A.X. Isolation and functional characterization of two Caffeoyle Coenzyme A 3-O-methyltransferases from the fern species *Polypodiodes amoena* // *Plant Physiol. Biochem.* 2019. V. 136. P. 169.
<https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2019.01.021>
39. Sun X., Yu G., Li J., Liu J., Wang X., Zhu G., Zhang X., Pan H. AcERF2, an ethylene-responsive factor of *Atriplex canescens*, positively modulates osmotic and disease resistance in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Sci.* 2018. V. 274. P. 32.
<https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.05.004>
40. Hou Y., Lu Q., Su J., Jin X., Jia C., An L., Tian Y., Song Y. Genome-wide analysis of the HDAC gene family and its functional characterization at low temperatures in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 7622.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23147622>
41. Tyurin A.A., Kabardaeva K.V., Berestovoy M.A., Sidorchuk Y.V., Fomenkov A.A., Nosov A.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Simple and reliable system for transient gene expression for the characteristic signal sequences and the estimation of the localization of target protein in plant cell // *Russ. J. Plant Physiol.* 2017. V. 64. P. 672.
<https://doi.org/10.1134/S1021443717040173/METRICS>
42. Cheng J., Wen S., Xiao S., Lu B., Ma M., Bie Z. Overexpression of the tonoplast sugar transporter CmTST2 in melon fruit increases sugar accumulation // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 511.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERX440>
43. Wang B., Wang G., Shen F., Zhu S. A glycine-rich RNA-binding protein, CsGR-RBP3, is involved in defense responses against cold stress in harvested cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 362717.
<https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00540/BIBTEX>
44. Wu B., Cao X., Liu H., Zhu C., Klee H., Zhang B., Chen K. UDP-glucosyltransferase PpUGT85A2 controls volatile glycosylation in peach // *J. Exp. Bot.* 2019. V. 70. P. 925.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERY419>

45. *Sasaki N., Takashima E., Nyunoya H.* Altered subcellular localization of a tobacco membrane raft-associated remorin protein by tobamovirus infection and transient expression of viral replication and movement proteins // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 302384. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00619>
46. *Shoji T.* Analysis of the intracellular localization of transiently expressed and fluorescently labeled copper-containing amine oxidases, diamine oxidase and N-methylputrescine oxidase in tobacco, using an agrobacterium infiltration protocol // *Methods Mol. Biol.* 2018. V. 1694. P. 215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7398-9_20
47. *Harris N.N., Luczo J.M., Robinson S.P., Walker A.R.* Transcriptional regulation of the three grapevine chalcone synthase genes and their role in flavonoid synthesis in Shiraz // *Aust. J. Grape Wine Res.* 2013. V. 19. P. 221. <https://doi.org/10.1111/AJGW.12026>
48. *Walker A.R., Lee E., Bogs J., McDavid D.A.J., Thomas M.R., Robinson S.P.* White grapes arose through the mutation of two similar and adjacent regulatory genes // *Plant J.* 2007. V. 49. P. 772. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2006.02997.X>
49. *Czemmel S., Stracke R., Weisshaar B., Cordon N., Harris N.N., Walker A.R., Robinson S.P., Bogs J.* The grapevine R2R3-MYB transcription factor VvMYB1 regulates flavonol synthesis in developing grape berries // *Plant Physiol.* 2009. V. 151. P. 1513. <https://doi.org/10.1104/PP.109.142059>
50. *Zhai R., Zhao Y., Wu M., Yang J., Li X., Liu H., Wu T., Liang F., Yang C., Wang Z., Ma F., Xu L.* The MYB transcription factor PbMYB12b positively regulates flavonol biosynthesis in pear fruit // *BMC Plant Biol.* 2019. V. 19. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S12870-019-1687-0/FIGURES/8>
51. *Ji X.J., Mao X., Hao Q.T., Liu B.L., Xue J.A., Li R.Z.* Splice variants of the castor WRI1 gene upregulate fatty acid and oil biosynthesis when expressed in tobacco leaves // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 146. <https://doi.org/10.3390/IJMS19010146>
52. *Nogueira M., Enfissi E.M.A., Welsch R., Beyer P., Zurbiggen M.D., Fraser P.D.* Construction of a fusion enzyme for astaxanthin formation and its characterisation in microbial and plant hosts: a new tool for engineering ketocarotenoids // *Metab. Eng.* 2019. V. 52. P. 243. <https://doi.org/10.1016/J.YMBEN.2018.12.006>
53. *Vasav A.P., Godbole R.C., Darshetkar A.M., Pable A.A., Barykar V.T.* Functional genomics-enabled characterization of CYP81B140 and CYP81B141 from *Plumbago zeylanica* L. substantiates their involvement in plumbagin biosynthesis // *Planta.* 2022. V. 256. P. 101. <https://doi.org/10.1007/S00425-022-04014-X>
54. *Liu T.Y., Chou W.C., Chen W.Y., Chu C.Y., Dai C.Y., Wu P.Y.* Detection of membrane protein-protein interaction in planta based on dual-intein-coupled tripartite split-GFP association // *Plant J.* 2018. V. 94. P. 426. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13874>
55. *Kudla J., Bock R.* Lighting the way to protein-protein interactions: recommendations on best practices for bimolecular fluorescence complementation analyses // *Plant Cell.* 2016. V. 28. P. 1002. <https://doi.org/10.1105/TPC.16.00043>
56. *Kerppola T.K.* Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. V. 37. P. 465. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOPHYS.37.032807.125842>
57. *Nam J.C., Bhatt P.S., Kim S.I., Kang H.G.* Co-immunoprecipitation for assessing protein-protein interactions in agrobacterium-mediated transient expression system in *Nicotiana benthamiana* // *Methods Mol. Biol.* 2023. V. 2690. P. 101. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3327-4_9
58. *Zhang Z., Mao Y., Ha S., Liu W., Botella J.R., Zhu J.K.* A multiplex CRISPR/Cas9 platform for fast and efficient editing of multiple genes in *Arabidopsis* // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 1519. <https://doi.org/10.1007/S00299-015-1900-Z>
59. *Kościańska E., Kalantidis K., Wypijewski K., Sadowski J., Tabler M.* Analysis of RNA silencing in agroinfiltrated leaves of *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum* // *Plant Mol. Biol.* 2005. V. 59. P. 647. <https://doi.org/10.1007/S11103-005-0668-X>
60. *Norkunas K., Harding R., Dale J., Dugdale B.* Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Methods.* 2018. V. 14. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S13007-018-0343-2/FIGURES/7>
61. *Yamamoto T., Hoshikawa K., Ezura K., Okazawa R., Fujita S., Takaoka M., Mason H.S., Ezura H., Miura K.* Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23024-y>
62. *Zheng L., Liu G., Meng X., Li Y., Wang Y.* A versatile *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for herbaceous plants and trees // *Biochem. Genet.* 2012. V. 50. P. 761. <https://doi.org/10.1007/S10528-012-9518-0>
63. *Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9 // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 688. <https://doi.org/10.1038/nbt.2654>
64. *Osakabe Y., Osakabe K.* Genome editing to improve abiotic stress responses in plants // *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2017. V. 149. P. 99. <https://doi.org/10.1016/BS.PMBTS.2017.03.007>
65. *Huang X., Jia H., Xu J., Wang Y., Wen J., Wang N.* Efficient transgene-free genome editing in plants in the T0 generation based on a co-editing strategy // *bioRxiv.* 2023. P. 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.03.02.530790>

66. Vyacheslavova A.O., Mustafaev O.N., Tyrin A.A., Shimshilashvili K.R., Berdichevets I.N., Shayakhmetova D.M., Goldenkov M.A., Fadeev V.S., Sheludko Y.V., Goldenkova-Pavlova I.V. Set of module vectors for stable or transient expression of heterologous genes in plants // Russ. J. Genet. 2012. V. 48. P. 892. <https://doi.org/10.1134/S1022795412090098>
67. Matsuo K., Fukuzawa N., Matsumura T. A simple agroinfiltration method for transient gene expression in plant leaf discs // J. Biosci. Bioeng. 2016. V. 122. P. 351. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOSC.2016.02.001>
68. Naji-Talakar S. Plant-derived biopharmaceuticals: overview and success of agroinfiltration // Trends Capstone. 2017. V. 2. P. 1.
69. Juranić M., Nagahatenna D.S.K., Salinas-Gamboa R., Hand M.L., Sánchez-León N., Leong W.H., How T., Bazanova N., Spriggs A., Vielle-Calzada J.P., Koltunow A.M.G., Koltunow A.M.G. A detached leaf assay for testing transient gene expression and gene editing in cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) // Plant Methods. 2020. V. 16. P. 1. <https://doi.org/10.1186/S13007-020-00630-4/FIGURES/5>
70. Vargas-Guevara C., Vargas-Segura C., Villalta-Villalobos J., Pereira L.F.P., Gatica-Arias A. A simple and efficient agroinfiltration method in coffee leaves (*Coffea arabica* L.): assessment of factors affecting transgene expression // 3 Biotech. 2018. V. 8. P. 471. <https://doi.org/10.1007/S13205-018-1495-5>
71. Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response // Trends Plant Sci. 2004. V. 9. P. 244. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2004.03.006>