

## Трансгенные растения: за и против

А. П. Галкин, Т. В. Медведева, Л. Г. Лешина, О. В. Булко, В. П. Кухарь

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины  
Ул. Мурманская, 5, Киев, 02094, Украина

---

*В обзоре рассматриваются вопросы, связанные с широким внедрением трансгенных растений в сельскохозяйственное производство, а именно: перенос генов в растения; вероятность влияния на окружающую среду селективных и маркерных генов, вводимых в растения вместе с желаемым геном; способы получения безмаркерных растений; возникающие при этом проблемы и возможные способы их решения.*

---

В настоящее время сельское хозяйство, микробиологическая и фармацевтическая промышленности широко используют клеточные линии растений и животных, штаммы бактерий, грибов, дрожжей полученные с помощью генно-инженерных технологий. Измененные таким образом организмы названы трансгенными, или генетически модифицированными организмами (ГМО).

Трансгенные организмы — это растения, животные, другие живые существа, несущие в своем геноме один или несколько чужеродных генов, введенных с помощью методов генетической трансформации. Появление трансгенных организмов стало возможным благодаря разработке технологий получения рекомбинантных молекул ДНК, а также методов введения рекомбинантной ДНК в живые клетки и регенерации из них организмов с новыми заданными признаками.

На сегодня существует целый ряд коммерческих фирм, занимающихся получением трансгенных организмов, в том числе трансгенных растений. Именно применение трансгенных растений, способных противостоять различного рода патогенам, вредителям, неблагоприятным факторам окружающей среды без дополнительных обработок химическими веществами или же с применением гораздо меньшего их количества, может значительно улучшить экологическое состояние природы и сделать более безопасными продукты питания для человека, предотвратить дальнейшее загрязнение почв тяжелыми металлами, служить дополнитель-

ным источником наработки «съедобных» белков, пищевых добавок, лекарственных препаратов и других не менее ценных продуктов [1].

Очень быстро вытесняют ранее существовавшие сорта прошедшие испытания сельскохозяйственные генетически модифицированные растения, устойчивые к гербицидам, насекомым-вредителям, вирусным заболеваниям. Уже в 1996 году 40 % всех площадей хлопчатника в США были засеяны трансгенными растениями. Устойчивая к насекомым трансгенная кукуруза заняла 80 тыс. га, а картофель — 7,2 тыс. га. Соя, устойчивая к гербициду Раундап занимает около 800 тыс. га. В том же году в Канаде на площади 20 тыс. га культивировали трансгенный масличный рапс, устойчивый к гербициду Либерти. Согласно данным международной службы по применению агробιοтехнологических разработок, динамика распространения трансгенных сортов за последние годы следующая: в 1996 году — на 1,7 млн га; 1997 — на 11,0 млн га, 1998 — на 27,8 млн га.

В 1998 г. пять трансгенных культур выращивали в восьми странах, среди которых Испания, Франция и Южная Африка высеяли трансгенные культуры в первый раз. В США в 1998 г. посевы трансгенных культур занимали 20,5 млн га, в Аргентине — 4,3 млн га, Канаде — 2,8 млн га, в Австралии — 100 тыс га. Значительное возрастание площадей под трансгенными растениями ожидается в странах Северной и Латинской Америки, странах Евросоюза, расширение набора трансгенных культур и площадей под ними — в Китае, Австралии и Южной Африке. Ожидается появление трансгенных сельскохозяйственных культур в странах Вос-

точной Европы. Число стран, выращивающих трансгенные сорта, возросло с одной в 1992 г. до шести — в 1996 г., девяти — в 1998 г. и свыше 20 — в 2000 г. Основными трансгенными культурами являются соя, кукуруза, хлопчатник, рапс, картофель. Среди главных признаков, контролируемых перенесенными генами, на первом месте стоит устойчивость к гербицидам (70 % всех культур), за которым следует устойчивость к насекомым-вредителям (20 %).

Мировые доходы от продажи трансгенных культур оцениваются в 75 млн долларов в 1995 г., 235 млн — в 1996 г., 670 млн — в 1997 г. и 1,2—1,5 млрд долларов — в 1998 г. По оценкам экспертов, в 2000 г. объем продажи трансгенных культур составил около 3 млрд долларов, в 2005 г. ожидается получение 6 млрд и в 2010 г. — 20 млрд долларов США [2].

На смену известным внедряются новые сорта трансгенных растений, сочетающие устойчивость к вредителям, гербицидам и болезням с повышенным качеством продукции за счет улучшения баланса незаменимых аминокислот, увеличения содержания белков, жиров и углеводов, способные храниться более длительное время без ухудшения качества [3]. Одним из новейших направлений использования трансгенных растений является их применение для фиторемедиации — очистки почв, грунтовых вод от загрязнителей: тяжелых металлов, радионуклидов и других токсичных соединений [4].

Очень перспективным направлением является создание трансгенных растений, несущих гены, кодирующие синтез белков — вакцин против различных болезней. На основании имеющегося экспериментального материала сформулирована концепция использования растений как биореакторов для получения дешевых пероральных и парентеральных вакцин против острых кишечных и респираторных заболеваний (диареи, вызываемой холерной бактерией, гепатита В, малярийного плазмодия, СПИДа и др.) [5].

Суть этой концепции сводится к следующему.

1. Получение трансгенных растений, экспрессирующих структурные гены антигенов. Синтезированные в растениях антигены могут быть использованы либо непосредственно для пероральной вакцинации желудочно-кишечного тракта через употребление плодов и других съедобных органов растений (клубней, корнеплодов, листьев), содержащих антигены, либо для приготовления вакцин при парентеральной иммунизации организма человека или животного.

2. Клонирование генетических детерминант, кодирующих эпитопы антигенов (короткие поли-

пептиды, содержащие активные центры антигенов, но иммунологически неактивные ввиду малого размера). Получение слитых генов на основе ДНК-фрагментов эпитопов и полноразмерных генов (гена) белков (белка) растительных вирусов (например, белка оболочки вируса мозаики табака или вируса мозаики цветной капусты). Увеличение размера эпитопа за счет полипептида вируса придает ему антигенную активность, а нахождение в составе вирусной частицы повышает его устойчивость к перевариванию при пероральной иммунизации. Выделенные из зараженных растений вирусы могут быть также использованы для создания парентеральных вакцин.

Авторы работы [5] считают, что иммунный ответ в желудочно-кишечном тракте достигается за счет соприкосновения антигенов с иммунокомпетентными (лимфоидными) клетками слизистой эпителия кишечника. В результате каскада соответствующих иммунологических реакций в лимфоидных клетках вырабатываются специфические антитела — иммуноглобулины IgA (S-IgA), которые секретируются в кишечник и нейтрализуют токсины (антигены), вырабатываемые микроорганизмами или вирусами, попадающими в организм с зараженной пищей и водой [5].

Вторичные метаболиты растений являются важным источником многих пищевых ингредиентов и лекарственных препаратов. Трансгенные растения успешно используются для достижения повышенного синтеза этих веществ, которые накапливаются в растительных тканях, инфицированных *Agrobacterium rhizogenes*, генерирующей сильно ветвящиеся корневые волоски, и *A. tumefaciens*, генерирующей многочисленные адвентивные побеги. Использование корневых волосков и адвентивных побегов для получения вторичных метаболитов имеет целый ряд преимуществ, поскольку это быстрорастущие культуры, имеющие высокий уровень генетической и биохимической стабильности, и синтез в них вторичных метаболитов осуществляется по тем же метаболическим путям, что и в интактных растениях.

Теперь уже ясно, что существование человечества во многом зависит от развития биотехнологии. Если в 1914 г. население Земли составляло около 1,6 млрд человек, то сейчас численность его достигла примерно 5,8 млрд, а к 2025 г. население Земли, по некоторым прогнозам, составит 8,3 млрд человек [1]. Совершенно очевидно, что для обеспечения продуктами питания такого количества людей требуются новые биотехнологии и получение трансгенных растений является одной из них.

В связи с возрастающим использованием в

практике сельского хозяйства генетически модифицированных растений у людей возникает обеспокоенность по поводу возможного влияния этих растений на здоровье человека и окружающую среду. Эта проблема затрагивает следующие аспекты:

— возможность передачи внесенных в культурные растения признаков их дикорастущим сороричам и, как следствие, неконтролируемое распространение последних в живой природе;

— влияние на здоровье человека, животных и окружающую среду селективных и маркерных генов, кодирующих устойчивость к антибиотикам и некоторым гербицидам, но необходимых для селекции трансгенных растений и расположенных на том же локусе ДНК, что и желаемый внесенный ген;

— угроза человеку, домашним и диким животным вследствие возможной токсичности или аллергенности трансгенных растений и образования в них новых белков или других метаболитов.

Поэтому использование генетически модифицированных растений для производства продуктов питания и других целей должно регулироваться законодательно. Если в США использование продуктов, полученных из генетически модифицированных организмов, разрешено, то в Европе, наоборот, с 1998 г. фактически действует мораторий на применение трансгенов, несмотря на то, что в очереди на регистрацию стоят более ста трансгенных сортов кукурузы, сои и хлопка, полученных в транснациональных компаниях «Монсанто» и «Новартис». В странах Евросоюза принят восьмилетний мораторий на технологии встраивания генов устойчивости к антибиотикам в растительные клетки. В Германии трансгенные растения выращиваются только в экспериментальных целях, решение об их использовании будет вынесено на референдум только в конце этого года. Административный трибунал Парижа обязал правительство Франции обнародовать список всех экспериментальных участков, где выращиваются трансгенные растения. Для тех же генетически модифицированных организмов, которые были зарегистрированы Евросоюзом (а это 14 видов подобной продукции) до моратория, вводятся новые условия маркирования и отслеживания их «от поля — к столу». В Украине, хотя и предпринимались попытки разрешить использование на внутреннем рынке продуктов, полученных из генетически модифицированных организмов, законодательной базы до сих пор нет. Тем не менее, в нашей стране приблизительно с 1997 года проводятся полевые испытания трансгенных растений картофеля, кукурузы, репы.

В представленном обзоре внимание сфокусиро-

вано на решении вопросов обеспечения безопасности использования трансгенных растений.

**Перенос генов.** Перенос генов методами скрещивания растений не интересовал экологов, так как большинство интродуцированных таким образом признаков (карликовость, отсутствие физиологического покоя) были малоадаптивными для дикорастущих сороричей и поэтому не оказывали значительного влияния на окружающую среду. Однако введение с помощью генетической инженерии таких признаков, как фиксация азота, устойчивость к насекомым, гербицидам, болезням и стрессам (холоду, засухе, засоленности почв), является в равной степени полезным и близкородственным диким видам [6]. В литературе недостаточно информации о половой совместимости между сельскохозяйственными культурами и их дикорастущими сороричами. Ясно, что если дикорастущие виды способны опыляться от трансгенных растений, гибридное потомство может представлять большую экологическую опасность.

Например, перенос генов устойчивости к гербицидам от трансгенных к дикорастущим видам позволит им расти и развиваться в присутствии гербицидов, которые предназначены для уничтожения этих сорняков, что существенно затруднит борьбу с сорняками. Такое гибридное потомство может приобрести свойство повышенной семенной продуктивности или способности конкурировать с другими растениями [7].

Степень переноса генов к дикорастущей популяции зависит от ряда факторов: сельскохозяйственные виды и их дикорастущие сороричи должны иметь половую совместимость; должны расти в одном месте и цвести в одно и то же время; и, наконец, они должны обладать способностью переноса пыльцы от растения к растению. Первые два фактора особенно важны [8].

Так, трансгенный *Raphanus sativus L.*, опыляемый насекомыми, использовали для исследования переноса генетического материала от участка, где культивировался сорт Round White, к участкам с дикорастущими видами на расстоянии от 1 до 10 км. Round White был гомозиготным по лейциновой антипептидазе (Lapb), отсутствующей в естественной популяции. Наличие гетерозиготности для Lapb, определяемое окрашиванием семян, служило для определения переноса генов от Round White к естественной популяции. Степень гибридизации для близлежащей дикорастущей популяции (1 м) составляла от 14 до 100 % и значительно уменьшалась с увеличением расстояния. Некоторые гибриды, содержащие маркерный ген, были обнаружены даже на расстоянии более 1 км [6].

Данные полевых испытаний картофеля с использованием устойчивости к канамицину в качестве маркера показали 24 % случаев перекрестного опыления между близкорастущими растениями картофеля, 0,017 % — при увеличении расстояния до 10 м и полное отсутствие случаев перекрестного опыления на расстоянии 20 м [7].

При исследовании частоты переноса гена *bar* (устойчивость к гербициду фосфинотрицину) участки почвы диаметром 9 м были засеяны трансгенным рапсом, окруженным гектаром обычных растений. Для улучшения перекрестного опыления в поле выставили ульи с пчелами. Семена собирали на расстоянии 1, 3, 12 и 47 м от участка с трансгенными растениями и в потомстве определяли наличие гибридных растений. Частота перекрестного опыления составила 1,4 % на расстоянии 1 м, 0,4 % — на расстоянии 3 м, 0,02 % — 12 м и 0,00034 % (3 гибрида на 1 млн растений) на расстоянии 47 м [9].

Эти и другие результаты указывают на невозможность полной гарантии того, что пыльцевые зерна одного растения не будут опылять другое на больших расстояниях, особенно у перекрестно опыляемых видов. Следовательно, требуются другие подходы для предотвращения межпопуляционного опыления и распространения модифицированных генов.

В настоящее время большинство генетиков и биотехнологов считают, что обмен генами между трансгенными растениями и родственными им культурными и дикорастущими видами не представляет большой угрозы для окружающей среды. Тем не менее, предпринимаются попытки разработать подходы, полностью исключающие такой перенос генов. Одним из способов решения этой проблемы является создание растений с мужской стерильностью, в которых пыльца не созревает или она полностью инактивирована [10]. Однако такой метод ограничен небольшим количеством видов сельскохозяйственных растений, у которых обнаружена ЦМС-форма (цитоплазматическая мужская стерильность), у остальных же она либо отсутствует, либо при ее наличии отсутствуют ядерные гены-восстановители. Альтернативным подходом является внесение желаемых генов в хлоропластный геном [11]. Для подавляющего большинства видов культурных растений хлоропласты наследуются строго по материнской линии и, таким образом, чужеродные гены не будут передаваться с пыльцой.

Одним из преимуществ введения генов в хлоропластный геном является очень высокий уровень экспрессии трансдуцированных генов, что связано

с большим количеством копий хлоропластного генома в клетке — 5—10 тыс. и высокой эффективностью работы аппаратов транскрипции и трансляции при встраивании прокариотических генов в прокариотический по своей природе хлоропластный геном. При трансформации геном *cryA(c)* *Bacillus thuringiensis* количество продукта его экспрессии достигало 3—5 % от растворимых белков в листьях табака. При самоопылении этих растений и проращивании полученных семян на среде с гербицидом все прорастающие растения были гомопластными, т. е. имели только трансформированные хлоропласты [12].

Другие подходы, препятствующие переносу генов между трансгенными растениями и их близкородственными дикорастущими видами, включают: удаление цветков с трансгенных растений, пространственную изоляцию видов с половой совместимостью, обсев посевов трансгенного сорта буферными нетрансгенными культурами того же сорта [13]. Экологический риск в этом случае можно сравнить с таковым при испытании новых селекционных сортов. Все продукты метаболизма, появляющиеся в трансгенных растениях, уже существуют в природе. Все дело лишь в скорости появления этих признаков у растений: то, что в природе происходит за тысячелетия, ученые могут осуществить за считанные годы.

Перенос Т-ДНК в растительный геном при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации является процессом случайным. Многие исследования показали, что при трансформации с использованием *A. rhizogenes* разное число копий и размеров Т-ДНК *Ri*-плазмиды встраивается в разные хромосомные локусы. И до настоящего времени не существует способа предсказать или проконтролировать количество копий, размер или сайт инсерции Т-ДНК.

Эта неопределенность порождает беспокойство о последствиях, таких как инактивация функциональных генов, активация молчащих генов и других непреднамеренных изменениях растительного генома, которые возможны в результате спонтанного мутагенеза. Инактивация функциональных генов может иметь последствия для нормального метаболизма хозяйской клетки и в конечном итоге привести к появлению необычного продукта. Активация молчащих генов может стать причиной биосинтеза в клетках растений метаболитов, токсичных или аллергенных для человека.

В литературном обзоре Реденбау с соавт., касающемся этой проблемы [14], авторы высказывают мысль о том, что вероятность инактивации генов вследствие инсерции Т-ДНК очень мала для

наиболее распространенных сельскохозяйственных культур, хотя это явление было обнаружено в *A. thaliana*. Но поскольку семейство растительных функциональных генов содержит множество повторов, появление измененного фенотипа, возникающего вследствие инактивации единичного гена, маловероятно.

Возможность активации молчащих генов в результате инсерции Т-ДНК определить весьма трудно, так как сложно выявить неизвестный ген. Наиболее часто инсерция Т-ДНК происходит в транскрипционно активные участки растительного генома, поэтому вероятность активации молчащих генов, которая привела бы к синтезу нежелательных компонентов, может быть очень незначительной [15].

**Селективные гены.** Гены устойчивости к антибиотикам обычно используют как селективные маркеры для отбора трансгенных растений в процессе их регенерации. Многие ученые обеспокоены тем, что полезные гены интродуцируются в растения в комбинации с такими маркерными генами. В связи с этим существует угроза, что гены устойчивости к гербицидам или антибиотикам могут быть перенесены к сорнякам, патогенным бактериям, вследствие чего изменится нормальная физиология последних или будут генерированы непредсказуемые изменения фенотипа, в результате которых возникнет новая, агрессивная популяция [16].

Маркерные гены используются для того, чтобы отличить трансгенные растения от нетрансгенных простым тестированием. Благодаря им селекционеры имеют точные и чувствительные методы для мониторинга интродуцированных генов в модифицированных растениях и поэтому маркерные гены очень важны при тестировании генетически модифицированных растений. Наиболее часто используемым селективным маркерным геном является ген из транспозона 5 (Тп5) *Escherichia coli* K12, кодирующий аминогликозид-3-фосфотрансферазу II (APH(3)II). Этот фермент, широко известный как неомифосфотрансфераза II (NPT II), инактивирует канамицин и неомифин, фосфорилируя их [17].

Проведенные исследования показали, что ген *npt II* нетоксичен для человека и других организмов [18]. При скормлении крысам томатов с *npt II* геном у них не было обнаружено никаких нарушений. Эксперименты по генной терапии, проведенные на людях с клетками, содержащими *npt II* ген, также не показали никаких неблагоприятных влияний, обусловленных маркерным геном [19]. Канамицин и неомифин, применяемые орально как антибиотики, не инактивируются NPT II

ферментом, поскольку как белок, не содержащий необычных аминокислот, он быстро расщепляется и инактивируется. Бактерии в кишечнике человека уже резистентны к канамицину и неомифину из-за широкого использования этих антибиотиков как лекарственных препаратов. Даже если ДНК, несущая ген устойчивости к канамицину, останется недеградированной в желудке и будет трансформирована в патогенную бактерию, это будет неопасно, так как там уже существуют почти  $10^{12}$  бактерий, устойчивых к канамицину или неомифину [20]. Канамициновые и неомифиновые гены широко распространены среди бактерий в почве, так что посев сельскохозяйственных культур с геном, устойчивым к канамицину, незначительно увеличит количество таких генов в почве, даже с учетом переноса этих генов от растений к бактериям. Перенос канамицинового гена от одних сельскохозяйственных культур к другим родственным растениям путем опыления не вызывает каких-нибудь изменений, отличных от тех, что спонтанно возникают в самих сельскохозяйственных культурах [18].

**Безмаркерные трансгенные растения.** Несмотря на приведенные выше данные, использование в практике сельского хозяйства маркерных генов все же вызывает беспокойство. Их трудно удалить, так как они интродуцированы в геном в тот же участок ДНК, что и гены, сообщающие полезные свойства растению. В результате два гена так прочно связаны, что маркер невозможно вывести изолированно без сцепленного с ним гена [21]. А в составе трансгенных растений они создают три главные проблемы:

- селективный агент имеет негативное влияние на пролиферацию и дифференциацию растительных клеток;

- остается неясным влияние многих селективных маркерных генов на окружающую среду;

- трудно осуществить повторную трансформацию с использованием одних и тех же маркерных генов при создании пирамиды желаемых генов.

К настоящему времени в мире создано большое количество трансгенных растений, проходящих полевые испытания во многих странах. Все эти растения наряду с интересующим геном содержат селективные маркерные гены. Некоторые из них вышли на рынок. Поэтому получение трансгенных растений, лишенных селективных маркеров, является важной задачей как для растительной биотехнологии, так и для коммерческих целей. Безмаркерные трансгенные растения имеют два ключевых преимущества. Во-первых, они более безопасны для потребителя и окружающей среды. Отсутствие мар-

керных генов значит, что перенос генов устойчивости к гербицидам к диким сорочичам или генов устойчивости к антибиотикам — к почвенным бактериям в этом случае не является угрозой. Вторым преимуществом растений с удаленными маркерными генами является возможность ретрансформации трансформированных растительных тканей с помощью того же исходного маркера [22]. Хотя и показана возможность ретрансформации трансгенных растений с использованием различных селективных маркеров, однако их количество, доступное для трансформации растений, ограничено.

Для производства безмаркерных растений было предложено несколько методов [16, 23—27]. Во-первых, это вырезание селективной маркерной последовательности посредством *cre/lox* рекомбинации [26—30]. Фермент, полученный из бактериального вируса, известный как *cre* (control of recombination), аккуратно вырезает любую ДНК, помещенную между парой идентичных последовательностей размером 34 пары оснований, названной «*lox*» (locus of crossing over). Пока эта техника продемонстрирована только на табаке, но, вероятно, найдет применение и на других культурах. Во-вторых, это использование альтернативных селективных маркеров, кодирующих белки устойчивости к гербицидам [31, 32] или вызывающие изменение метаболизма растений [33, 34].

Для удаления селективных маркерных генов и других вспомогательных последовательностей разработаны также новые серии трансформационных векторов, содержащих транспозируемые элементы (ТЭ) [22]. Многие ТЭ кукурузы сохраняют свою транспозиционную компетентность при переносе в другие растительные виды [35]. Среди ТЭ кукурузы наиболее полно описаны два семейства — *Ac/Ds* и *Spm/dSpm*. Автономный *Ac* элемент имеет две функции: транспозазную (ответственную за миграцию сегмента ДНК) и функцию встраивания, которую обеспечивают инвертированные концевые повторы. *Ds* элементы лишены транспозазной активности и мигрируют только в том случае, если где-либо в геноме присутствует копия *Ac*. Важно, что последовательности, клонированные между инвертированными повторами *Ds* элемента, также попадают в новое геномное окружение в присутствии транспозазного гена [36]. На основе этих наблюдений и были созданы два типа векторов для удаления селективных маркеров. В векторе первого типа интересующий исследователей ген вставлен между инвертированными повторами *Ds*, тогда как во второго — *Ds* повторами фланкирован селективный маркерный ген. В присутствии активной транспозазы, которая может быть интродуцирована

в растение как добавочный компонент Т-ДНК либо повторной трансформацией, либо скрещиванием с растением, содержащим транспозазу, *Ds* элемент будет перемещаться в новое геномное окружение. Почти в 90 % случаев *Ds* элемент, несущий желаемый ген или селективный маркерный ген, будет претерпевать реинсерцию, и около половины этих вставок не будут генетически связаны с начальным сайтом. Результатом рекомбинации между начальным и новым сайтом инсерции является потомство растений, в которых разделены наличие/отсутствие *Ds*-элемента и наличие/отсутствие остаточных интегрированных Т-ДНК (включая иногда транспозазный ген). В этом случае могут регенерировать растения, содержащие стабильный трансген либо во внутренней по отношению к *Ds* последовательности (тип 1), либо привязанный к Т-ДНК (тип 2), и в которых селективный маркерный ген элиминирован. Преимущество системы 1-го типа, где желаемый ген помещен в пределах *Ds* элемента, состоит в том, что вследствие перемещения трансгена могут быть достигнуты различные уровни экспрессии — как качественные, так и количественные [22]. Подобное изменение в характере экспрессии, вызванное местом вставки транспозируемого элемента, назвали позиционным эффектом. Опосредованное транспозоном внутригеномное перемещение трансгена является полезным альтернативу многочисленным независимым трансформациям для достижения оптимальной экспрессии трансгена, особенно для видов, где трансформация затруднительна.

Преимущество векторной системы типа 2 заключается в том, что при конструировании вектора сохраняется минимальное количество векторной последовательности. Например, если конструкция содержит только существенные для трансформации повторяющиеся последовательности Т-ДНК размером 25 п. н., то когда селективный маркер удален через транспозицию *Ds*, в растении будет оставаться только желаемый ген, фланкированный остатками прямых повторов. Второе преимущество состоит в том, что селективный маркер будет теряться в некотором проценте соматических тканей в случае отсутствия реинсерции *Ds* элемента, что делает эту стратегию применимой для удаления маркера из вегетативно размножающихся видов, таких как виноград, хризантемы, картофель, клубника и пр.

Разрабатываются и другие системы, позволяющие элиминировать маркерные гены из трансгенных растений, в частности, котрансформация с помощью двух отдельных ДНК. Одна из них инкорпорирует желаемый ген, а другая — селективный маркерный ген, что может представлять про-

стую систему для удаления маркерных генов при соблюдении двух условий: эффективность котрансформации должна быть относительно высокой и котрансформированные ДНК должны встраиваться в геномные участки, достаточно отдаленные друг от друга, чтобы позволить эффективную регенерацию рекомбинантов [37]. В растениях, в которых трансгены включены в существенно отдаленные локусы, желаемый ген может быть отделен от селективного маркерного гена в следующем поколении. Котрансформацию можно осуществить с использованием одной плазмиды с многочисленными ДНК [23] или отдельными плазмидами с различными ДНК, которые содержатся либо в одном [38], либо в нескольких агробактериальных штаммах [23, 37]. Частота, с которой трансгены независимо разделяются, определяется их положением в растительном геноме относительно друг друга.

Некоторые исследователи предположили, что тип использованного агробактериального штамма обуславливает расположение молекул Т-ДНК в растительном геноме: нопалиновые штаммы агробактерии способствуют включению многочисленных молекул Т-ДНК в генетически связанные локусы, тогда как октопиновые штаммы *A. tumefaciens* способствуют интеграции ДНК в несвязанные локусы [37]. Авторы получили независимое разделение трансгенов в потомстве 22 % котрансформированных растений при использовании нопалиновых штаммов. Трансгены из различных октопиновых штаммов были не связаны в потомстве каждого из трех полученных котрансформированных растений [39]. Комери с соавт. [23] обнаружили, что более 50 % котрансформантов независимо разделялись на трансгены при участии единичного октопинового агробактериального штамма. С использованием октопинового штамма было также показано [24], что в потомстве почти половины котрансформантов происходило независимое разделение трансгенов. Скрининг дополнительного потомства увеличивает процент линий, классифицированных как независимо сегрегирующие по обоим трансгенам, особенно в котрансформированных линиях с многочисленными вставками одного или обоих генов.

Результаты, полученные двуплазмидным/одноштаммовым методом [24], показывают, что для выделения каждой безмаркерной линии потребовалось бы в четыре раза больше трансгенных растений, половина из которых должна была бы расти до полного созревания по сравнению с экспериментом, не требующим элиминации селективного маркерного гена. Это предположение основано на данных по частоте трансформации и независимой

сегрегации, составляющей приблизительно 50 %. Частота сегрегации может быть обусловлена соотношением растений, имеющих генные вставки в единичных против многочисленных локусов.

Присутствие маркерного гена, связанного с геном, интересующим исследователей, позволяет проводить селекцию растений, содержащих желаемый ген, непосредственно во время регенерации, исключая поддержание и анализ растений, не содержащих желаемого гена. Но так как маркерные гены удаляются из растений, для идентификации трансгенных организмов необходимо либо изменение фенотипа, вызванное желаемым геном, либо идентификация самого этого гена. Если последний не вызывает легко узнаваемого изменения фенотипа, что характерно для маркерных генов, то анализ разделения трансгенов в популяции становится более дорогостоящим и требующим дополнительного времени.

Ген *npt II*, как уже отмечалось, широко используется для производства генетических трансформантов. Безопасность устойчивости к канамицину как селективному маркеру была многократно доказана [14, 18, 19, 40]. Однако производство безмаркерных растительных линий делает очевидной необходимость работ с дополнительными маркерными генами и подразумевает последовательную утилизацию тех же селективных маркеров.

Для интродукции дополнительных трансгенов, кодирующих другие желаемые свойства, используется последовательная трансформация [40, 41]. Ретрансформация может быть полезна, когда размер плазмиды или количество уникальных сайтов рестрикции зависят от количества генетической информации, переносимой в рамках участка Т-ДНК.

Ограниченное количество маркерных генов, адаптированных для экспрессии в растениях, может обуславливать использование ретрансформации растительных линий, которые уже содержат маркерный ген. Безмаркерные трансгенные растительные линии позволяют повторное использование селективных маркерных генов, хорошо работающих в растительной системе. Возможность повторного использования селективных маркерных генов могла бы быть особенно полезна при ретрансформации видов, которые трудно трансформировать или регенерировать и в которых работают лишь немногие маркеры.

Каждая система для получения безмаркерных растений имеет свои преимущества и недостатки. Критериями, принимаемыми во внимание при оценке той или иной системы, являются частота, время, требуемое для получения безмаркерных

растений, легкость, с которой трансгены могут быть клонированы в векторы, количество генов, переносимое в растение одновременно, и кратность использования данной системы для последовательных трансформаций. Котрансформация как метод для удаления маркерного гена не требует поиска и дополнительного применения селективных маркерных генов или систем вырезания ДНК. Пока неясно, одно- или двуштаммовый метод обеспечивает наивысшую частоту получения безмаркерных растений. Комари с соавт. [23] сравнивали одно- и двуштаммовый методы, используя одинаковые виды, способы трансформации и одинаковые плазмиды, и получили намного высшую частоту котрансформации при сходной частоте несвязанных вставок с использованием одноштаммового метода. Однако, применяя двуштаммовый метод, другая группа исследователей [37] выявила похожую частоту котрансформации, но намного низшую частоту несвязанных вставок. Трудно представить, что они могли бы получить безмаркерные растения в рамках, сравнимых с одноштаммовой системой, если бы использовали октопиновый штамм вместо нопалинового. К тому же Комари и соавт. обнаружили, что двуштаммовым методом можно выделить больше трансформантов, в потомстве которых обнаруживалось неменделевское расщепление интродуцированных генов, чем при одноштаммовом методе. Обе группы работали с различными растениями, штаммами и плазмидами и сравнение методов может зависеть от этих факторов.

Другим фактором, помогающим оценить системы, является легкость клонирования трансгенов. Если желаемые и маркерные гены расположены на различных плаزمиде, дополнительные гены могут быть клонированы в неселектируемую T-ДНК плазмиду более легко. Использование двух плазмид в одном октопиновом штамме приводит к появлению желаемых свойств: простоте, легкости клонирования, высокой частоте котрансформации, высокой частоте несвязанной интеграции, умеренному времени для получения трансгенных растений и неограниченному использованию для ретрансформации. Однако, как и два предыдущих метода получения безмаркерных растений (*cre/lox* рекомбинация и система транспозиремых элементов), этот метод требует полового скрещивания для отделения селективного маркерного гена от желаемого гена и, следовательно, не может быть применен к древесным растениям, растениям с вегетативным размножением и стерильным растениям. Поэтому была разработана новая система для получения безмаркерных растений, так называемая «MAT-vector system» (multi-autotransformation) [43].

Первой стадией такой системы является визуальная селекция морфологически аномальных трансгенных побегов, *ipt-shooty*, потерявших апикальное доминирование и способность к укоренению. На второй стадии удаляется ген изопентенилтрансферазы *ipt* и регенерируют безмаркерные трансгенные растения, свободные от влияния этого гена. Ген *ipt* является одним из индуцирующих опухоли генов *A. tumefaciens*, кодирующих изопентенилтрансферазу и вовлеченных в синтез цитокининов в растительных клетках [44, 45]. Химерные *ipt* гены с различными промоторами были интродуцированы в растения для исследования влияния цитокининов на дифференциацию и пролиферацию растительных клеток [46]. Усиленная экспрессия *ipt* гена приводит к значительному увеличению уровня эндогенных цитокининов и появлению чрезмерно кустистого (*shooty*) фенотипа, *ipt-shooty*, в котором утрачены апикальное доминирование и способность к укоренению. Фенотипически нормальные побеги возникают из *ipt-shooty* в результате потери *ipt* гена, вырезаемого транспозиремым *Ac*-элементом кукурузы [43]. Однако частота получения безмаркерных трансгенных растений с использованием этой системы была очень низкой, так как наиболее модифицированные транспозиремые элементы, содержащие *ipt* ген, подвергались реинсерции в других участках генома вскоре после вырезания. И только клетки с транспозиционными ошибками генерировали бы фенотипически нормальные трансгенные побеги. Поэтому в новом практическом MAT-векторе [43, 47] для удаления *ipt* гена *Ac*-элемент был заменен сайт-специфической рекомбинационной системой *R/RS* из *Zygosaccharomyces rouxii* [48]. *R/RS* и другие сайт-специфические рекомбинационные системы опосредуют вырезание фрагмента ДНК между двумя прямо ориентированными сайтами рекомбинации в растительных клетках [49—51]. Систему *R/RS*, содержащую рекомбинационный ген *R* и две последовательности *RS* сайта рекомбинации, изолировали из кольцевой плазмиды *pSR1 Z. rouxii*.

Согласно предыдущим сообщениям, система *R/RS* может индуцировать хромосомные перестройки, вырезание фрагмента размером около 180 тыс. п. н. и хромосомные транслокации в *Saccharomyces cerevisiae* [52]. Регулирование удаления *ipt* гена системой вырезания *R/RS* может улучшить эффективность получения низкокопийных линий, для которых характерно отсутствие нежелательных рекомбинаций при ретрансформации с помощью MAT-векторов. При использовании сайт-специфической рекомбинационной системы один сайт рекомбинации остается в хромосомной

ДНК после вырезания. Между этим сайтом и другими сайтами, интродуцированными при повторной трансформации, могут случаться хромосомные перестройки.

Безмаркерные трансгенные растения, получаемые с использованием *R/RS* системы для удаления *ipt* кассеты, имели более трех копий Т-ДНК, тогда как МАТ-вектор с *Ac*-элементом генерирует низкокопийные безмаркерные растения. Это свидетельствует о том, что *R/RS* система, управляемая 35S промотором, более активна, чем *Ac*. С другой стороны, половина безмаркерных растений, возникающих из умеренных *ipt-shooty*, и два безмаркерных растения, развивающихся непосредственно из адвентивных почек, имели одну или две копии. Из этого следует, что более эффективная система вырезания может уменьшить пропорцию безмаркерных растений, содержащих низкокопийную Т-ДНК, за счет постоянной экспрессии рекомбиназы, вызывающей вырезание и элиминирование *ipt* гена на ранней стадии развития побега. Частота возникновения *ipt-shooty* эксплантов с одной копией Т-ДНК могла быть редуцирована, и *ipt-shooty* фенотип мог не развиваться из клеток, содержащих однокопийную вставку Т-ДНК.

Чтобы избежать подобного явления, были испробованы другие МАТ-векторы, где *R* рекомбиназа экспрессировалась под контролем индуцибельного промотора [53—55]. Новый, усовершенствованный МАТ-вектор — GST-МАТ — содержит химически индуцируемый гербицидным антидотом «Safener» в трансгенных растениях промотор глутатион-S-трансферазного гена (GST-II-27) кукурузы [56]. GST-МАТ-вектор увеличивает эффективность образования *ipt-shooty* фенотипа и генерацию безмаркерных растений табака, содержащих низкокопийные вставки Т-ДНК. Инсерция единичного гена может быть преимуществом для стабильной экспрессии гена, так как было обнаружено, что многокопийные трансгены более подвержены генной инактивации, чем однокопийные [57, 58]. Этот вектор также эффективен при экспрессии *R* рекомбиназы для вырезания *ipt* гена [53]. Хотя его использовали в бинарной векторной системе с инфицированием *Agrobacterium* [53], он также может быть использован при прямом переносе генов для получения трансгенных растений, содержащих одну копию трансгена, поскольку прямые методы трансформации иногда вызывают многочисленные вставки трансгенов. Кроме GST-II-27 промотора, для регуляции *R/RS* системы можно применять и другие индуцибельные промоторы [59—61].

Существует опасение, что трансгенные растения способны измениться таким образом, что ста-

нут токсичными или аллергенными для человека или животных. Но даже теоретически трудно представить, что введение одного или нескольких генов в высший эукариотический организм, геном которого состоит из десятков тысяч генов, так изменит его метаболизм, что это растение станет синтезировать какие-либо токсичные соединения, не связанные с экспрессией введенного гена. Однако получаемые трансгенные растения в каждом конкретном случае введения в них нового гена должны проходить серьезные испытания по изучению продуктов метаболизма, кодируемых вносимым геном. Только после этого трансгенные растения можно проверять в полевых условиях.

Тщательно изучив проблему возможного влияния трансгенных растений на окружающую среду, Национальная Академия Наук США сделала заключение, которого в настоящее время придерживаются многие ученые. Суть его в следующем:

— нет доказательств существования риска ни в использовании техники получения рекомбинантной ДНК, ни в переносе генов между неродственными организмами;

— риск, связанный с интродукцией генетически модифицированных организмов, является таким же, как и риск, связанный с интродукцией немодифицированных организмов и организмов, модифицированных другими методами;

— оценка риска интродукции в окружающую среду организмов, модифицированных рекомбинантными ДНК, должна быть основана на природе организмов и окружения, а не на методах, которыми они были получены [32].

Тем не менее, ввиду ожидаемого дальнейшего прогресса в интродукции трансгенных растений, о чем упоминалось выше, не следует пренебрегать следующими предосторожностями:

— за исключением гена *npt II*, необходимы доказательства, того, что и другие селективные агенты и используемые маркерные гены не влияют на здоровье человека и окружающую среду, в противном случае должны быть применены «трансгенные ножницы»;

— для определения наиболее эффективной стратегии предотвращения распространения сконструированных генов на близкородственные дикорастущие виды должны быть критически оценены повторные полевые испытания, прежде чем будет выдано разрешение на регистрацию;

— уровни экспрессии между различными трансгенными растениями могут значительно варьировать. Поэтому нужны ранние полевые оценки трансгенных растений для отбора растений с желаемыми уровнями экспрессии трансгена, которые не

оказывают вредного влияния на культурные растения и не имеют (или имеют) минимальных соматоклональных вариаций.

A. P. Galkin, T. V. Medvedeva, L. G. Liozhina, O. V. Bulko, V. P. Kukhar

Transgenic plants: pro and contra

Summary

The review is focused on the problems of extensive application of transgenic plants in the agricultural industry, namely, transfer of genes to plants; possible influence of selective and marker genes, introduced into plants together with a gene of interest, on the environment. The promising approaches to solve these problems are discussed.

A. П. Галкін, Т. В. Медведєва, Л. Г. Льошина, О. В. Булко, В. П. Кухар

Трансгенні рослини: за і проти

Резюме

В огляді розглядаються питання, пов'язані з широким впровадженням трансгенних рослин в сільськогосподарське виробництво, а саме: перенесення генів; можливий вплив на довкілля селективних і маркерних генів, що вводяться в рослину разом з бажаним геном; способи отримання безмаркерних рослин; проблеми, які при цьому виникають, та можливі шляхи їхнього вирішення.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левенко Б. А. Биотехнология растений: сегодня и завтра // Физиология и биохимия культ. растений.—1999.—31, № 3.—С. 163—172.
2. Глеба Ю. Ю. Биотехнология растений // Тез. докл. VII Междунар. конф. «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда» (25—28 ноября 1997).—М., 1997.—С. 6—7.
3. Левенко Б. А. Перенос генов и проблемы трансгенных растений // Физиология и биохимия культ. растений.—1998.—30, № 2.—С. 83—111.
4. Galkin A. P., Bulko O. V., Liozhina L. G., Medvedeva T. V. Clean-up of contaminated lands from heavy metals using transgenic plants // Proc. 5th Int. Symp. «*In Situ and on-site bioremediation*».—New-Orlean, 1997.—Vol. 3.—P. 325—329.
5. Mason H. S., Arntzen C. J. Transgenic plants as vaccine production systems // Trends Biotechnol.—1995.—13.—P. 388—392.
6. Ellstrand N. C. Pollen as a vehicle for escape of engineered genes // Trends Biotechnol.—1988.—6.—P. 30—32.
7. Dale P. J. Spread of engineered genes to wild relatives // Plant Physiol.—1992.—100.—P. 13—15.
8. Kerlan M. C., Chevre A. M., Eber F., Botterman J., Degree W. Risk assessment of gene transfer from transgenic rapeseed to wild species in optimal conditions // Rapeseed in a Changing World / Ed A. McGregor.—Sasketon, 1991.—Vol. 4.—P. 1028—1033.
9. Crawley M. J., Hails R. S., Rees M. et al. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats // Nature.—1993.—363, N 6430.—P. 620—623.
10. Hernould M., Suharsono S., Litvak S., Araya A., Mouras A. Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited *atp9* mitochondrial gene from wheat // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90.—P. 2370—2374.
11. Maliga K. Towards plastid transformation in the flowering plants // Trends Biotechnol.—1993.—11.—P. 101—106.
12. McBride K. E., Schaaf D. J., Daley M., Stalker D. M. Controlled expression of plastid transgenes in plants based on a nuclear DNA-encoded and plastid-targeted T7 RNA polymerase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1994.—91.—P. 7301—7305.
13. Sawahel W. A. Transgenic plants: performance, release and containment // World J. Microbiol. and Biotechnol.—1994.—10.—P. 139—144.
14. Redenbaugh K., Hiatt W., Martineau B., Emlay D. Determination of the safety of genetically engineered crops // Genetically modified foods: safety issues / Eds Kh. Engel, G. Takeoka., R. Teranishi.—Washington: D. C., 1995.—P. 72—87.
15. Tong-Jen Fu. Safety considerations for food ingredients produced by plant cell and tissue culture // CHEMTECH.—1998.—28, N 1.—P. 40—46.
16. Yoder J. I., Goldsbrough A. P. Transformation system for generation marker-free transgenic plants // Biotechnology.—1994.—12.—P. 263—267.
17. Jefferson R. A. The GUS reporter gene system // Nature.—1989.—342.—P. 837—838.
18. Flavell R. B., Dart E., Fuchs R. L., Fraley R. L. Selectable marker genes: safe for plants // Bio/Technology.—1992.—10.—P. 141—144.
19. Calgene Inc. Request for advisory opinion — Kanamycin resistant gene-safety and use in the production of genetically engineered plants // FDA Docket Number 90A-0416.—1990.
20. Calgene Inc. Request for advisory opinion — FLAVAR-SAVRRM tomato: status as food // FDA Docket Number 91A-0330.—1991.
21. Moffat A. S. Excess genetic baggage dumped // Science.—1991.—255.—P. 1457.
22. Goldsbrough A. P., Lastrella C. N., Yoder J. L. Transposition mediated re-positioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato // Bio/Technology.—1993.—11.—P. 1286—1292.
23. Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N., Kumashiro T. Vector carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers // Plant J.—1996.—10.—P. 165—174.
24. Daley M., Knauft V. C., Summerfelt K. R., Turner J. C. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants // Plant Cell Repts.—1998.—17.—P. 489—496.
25. Daniell H., Muthukumar B., Lee S. B. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome with the use of antibiotic selection // Curr. Genet.—2001.—39, N 2.—P. 109—116.
26. Zhang C. L., Chen D. F., McCormac A. C., Scott N. W., Elliot M. C., Slater A. Use of the GFP reporter as vital marker for *Agrobacterium*-mediated transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Mol. Biotechnol.—2001.—17, N 2.—P. 109—117.
27. Jamtham S., Day A. Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids // Nat. Biotechnol.—2000.—18, N 11.—P. 1172—1176.
28. Dale E. C., Ow D. W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 10558—10562.
29. Corneille S., Lutz K., Syab Z., Maliga P. Efficient elimination of selectable marker genes from the plastid genome by the CRE-lox site-specific recombination system // Plant J.—2001.—27, N 2.—P. 171—178.

30. Hajdukiewicz P. T., Gilbertson L., Staub J. M. Multiple pathways for Cre/lox-mediated recombination in plastids // *Plant J.*—2001.—27, N 2.—P. 161—170.
31. Buchanan-Wollaston V., Snape A., Cannon F. A plant selectable marker gene based on the detoxification of the herbicide dalapon // *Plant Cell Repts.*—1992.—11.—P. 627—631.
32. Tourneur C., Jouanin L., Vaucheret H. Over-expression of acetolactate synthase confers resistance to valine in transgenic tobacco // *Plant Sci.*—1992.—88.—P. 159—168.
33. Perl A., Galili S., Shaul O., Ben-Tzvi I., Galili G. Bacterial dihydrodipicolinate synthase and desensitized aspartate kinase: two novel selectable markers for plant transformation // *Bio/Technology.*—1993.—11.—P. 715—718.
34. Ratinasabapathi B., McCue K. F., Gage D. A., Hanson A. D. Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenases lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance // *Planta.*—1994.—193.—P. 155—162.
35. Yoder J. I., Palys J., Alpert K., Lassner M. Ac transposition in transgenic tomato plants // *Mol. and Gen. Genet.*—1988.—213.—P. 291—296.
36. Masterson R. V., Furtak D. B., Greveling C., Schell J. A maize Ds transposable element containing a dihydrofolate reductase gene transposes in *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* // *Mol. and Gen. Genet.*—1989.—219.—P. 461—466.
37. DeBlock M., Debrouwer D. Two T-DNAs co-transformed into *Brassica napus* by a double *Agrobacterium* infection are mainly integrated at the same locus // *TAG.*—1991.—82.—P. 257—263.
38. de Fromond A. J., Back E. W., Chilton W. S., Kayes L., Chilton M.-D. Two unlinked T-DNAs can transform the same tobacco plant cell and segregate in the F1 generation // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—202.—P. 125—131.
39. McKnight T. D., Lillis M. T., Simpson R. B. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains // *Plant. Mol. Biol.*—1987.—8.—P. 439—445.
40. FDA. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption; food additives permitted in feed and drinking water of animals; aminoglycoside 3'-phosphotransferase II; final rule // *Fed. Reg.*—1994.—59.—P. 26700—26711.
41. Matzke M. A., Primig M., Trnovsky J., Matzke A. J. M. Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants // *EMBO J.*—1989.—8.—P. 643—649.
42. Fujiwara T., Lessard P. A., Beachy R. N. Inactivation of the nopaline synthase gene by double transformation: reactivation by segregation of the induced DNA // *Plant Cell Repts.*—1993.—12.—P. 133—138.
43. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamakado M. Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene as a selectable marker // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 2117—2121.
44. Akioshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gordon M. P. T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81.—P. 5994—5998.
45. Barry G. F., Rogers S. G., Fraley R. T., Brand L. Identification of a cloned cytokinin biosynthetic gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1984.—81.—P. 4776—4780.
46. Brzobohaty B., Moore I., Palm K. Cytokinin metabolism: implication of plant growth and development // *Plant Mol. Biol.*—1994.—26.—P. 1483—1497.
47. Sugita K., Matsunaga E., Ebinuma H. Effective selection system for generating marker-free transgenic plants independent of sexual crossing // *Plant Cell Repts.*—1999.—18.—P. 941—947.
48. Araki H., Jearnpipatkul A., Tatsumi H., Sakurai T., Ushino K., Muta T., Oshima Y. Molecular and functional organization of yeast plasmid *pSRI* // *J. Mol. Biol.*—1987.—182.—P. 191—203.
49. Russel S. H., Hoopes J. L., Odell J. T. Directed excision of a transgene from the plant genome // *Mol. and Gen. Genet.*—1992.—234.—P. 49—59.
50. Qin M., Bayley C., Stockton T., Ow D. W. Cre recombinase-mediated site-specific recombination between plant chromosomes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 1706—1710.
51. Onouchi H., Nishihama R., Kudo M., Machida Y., Machida C. Visualization of site-specific recombination catalyzed by a recombinase from *Zygosaccharomyces rouxii* in *Arabidopsis thaliana* // *Mol. and Gen. Genet.*—1995.—247.—P. 653—660.
52. Matsuzaki H., Nakajima R., Nishiyama J., Araki H., Oshima Y. Chromosome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid // *J. Bacteriol.*—1990.—172.—P. 610—618.
53. Sugita K., Kasahara T., Matsunaga E., Ebinuma H. A transformation vector for the production of marker-free transgenic plants containing a single copy transgene at high frequency // *Plant J.*—2000.—22.—P. 461—469.
54. Zuo J., Niu Q. W., Moller S. G., Chua N. H. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants // *Nat. Biotechnol.*—2001.—19, N 2.—P. 157—161.
55. Zuo J., Chua N. H. Chemical-inducible system for regulated expression of plant genes // *Curr. Opin. Biotechnol.*—2000.—11, N 2.—P. 146—151.
56. Pat. USA no. WO 9301294. Plant-derived enzyme and DNA sequences, and uses thereof / I. G. Bridges, S. W. J. Bright, A. J. Greenland, D. C. Holt, I. Jepson, W. Schuch // *Publ.* 1993.
57. Hobbs S. L. A., Warkentin T. D., DeLong C. M. O. Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression // *Plant Mol. Biol.*—1993.—21.—P. 17—26.
58. Matzke M., Matzke A. J. M., Scheid O. M. Inactivation of repeated genes-DNA-DNA interaction // *Homologous recombination and gene silencing in plants* / Ed. J. Paszkowski.—Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1994.—P. 271—307.
59. Gatz C. Chemical control of gene expression // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*—1997.—48.—P. 89—108.
60. Martinez A., Sparks C., Hart C. A., Thompson J., Jepson J. Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants // *Plant J.*—1999.—19.—P. 97—106.
61. Salter M. G., Paine J. A., Riddell K. V., Jepson J., Greenland A. J., Caddick M. X., Tomsett A. B. Characterisation of the ethanol-inducible *alc* gene expression system for transgenic plants // *Plant J.*—1998.—16.—P. 127—132.

УДК 577.214.625

Надійшла до редакції 15.04.02