



МРНТИ 34.27.29

<https://doi.org/10.32523/2616-7034-2025-150-1-101-116>

Научная статья

Модификация геномов растений методами генетической инженерии и геномного редактирования: доставка экзогенных ДНК

Е.В. Дейнеко^{*1}, А.Ж. Калкабаев², А.Ж. Жанабаева², А.К. Альмусаев²,
Г.М. Салхожаева², Р.М. Турпанова²

¹ Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Российская Федерация

² Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Астана, Казахстан

*Автор-корреспондент: deineko@bionet.nsc.ru

Аннотация: Рассматриваются данные о развитии и совершенствовании методов доставки фрагментов экзогенных ДНК в геномы различных видов растений в постгеномную эру биологии. Приведены особенности доставки экзогенных ДНК в зависимости от этапа культивирования растительных клеток в условиях *in vitro*. Сделан акцент на развитии методов, обеспечивающих доставку кассет экспрессии в геномы растительных клеток *in planta*, исключающих дезинтеграцию растительных тканей до клеточных культур с последующим восстановлением растений-трансформантов, т.е. минуя стадию *in vitro*. Приведены данные об успешности применения метода *floral dip* как для модельных растений *Arabidopsis thaliana*, так и для некоторых других видов, являющихся представителями шести семейств высших растений. Приведены данные о востребованности метода *floral dip* в связи с возрастающим интересом к модификации растений методами геномного редактирования.

Ключевые слова: генетическая инженерия, геномное редактирование, трансген, методы доставки, *floral dip*

Введение

Совершенствование методов молекулярной биологии, обеспечивающих исследователей возможностью манипулировать молекулами ДНК, объединяя фрагменты экзогенных ДНК различного происхождения в генетические конструкции для экспрессии в различных системах, привело к созданию нового направления – генетической инженерии растений. Прошло немногим более сорока 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]. На примере первого трансгенного растения исследователям стало очевидно, что транскрипционно-трансляционный аппарат растительной клетки способен поддерживать транскрипцию, трансляцию и посттрансляционные модификации перенесенных из других гетерологичных систем генов и продуктов их экспрессии. Именно это послужило отправной точкой для создания и развития агробιοтехнологий, позволяющих модифицировать растительные геномы с целью улучшения хозяйственно-ценных характеристик у важных сельскохозяйственных видов растений. Известны примеры создания трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, различным видам болезней, поражению насекомыми-вредителями, устойчивых к различным неблагоприятным абиотическим факторам среды, а также с улучшенными характеристиками пищевой ценности и качества производимой из них продукции [2, 3, 4]. Модификация метаболических путей биосинтеза некоторых вторичных соединений у растений послужила основой для создания «золотых бананов» и «золотого риса» с повышенным уровнем β -каротина, являющегося предшественником витамина А [5, 6], томатов с содержанием в плодах сквалена, фитостеролов, α -токоферола и каротиноидов [7], а также растений риса и сорго с более высоким содержанием цинка, железа и фолиевой кислоты [8]. Включение в состав кассеты экспрессии генов, кодирующих антигены возбудителей различных инфекционных заболеваний, а также тканеспецифичных регуляторных элементов, обеспечивающих их экспрессию в съедобных частях растения, привело к выдвижению концепции «съедобной вакцины» [9], а также привлекло внимание к таким генетически модифицированным растениям как источникам «съедобных рекомбинантных вакцин» [10, 11]. Модификация геномов растений с применением технологий генной инженерии открыла широкие перспективы в области создания биопродукторов рекомбинантных белков, включая биофармацевтику [12]. Все больше внимание специалистов привлекает производство моноклональных антител, в том числе и противораковых, в растениях, поскольку растительные системы могут быть более дешевыми, безопасными и масштабируемыми, чем системы экспрессии клеток млекопитающих, дрожжей, бактерий и насекомых [13, 14]. Ожидаемое увеличение рыночного спроса на высокоэффективные и более доступные терапевтические моноклональные антитела растительного происхождения повышают коммерческий интерес к платформам экспрессии на растительной основе, обеспечивая тем самым увеличение объемов инвестиций и активное привлечение крупных фармацевтических компаний к совместной разработке новых препаратов [15].

Диапазон применения рекомбинантных нефармацевтических белков, синтезируемых в тканях трансгенных растений, также достаточно широк. Современное производство

рекомбинантного трипсина основано на его биосинтезе в семенах кукурузы [16]. Известны примеры использования рекомбинантных белков животного происхождения, синтезируемых растительными клетками, таких, как коллаген, кератин, шелк и эластин, которые обладают высокой прочностью, жесткостью, эластичностью и биосовместимостью и, следовательно, могут использоваться для производства новых и устойчивых биополимеров [17]. В Китае были коммерциализованы и получили сертификат биобезопасности трансгенные растения кукурузы, в зернах которых накапливался рекомбинантный фермент фитаза, способная расщеплять фитаты, что улучшает переваримость растительных кормов [18].

Следует подчеркнуть, что за четыре десятка лет с момента появления первого трансгенного растения, технология модификации геномов растений с применением методов генной инженерии продемонстрировала свою успешность в создании сортов с улучшенными характеристиками, а также биопродуцентов рекомбинантных белков. Однако сложность и высокая стоимость этой технологии, включающей широкомасштабные отборы благоприятных событий интеграции генетических конструкций в геномы растений, а также некоторое настороженное отношение со стороны человеческого сообщества стимулировали необходимость поиска более простых путей целенаправленной модификации генома, что и послужило следующим этапом в развитии методов модификации растительных геномов с применением геномного редактирования.

В настоящее время геномное редактирование широко используется с применением CRISPR/Cas9 как усовершенствованный метод трангенеза для получения мутаций по многим хозяйственно-ценным признакам у растений, в том числе и таким, как устойчивость к неблагоприятным факторам среды, ответным реакциям растений на стрессовые воздействия и т.д. [19]. Известны работы по улучшению профиля гликозилирования путем нокауты генов *XylT* и *FucT*, кодирующих ферменты $\alpha(1,3)$ -фукозилтрансферазу и $\beta(1,2)$ -ксилозилтрансферазу в клеточной культуре табака [20, 21]. Улучшение хозяйственно-ценных признаков у сельскохозяйственных видов растений с применением методов геномного редактирования представлено в обзоре [22]. Рассмотрим основные особенности модификации генома растений с применением методов генной инженерии и геномного редактирования по сравнению традиционными методами селекции с акцентом на методы доставки экзогенных ДНК как наиболее важного этапа этих технологий.

Особенности модификации геномов растений

Комбинаторный принцип модификации генов и индукция случайных мутаций

В целом, ретроспективно рассматривая приемы адаптации и улучшения хозяйственно-ценных признаков у важных сельскохозяйственных видов растений, можно выделить две тенденции, одна из которых основана на интуитивном отборе отдельных форм, несущих спонтанные мутации, и вторая – на целенаправленном внесении мутаций в улучшаемые формы растений.

В первом случае основой будущего нового сорта послужит дальнейшее поддержание и сохранение среди потомков отобранных форм растений путем их переопыления.

Очевидно, что такой подход основан на комбинаторном принципе модификации генов и определяется искусством селекционера-исследователя не только обнаруживать необходимые для улучшения нового сорта признаки, но и закреплять их в новом создаваемом сорте. 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 настоящее время такие методы отбора дополнены современными методами молекулярного анализа с использованием молекулярных маркеров, таких, как SSR, SCAR, SNP и др., которые наследуются сцеплено с какими-либо важными хозяйственно-ценными характеристиками и позволяют селекционеру, ориентируясь на выявленные маркеры, насыщать генотипы будущего создаваемого сорта полезными признаками [23, 24]. Поиск и выявление QTL-генов, обеспечивающих сцепленное наследование сложных количественных признаков, таких, как, например, урожайность или засухоустойчивость [25, 26], также обеспечивает насыщение геномов растений будущего сорта генами, вносящими вклад в их проявление.

Вторая тенденция в направлении улучшения хозяйственно-ценных признаков у растений основана на попытках ускорения частоты возникновения мутаций. Возможность внесения мутаций в геномы различных видов растений появилась с открытием группы факторов физической (различные виды излучений) и химической природы (химические мутагены), позволяющих исследователям индуцировать двуцепочечные разрывы в молекулах ДНК. С точки зрения молекулярной биологии такие мутации представляют собой нарушения в последовательности ДНК, возникающие при восстановлении двуцепочечных разрывов с помощью ферментов репарации растительной клетки. Именно восстановление поломок, индуцированных ферментами репарации, и приводит к образованию широкого спектра различных перестроек (точечные мутации, делеции, инверсии, инсерции, транслокации и т. д.), которые могут быть ассоциированы с улучшением каких-либо признаков у растений, в том числе и хозяйственно-ценных.

Следующим этапом в развитии методов модификации геномов растений с помощью внесения различного рода мутаций, послужили методы, основанные на применении технологий рекомбинантных ДНК, позволяющих вносить в геном растения-донора фрагменты экзогенных ДНК, включающих кассеты экспрессии с целевыми генами. С точки зрения генетики такие экзогенные фрагменты ДНК, интегрированные в геном растения-донора (трансгенного растения), рассматриваются как инсерционные мутации. Более того, дальнейшее развитие этих методов привело к разработке молекулярных инструментов, основанных на открытии специфических участков у бактерий (CRISPR/Cas), позволяющих целенаправленно вносить двуцепочечные разрывы в выбранные исследователем целевые районы-мишени и, таким образом, индуцировать в них мутации.

Модификация геномов с применением технологий рекомбинантных ДНК

Случайный характер распределения экзогенных ДНК в геноме растения-донора при использовании методов генетической инженерии

В основе методов, основанных на технологиях рекомбинантных ДНК, лежит создание искусственных генетических конструкций, включающих различные гены из

разных гетерологичных систем. Такой подход снимает природные ограничительные барьеры между видами и царствами живых организмов и позволяет исследователям манипулировать с различными источниками экзогенных ДНК. Однако первые попытки переноса экзогенных ДНК в геном растительной клетки столкнулись с надежным барьером - целлюлозной оболочкой, защищающей клетки от проникновения чужеродных источников генетической информации. Использование исследователями методов биобаллистики с нанесением на частицы золота или вольфрама фрагментов экзогенных ДНК [27], а также протопластов, у которых целлюлозная оболочка разрушалась специальными целлюлитическими ферментами, позволило преодолевать эти барьеры и доставлять созданные генетические конструкции в цитоплазму и ядро растительной клетки [28]. Широкое распространение получили и методы, 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. 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 [29, 30]. 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. Следует подчеркнуть, что доставленные в геном растения фрагменты экзогенных ДНК интегрируются в геноме случайным образом [31] и дальнейшая «судьба» перенесенных трансгенов будет во многом определяться генетическим окружением того района генома, в который произошла интеграция [32]. Более того, фрагменты экзогенных ДНК могут быть случайным образом интегрированы в районы расположения собственных генов и вызывать их изменения – Т-ДНК-индуцированные мутации [33, 34]. На основании вышеперечисленных особенностей становится очевидным, что технология модификации геномов растений с применением методов генетической инженерии достаточно сложна и подразумевает поиск благоприятных событий интеграции экзогенных ДНК, экспрессия целевых генов в которых будет сохраняться на высоком уровне в течение последующих поколений и не будет связана с мутационными изменениями других генов, снижающих характеристики хозяйственно-ценных признаков.

Возможность выбора районов-мишеней в геноме растения-донора при использовании методов геномного редактирования

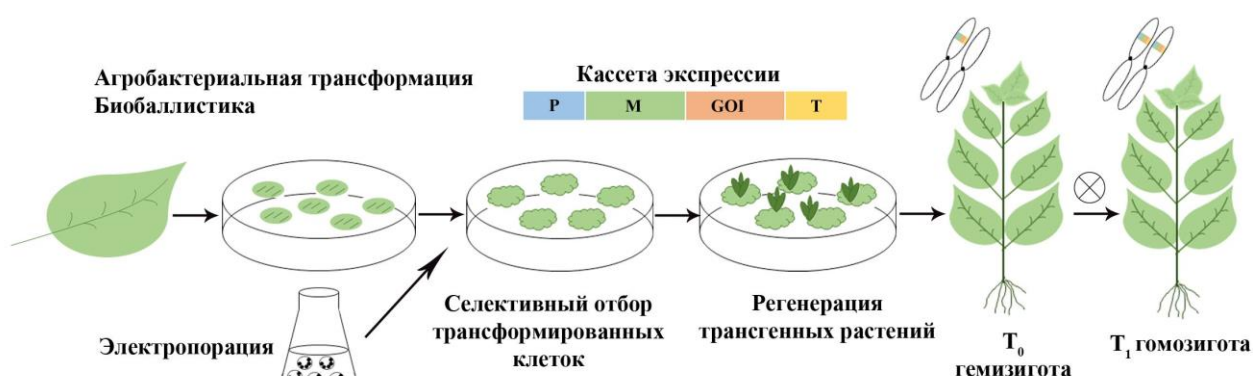
Основой для создания инструментов, позволяющих исследователям целенаправленно вносить двуцепочечные разрывы в выбранном районе-мишени растительного генома, послужило открытие у бактерий механизма борьбы с вторжением чужеродной ДНК бактериофагов [35]. Суть создания инструмента редактирования генома состоит в том, чтобы в состав генетической конструкции, переносимой в геном растительной клетки, был включен участок ДНК, комплементарный району гена-мишени, в котором планируется произвести двуцепочечный разрез. В качестве «молекулярных ножниц» для осуществления таких разрезов выступают нуклеазы, в частности, нуклеаза Cas9

из *Streptococcus pyogenes*. Следует подчеркнуть, что такие инструменты могут быть интегрированы в геном растения в виде наработанных в другой системе экспрессии рибонуклеиновых комплексов [36]. Генетическая конструкция, несущая в своем составе последовательность гена нуклеазы Cas9 и последовательность, гомологичную району гена-мишени, может быть интегрирована в геном с помощью разработанных и широко используемых способов агробактериальной и биобаллистической доставки.

Сравнительный анализ методов доставки экзогенных ДНК в ядерный геном растений

Методы, включающие этап культивирования *in vitro*

Технологии модификации генома растений с применением методов генетической инженерии и геномного редактирования на ранних этапах их формирования и дальнейшего совершенствования включали процесс дезинтеграции растительных тканей с последующим их культивированием *in vitro*. Необходимость включения этой стадии диктовалась особенностями организации клеточной стенки, представляющей собой сложный барьер для проникновения почвенных бактерий, например, *A. tumefaciens*, способных проникать в растительные клетки только в местах их повреждений. На рисунке 1 представлена общая схема доставки экзогенных ДНК в составе кассеты экспрессии в геном растительной клетки и получение гомозиготных по встроенным генам растений-трансформантов (T₁).



Примечание: P – промотор; M – последовательность маркерного гена; GOI – последовательность целевого гена (*gene of interest*); T – терминатор.

Рисунок 1. Схема доставки экзогенных ДНК (кассеты экспрессии) в ядерный геном растений, включающая этап культивирования клеток *in vitro*

Первые эксперименты по доставке экзогенных ДНК в ядерный геном растений были направлены на инокуляцию листовых эксплантов суспензией *A. tumefaciens*. После инокуляции листовые экспланты помещали на питательные среды с добавлением фитогормонов и соответствующих антибиотиков для селективного отбора трансформированных клеток и индуцировали из них каллусы с последующим

восстановлением из них полноценных растений-трансформантов. С помощью методов биобаллистики также можно было преодолеть барьерные препятствия клеточной стенки, помещая фрагменты экзогенных ДНК на поверхности золотых или вольфрамовых частиц и с помощью генной пушки доставлять их в ядро клетки. Наконец, исследователи попытались растворять клеточную стенку с помощью ферментов, однако, несмотря на успешную доставку кассет экспрессии при таком способе, дальнейшие процедуры восстановления растений из протопластов представляли собой чрезвычайно сложную задачу.

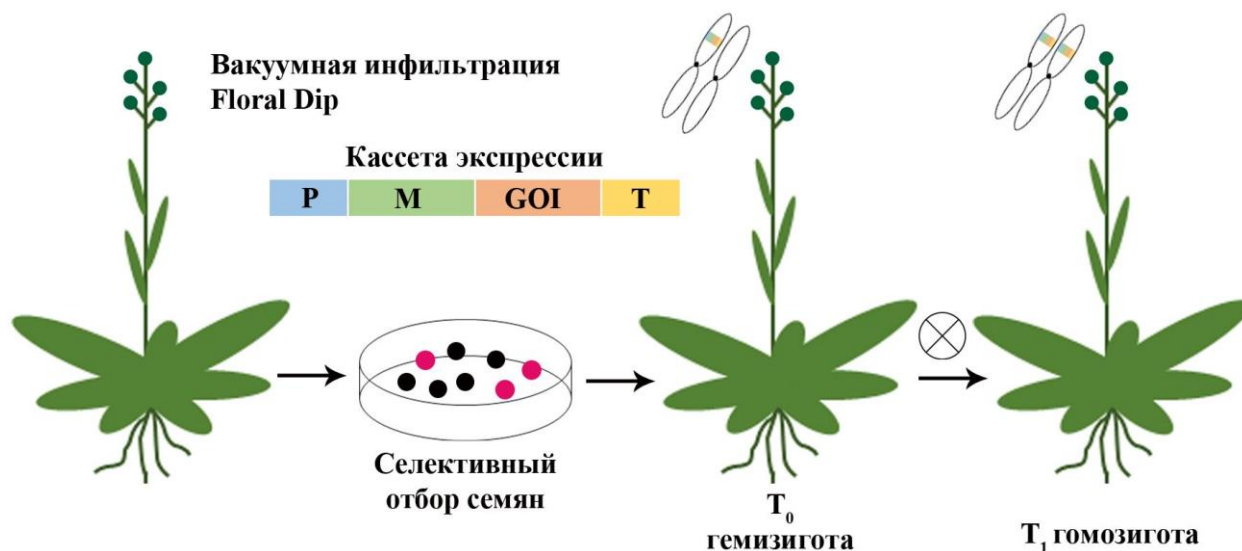
Итак, несмотря на успешность разработанной технологии получения генетически модифицированных растений, со временем стало очевидно, что эта технология достаточно сложна, трудоемка, требует много времени на рутинные работы от начала переноса трансгенов до получения трансформированных растений. Более того, этап культивирования клеток *in vitro* сопровождался соматической изменчивостью, что не всегда рассматривалось как желаемое событие. Следует подчеркнуть, что несмотря на введение в культуру *in vitro* более двух сотен видов растений, для некоторых из них процедура регенерации все еще остается трудно разрешимой задачей. В связи с этим исследователи предприняли широкий поиск возможных вариантов доставки экзогенных ДНК непосредственно в геном растительных клеток, минуя их переход в состояние *in vitro*. К настоящему моменту такие методы были успешно разработаны, и продолжается их адаптация для различных видов растений.

Методы доставки экзогенной ДНК *in planta*

Метод доставки экзогенной ДНК в геном растительной клетки, минуя стадию культивирования *in vitro*, был разработан к 1987 году для *A. thaliana* [37]. Суть этого метода заключалась в том, что предварительно замоченные и набухшие семена *A. thaliana* помещали в суспензию *A. tumefaciens* на сутки, после чего отмывали водой в стерильных условиях, помещали на селективные среды с антибиотиком и отбирали трансформированные растения. На основании полученных данных стало очевидным, что активно делящиеся меристематические клетки зародыша становятся компетентными для агробактериального инфицирования. В дальнейшем этот процесс был существенно усилен за счет проведения агробактериального заражения эксплантов в условиях вакуумной инфльтрации [38]. Примечательно, что прорыв в направлении усовершенствования методов доставки экзогенных ДНК в геном растительных клеток, связанный с существенным упрощением этой процедуры и исключением этапа культивирования растительных клеток *in vitro*, оказал огромное влияние на молекулярно-генетические исследования с применением *A. thaliana* как модельного растения.

Следующим шагом в развитии методов вакуумной инфльтрации клеток эксплантов трансформируемых растений без культивирования и регенерации *in vitro* послужило простое погружение развивающихся цветочных побегов в агробактериальную суспензию с добавлением сахарозы и поверхностно-активного вещества Silwet L-77 [39]. Более того, авторами этого исследования было показано, что повторная обработка цветочных побегов, а также их укрытие в пакеты из пленки, увеличивало скорость трансформации и общий выход растений-трансформантов. Положительный эффект на увеличение

выхода трансформантов оказало воздействие на растения после обработки цветочных побегов стрессовыми факторами (засуха) [40]. К настоящему времени в литературе можно найти довольно много различных вариантов метода *floral dip* для *A. thaliana* [41, 42]. На рисунке 2 в самом общем виде представлены основные этапы этого метода.



Примечание: P – промотор; M – последовательность маркерного гена; GOI – последовательность целевого гена (*gene of interest*); T – терминатор; Красный цвет – семена с геном красного флуоресцирующего белка.

Рисунок 2. Схема доставки экзогенных ДНК (кассеты экспрессии) в ядерный геном растений методами *in planta*

Как хорошо видно на представленном рисунке, фрагменты экзогенных ДНК, объединенные в кассете экспрессии, могут быть доставлены непосредственно в геном целого растения с применением метода *floral dip* или в отдельные его части с использованием подхода вакуумной инфильтрации. Включение в состав кассеты экспрессии репортерного гена RFP, кодирующего красный флуоресцирующий белок под управлением промотора, активирующегося в семенных оболочках, позволяет проводить предварительный отбор уже на стадии семян, собранных с цветочных побегов после агробактериальной обработки и получать T_0 (гемизиготы). После самоопыления гемизигот T_0 среди потомков можно отобрать гомозиготные по целевому гену растения.

Несмотря на то, что доставка экзогенных ДНК методом *floral dip* достаточно широко применяется для *A. thaliana*, а также разработаны и продолжают разрабатываться модификации этого метода для других видов растений, полная картина механизма агробактериального заражения неповрежденных и, более того, достаточно удаленных от места нанесения агробактерий целевых тканей, все еще остается не вполне ясной. Исходя из получаемых результатов, свидетельствующих о том, что экзогенные ДНК обнаруживаются в тканях семенного зародыша, возможно предположить два пути их проникновения в целевые клетки. С одной стороны, экзогенные ДНК могут быть

интегрированы в пыльцевое зерно и затем в спермий, что представляется вполне логичным, поскольку пыльцевые зерна на поверхности пестика непосредственно контактируют с клетками агробактерий. С другой стороны, можно предположить и путь инфицирования яйцеклеток или зигот при их слиянии со спермиями, однако в этом случае остается неясным достаточно удаленный путь инфицирования яйцеклеток или зигот, поскольку они расположены внутри семязпочки. Первой работой, отчасти пролившей свет на механизм агробактериального заражения тканей цветка при использовании метода *floral dip*, является исследование тканей цветка *A. thaliana* при доставке гена *uidA*, кодирующего фермент бета-глюкуронидазу [43]. Авторами этого исследования было установлено, что активность фермента наблюдалась только в развивающихся семязпочках и не обнаруживалась в пыльце и пыльцевых трубках. Более того, было показано, что скорость трансформации семязпочек была в 6 раз выше у растений с открытой формой гинецея, что послужило основанием для утверждения, что агробактерии проникают к семязпочкам через внутреннюю часть открытого развивающегося гинецея.

Дальнейшее развитие метода *floral dip* для доставки экзогенных ДНК в ядерный геном других видов растений

Эффективность и простота применения метода *floral dip* для доставки фрагментов экзогенных ДНК (кассет экспрессии или инструментов для геномного редактирования) были весьма привлекательны для применения к другим видам растений. Именно это обстоятельство стимулировало широкий поиск возможностей его адаптации к различным видам растений (Таблица 1).

Таблица 1

Применение метода *floral dip* для доставки экзогенных ДНК в геномы различных видов растений

Вид растения	Семейство	Ссылка на источник
<i>Medicago truncatula</i> (люцерна усеченная)	<i>Fabaceae</i>	44
<i>Brassica napus</i> (рапс), <i>B. carinata</i> (горчица абиссинская)	<i>Brassicaceae</i>	45
<i>Triticum aestivum</i> (пшеница мягкая)	<i>Poaceae</i>	46
<i>Zea mays</i> (кукуруза обыкновенная)	<i>Poaceae</i>	47
<i>Linum usitatissimum</i> (лен обыкновенный)	<i>Linaceae</i>	48
<i>Tagetes erecta</i> (бархатцы мелкоцветковые)	<i>Asteraceae</i>	49
<i>Solanum lycopersicum</i> (томаты)	<i>Solanaceae</i>	50
<i>Cosmos sulphureus</i> (космея серно-желтая)	<i>Asteraceae</i>	51
<i>Descurainia Sophia</i> (Дескурайния Софии)	<i>Brassicaceae</i>	52

Как видно из таблицы 1, к настоящему времени в литературе имеются сведения об успешном применении метода *floral dip* для 10-ти видов растений, являющихся представителями 6-ти семейств [44-52]. Принимая во внимание особенности строения

цветков, представителей перечисленных в таблице видов растений, следует отметить, что они существенно различаются между собой, однако, как показывают результаты экспериментов, доставка экзогенных ДНК с применением метода *floral dip* может быть для них успешной. Данное обстоятельство вселяет оптимизм на расширение приведенного списка в случае необходимости получения генетически модифицированных видов растений с применением методов генной инженерии и геномного редактирования, и в особенности для тех видов, для которых все еще не разработаны протоколы культивирования *in vitro*. Необходимо отметить, что на поиск методов и подходов для доставки экзогенных ДНК в геном растительных клеток *in planta* в настоящий момент времени направлены усилия многих исследовательских коллективов [53].

Вклад авторов

Е.В.Д. – концепция и руководство работой, написание текста; **А.Ж.К., А.Ж.Ж.** и **А.К.А.** – обсуждение результатов исследования; **Г.М.С.** и **Р.М.Т.** – написание текста и редактирование текста статьи.

Финансирование

Работа выполнена в рамках программы «Зарубежный ученый» 2024–2025.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Список литературы

1. 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;303(5914):209-213. <https://doi.org/10.1038/303209a0>
2. Dong OX, Ronald PC. Genetic Engineering for Disease Resistance in Plants: Recent progress and Future Perspectives. *Plant Physiol*. 2019;180(1):26-38. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01224>
3. Gatehouse AMR, Ferry N, Edwards MG, Bell HA. Insect-resistant biotech crops and their impacts on beneficial arthropods. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011;366(1569):1438-1452. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0330>
4. Wani SH, Dutta T, Neelapu NRR, Surekha C. Transgenic approaches to enhance salt and drought tolerance in plants. *Plant Gene*. 2017;11:219-231. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2017.05.006>
5. Paul J, Khanna H, Kleidon J, et al. Golden bananas in the field: elevated fruit pro-vitamin A from the expression of a single banana transgene. *Plant Biotechnol J*. 2016;15(4):520-532. <https://doi.org/10.1111/pbi.12650>
6. Zhang C, Wohlhueter R, Zhang H. Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. *Food Sci Hum Wellness*. 2016;5(3):116-123. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2016.04.002>

7. Liao P, Chen X, Wang M, Bach TJ, Chye M. Improved fruit α -tocopherol, carotenoid, squalene and phytosterol contents through manipulation of *Brassica juncea* 3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL-COA SYNTHASE1 in transgenic tomato. *Plant Biotechnol J*. 2017;16(3):784-796. <https://doi.org/10.1111/pbi.12828>
8. Kumar S, Palve A, Joshi C, Srivastava RK, Rukhsar N. Crop biofortification for iron (Fe), zinc (Zn) and vitamin A with transgenic approaches. *Heliyon*. 2019;5(6):e01914. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01914>
9. Chan H, Daniell H. Plant-made oral vaccines against human infectious diseases – Are we there yet? *Plant Biotechnol J*. 2015;13(8):1056-1070. <https://doi.org/10.1111/pbi.12471>
10. Clarke JL, Waheed MT, Lössl AG, Martinussen I, Daniell H. How can plant genetic engineering contribute to cost-effective fish vaccine development for promoting sustainable aquaculture? *Plant Mol Biol*. 2013;83(1-2):33-40. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0081-9>
11. Kolotilin I, Topp E, Cox E, et al. Plant-based solutions for veterinary immunotherapeutics and prophylactics. *Vet Res*. 2014;45(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0117-4>
12. Burnett MJB, Burnett AC. Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants People Planet*. 2020;2(2):121-132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>
13. Buyel JF. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnol Adv*. 2018;36(2):506-520. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.02.002>
14. Diamos AG, Hunter JGL, Pardhe MD, et al. High-level production of monoclonal antibodies using an optimized plant expression system. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;7:472. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00472>
15. Zagorskaya AA, Deineko EV. Recombinant monoclonal antibodies synthesized in plant expression systems: Problems and prospects. *Russ J Plant Physiol*. 2024;71(5). <https://doi.org/10.1134/S1021443724607766>
16. Krishnan A, Woodard SL. TrypZean™: an animal-free alternative to bovine trypsin. *Biotechnol Agric For*. 2014;69:43-63. https://doi.org/10.1007/978-3-662-43836-7_4
17. Börnke F, Broer I. Tailoring plant metabolism for the production of novel polymers and platform chemicals. *Curr Opin Plant Biol*. 2010;13(3):353-361. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.01.005>
18. Xu X, Zhang Y, Meng Q, et al. Overexpression of a fungal β -mannanase from *Bispora* sp. MEY-1 in maize seeds and enzyme characterization. *PLoS One*. 2013;8(2):e56146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056146>
19. Zhao G, Cheng Q, Zhao Y, et al. The abscisic acid-responsive element binding factors MAPKKK18 module regulates abscisic acid-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 2023;299(4):103060. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103060>
20. Mercx S, Smargiasso N, Chaumont F, et al. Inactivation of the β (1,2)-xylosyltransferase and the α (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;8:403. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00403>
21. Sheva M, Hanania U, Ariel T, et al. Sequential genome editing and induced excision of the transgene in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Front Plant Sci*. 2020;11:607174. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607174>

22. Sidhic J, Prakash CA, Sarath NG, et al. CRISPR-based plant improvements for boosting the natural products. In: Kumar N, ed. Biosynthesis of Natural Products in Plants. Springer, Singapore; 2024:125-139. doi: https://doi.org/10.1007/978-981-97-2166-5_5
23. Rozanova IV, Khlestkina EK. NGS sequencing in barley breeding and genetic studies. Vavilov J Genet Breed. 2020;24(4):348-355. <https://doi.org/10.18699/VJ20.627>
24. Stepochkin PI, Gordeeva EI, Khlestkina EK. Marker-assisted breeding of hybrid lines of Triticum dicoccon (Schränk) Schuebl. × Triticum aethiopicum Jakubz. with purple grain. Proc Appl Bot Genet Breed. 2023;184(2):139-148. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2023-2-139-148>
25. Gao F, Wen W, Liu J, et al. 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;6:1099. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01099>
26. Soriano JM, Alvaro F. Discovering consensus genomic regions in wheat for root-related traits by QTL meta-analysis. Sci Rep. 2019;9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47038-2>
27. Taylor NJ, Fauquet CM. Microparticle bombardment as a tool in plant science and agricultural biotechnology. DNA Cell Biol. 2002;21(12):963-977. <https://doi.org/10.1089/104454902762053891>
28. Krasova YuV, Fadeev VV, Moiseeva EM, Gusev YuS, Chumakov MI. Optimization of the technique for maize protoplast isolation and their nativity after electroporation. Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology. 2022;22(4):445-454. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-4-445-454>
29. Shimatani Z, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Toki S, Terada R. Positive-negative-selection-mediated gene targeting in rice. Front Plant Sci. 2015;5:748. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00748>
30. Nester EW. Agrobacterium: nature's genetic engineer. Front Plant Sci. 2015;5:730. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>
31. Gelvin SB. Integration of Agrobacterium T-DNA into the plant genome. Annu Rev Genet. 2017;51(1):195-217. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035320>
32. Rajeevkumar S, Anunanthini P, Sathishkumar R. Epigenetic silencing in transgenic plants. Front Plant Sci. 2015;6:693. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00693>
33. 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 Genomics. 2019;20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5636-y>
34. 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 Genomics. 2021;22(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07877-8>
35. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012;337(6096):816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
36. Zhang Y, Iaffaldano B, Qi Y. CRISPR ribonucleoprotein-mediated genetic engineering in plants. Plant Commun. 2021;2(2):100168. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2021.100168>
37. Feldmann KA, Marks MD. Agrobacterium-mediated transformation of germinating seeds of Arabidopsis thaliana: A non-tissue culture approach. Mol Gen Genet. 1987;208(1-2):1-9. <https://doi.org/10.1007/BF00330414>

38. Bechtold N, Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. Humana Press eBooks. 1998;82:259-266. <https://doi.org/10.1385/0-89603-391-0:259>
39. Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 1998;16(6):735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x>
40. Ali I, Salah KBH, Sher H, et al. Drought stress enhances the efficiency of floral dip method of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Arabidopsis thaliana*. Braz J Biol. 2022;84:e259326. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.259326>
41. Bent A. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. Methods Mol Biol. 2006;343:87-104. <https://doi.org/10.1385/1-59745-130-4:87>
42. Ali I, Sher H, Ali A, Hussain S, Ullah Z. Simplified floral dip transformation method of *Arabidopsis thaliana*. J Microbiol Methods. 2022;197:106492. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106492>
43. Desfeux C, Clough SJ, Bent AF. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. Plant Physiol. 2000;123(3):895-904. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.895>
44. Trieu AT, Burleigh SH, Kardailsky IV, et al. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. Plant J. 2000;22(6):531-541. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00757.x>
45. Verma SS, Chinnusamy V, Bansal KC. A simplified floral dip method for transformation of *Brassica napus* and *B. carinata*. J Plant Biochem Biotechnol. 2008;17(2):197-200. <https://doi.org/10.1007/BF03263286>
46. Zale JM, Agarwal S, Loar S, Steber CM. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Rep. 2009;28(6):903-913. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0696-0>
47. Mu G, Chang N, Xiang K, Sheng Y, Zhang Z, Pan G. Genetic transformation of maize female inflorescence following floral dip method mediated by *Agrobacterium*. Biotechnol (Faisalabad). 2012;11(3):178-183. <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.178.183>
48. Bastaki NK, Cullis CA. Floral-dip transformation of flax (*Linum usitatissimum*) to generate transgenic progenies with a high transformation rate. J Vis Exp. 2014;94:e52189. <https://doi.org/10.3791/52189>
49. Cheng X, Huang C, Zhang X, Lyu Y. Establishment of transgenic marigold using the floral dip method. Acta Physiol Plant. 2019;41(8):147. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2937-3>
50. Honda C, Ohkawa K, Kusano H, Teramura H, Shimada H. A simple method for in planta tomato transformation by inoculating floral buds with a sticky *Agrobacterium tumefaciens* suspension. Plant Biotechnol (Tokyo). 2020;38(1):153-156. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0707a>
51. Purwantoro A, Irsyadi MB, Sawitri WD, Fatumi NC, Fajrina SN. Efficient floral dip transformation method using *Agrobacterium tumefaciens* on *Cosmos sulphureus* Cav. Saudi J Biol Sci. 2023;30(7):103702. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103702>
52. Jia T, Yang H, Zhou D, et al. Establishment of a genetic transformation and gene editing method by floral dipping in *Descurainia sophia*. Plants. 2024;13(20):2833. <https://doi.org/10.3390/plants13202833>
53. Bélanger JG, Copley TR, Hoyos-Villegas V, Charron J, O'Donoghue L. A comprehensive review of in planta stable transformation strategies. Plant Methods. 2024;20(1):79. <https://doi.org/10.1186/s13007-024-01200-8>

Генетикалық инженерия және геномдық өңдеу әдістері мен өсімдік геномдарының модификациясы: экзогендік ДНҚ жеткізу

Е.В. Дейнеко^{*1}, А.Ж. Калкабаев², А.Ж. Жанабаева², А.К. Альмусаев²,
Г.М. Салхожаева², Р.М. Турпанова²

¹Ресей Ғылым академиясының Сібір бөлімінің цитология және генетика институты
Федералды зерттеу орталығы, Новосибирск, Ресей Федерациясы

²Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Астана, Қазақстан

Аңдатпа. Биологияның постгеномдық дәуірінде әртүрлі өсімдік түрлерінің геномдарына экзогендік ДНҚ фрагменттерін жеткізу әдістерін дамыту мен жетілдірілу туралы деректер қарастырылады. *In vitro* жағдайында өсімдік жасушаларын өсіру сатысына байланысты экзогендік ДНҚ-ны жеткізу ерекшеліктері келтірілген. Өсімдік ұлпаларының жасуша культураларына ыдырауын болдырмайтын, содан кейін трансформаторлық – өсімдіктерді қалпына келтіретін, яғни *in vitro* кезеңін айналып өтетін, *in planta* өсімдік жасушаларының геномдарына экспрессиялық кассеталарды жеткізуді қамтамасыз ететін әдістерді дамытуға баса назар аударылады. *Arabidopsis thaliana* модельді өсімдіктері үшін де, жоғары сатыдағы өсімдіктердің алты тұқымдасының өкілдері болып табылатын кейбір басқа түрлер үшін де *floral dip* әдісін қолданудың табыстылығы туралы деректер берілген. Геномдық өңдеу әдістерімен өсімдіктерді модификациялауға қызығушылықтың артуына байланысты *floral dip* әдісінің сұранысы туралы деректер келтірілген.

Түйін сөздер: генетикалық инженерия, геномдық редакциялау, трансген, жеткізу әдістері, *floral dip*

Modification of Plant Genomes by Genetic Engineering and Genome Editing: Delivery of Exogenous DNA

Е.В. Deineko^{*1}, А.Ж. Kalkabaev², А.Ж. Zhanabaeva², А.К. Almusaev²,
Г.М. Salkhozhaeva², Р.М. Turpanova²

¹Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

²L.N. Gumilyov Eurasian National University, Astana, Kazakhstan

Abstract. The article reviews data on the development and improvement of methods for delivering exogenous DNA fragments into the genomes of various plant species in the postgenomic era of biology. The features of exogenous DNA delivery, depending on the stage of plant cell cultivation *in vitro* are presented. The emphasis is placed on the development of methods that ensure the delivery of expression cassettes *into plant* cell genomes *in planta*, excluding the disintegration of plant tissues to cell cultures with subsequent restoration of transformant plants, i.e., bypassing the *in vitro* stage. Data are presented on the success of the *floral dip* method for both model plants *Arabidopsis thaliana*, and some other species that are representatives of six families of higher plants. Data are presented on the demand for the *floral dip* method in connection with the growing interest in plant modification by genome editing methods.

Keywords: genetic engineering, genome editing, transgene, delivery methods, *floral dip*

Сведения об авторах:

Дейнеко Елена Викторовна – автор-корреспондент, профессор, доктор биологических наук, заведующий лабораторией в Федеральном исследовательском центре «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, пр. Академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск, Российская Федерация.

Калкабаев Алибек Жанатович – магистрант, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Мунайтпасова, 13, 010000, Астана, Казахстан.

Жанабаева Аида Жамбылқызы – магистрант, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Мунайтпасова, 13, 010000, Астана, Казахстан.

Альмусаев Алдияр Калымжанович – магистрант, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Мунайтпасова, 13, 010000, Астана, Казахстан.

Салхожаева Гаухар Мадыхановна – доцент, кандидат биологических наук, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Мунайтпасова, 13, 010000, Астана, Казахстан.

Турпанова Рауза Масгутовна – доцент, кандидат сельскохозяйственных наук, Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, ул. Мунайтпасова, 13, 010000, Астана, Казахстан.

Авторлар туралы мәліметтер:

Дейнеко Елена Викторовна – хат-хабар авторы, профессор, биология ғылымдарының докторы, Ресей Ғылым академиясы Сібір филиалының цитология және генетика Федералдық ғылыми-зерттеу орталығы институты зертханасының меңгерушісі, Академик Лаврентьев даңғылы, 10, 63009, Новосибирск, Ресей Федерациясы.

Қалқабәев Әлібек Жанатұлы – Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің магистранты, Мұңайтпасов көш., 13, 010000, Астана, Қазақстан.

Жаңабәева Аида Жамбылқызы – Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің магистранты, Мұңайтпасов көш., 13, 010000, Астана, Қазақстан.

Альмусаев Алдияр Қалымжанұлы – Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің магистранты, Мұңайтпасов көш., 13, 010000, Астана, Қазақстан.

Салхожаева Гаухар Мадыханқызы – доцент, биология ғылымдарының кандидаты, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің, Мұңайтпасов көш., 13, 010000, Астана, Қазақстан.

Тұрпанова Рауза Масғұтқызы – доцент, ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің, Мұңайтпасов көш., 13, 010000, Астана, Қазақстан.

Authors' information:

Deineko Elena Viktorovna – corresponding author, Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Academician Lavrentyev Ave., 10, 630090, Novosibirsk, Russian Federation.

Kalkabaev Alibek Zhanatovich – master's student, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Munaitpasov Str., 13, 010000, Astana, Kazakhstan.

Zhanabaeva Aida Zhambylkyzy – master’s student, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Munaitpasov Str., 13, 010000, Astana, Kazakhstan.

Almusaev Aldiyar Kalymzhanovich – master’s student, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Munaitpasov Str., 13, 010000, Astana, Kazakhstan.

Salkhozhaeva Gaukhar Madykhanovna – associate Professor, Candidate of Biological Sciences, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Munaitpasov Str., 13, 010000, Astana, Kazakhstan.

Turpanova Rauza Masgutovna – Candidate of Agricultural Sciences, associate Professor, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Munaitpasov Str., 13, 010000, Astana, Kazakhstan.