

Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений

А.В. Кочетов , В.К. Шумный

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

В настоящее время трансгенные растения широко используются как для изучения функций отдельных генов, так и для реконструкции сетей взаимодействующих генов, контролирующих формирование морфологических, биохимических и физиологических признаков в процессе развития и при воздействии внешних факторов различной природы. В статье обсуждается классический инструментарий генной инженерии, позволяющий получать линии растений с измененными параметрами экспрессии гена-мишени. Описана структура генетических конструкций (экспрессия белок-кодирующего трансгена, антисмысловых и дцРНК-супрессоров). В качестве примера рассмотрены трансгенные растения, характеризующиеся увеличенным или сниженным уровнем экспрессии генов S-подобных рибонуклеаз, а также сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы, отвечающего за катаболизм пролина. Функции S-подобных РНКаз связывали главным образом с ремобилизацией фосфата из стареющих и отмирающих частей растений, однако паттерн экспрессии некоторых генов из этой группы предполагал возможность их участия в защите от патогенов (индукция при повреждении тканей в районе повреждения (локально) и в удаленных органах (системно)). Кроме того, некоторые белки семейства PR-4 (pathogenesis-related proteins 4) обладают рибонуклеазной и противогрибковой активностью. Исследование трансгенных линий растений табака показало, что повышенная РНКазная активность в апопласте приводит к повышению устойчивости к вирусу табачной мозаики, что говорит о новой функции S-подобных рибонуклеаз, связанной с участием в системе неспецифической защиты от вирусов. Другой набор линий трансгенных растений содержал антисмысловый супрессор гена пролиндегидрогеназы (ПДГ) на основе сегмента гена арабидопсиса. Использование этой генетической конструкции для получения трансгенных растений других видов (табака, кукурузы, подсолнечника) приводило к умеренному снижению активности ПДГ и повышению содержания пролина в норме в 1,5–3 раза. Оказалось, что при этом также повышается устойчивость растений к различным видам абиотических стрессов (засуха, засоление, холод, соли тяжелых металлов), что может быть связано с защитным действием пролина на ранних этапах неблагоприятных воздействий, предотвращающим повреждение белков клеточного аппарата экспрессии свободными радикалами.

Ключевые слова: растения; генная инженерия; устойчивость к патогенам; стрессоустойчивость; пролин; рибонуклеазы.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения как генетические модели для изучения функций генов растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(4):475-481. DOI 10.18699/VJ16.179

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Kochetov A.V., Shumny V.K. Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(4):475-481. DOI 10.18699/VJ16.179

УДК 631.523

Поступила в редакцию 18.07.2016 г.

Принята к публикации 19.08.2016 г.

© АВТОРЫ, 2016

 e-mail: ak@bionet.nsc.ru

Transgenic plants as genetic models for studying functions of plant genes

A.V. Kochetov , V.K. Shumny

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia
Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Transgenic plants are widely used for the investigation of functions of particular genes as well as for reconstruction of complex gene networks controlling plant morphology, biochemistry, and physiology during different development stages and in response to various external stimuli. Gene engineering instruments for the design of transgenic plants with either elevated or suppressed expression of target genes are discussed. Genetic constructs for protein synthesis or antisense RNA / self-complementary double-stranded RNA transcription are described. Transgenic plants with elevated or decreased levels of expression of S-like ribonucleases and decreased expression of the proline dehydrogenase gene are considered as examples. It was believed that S-like RNase functions concern mainly phosphate remobilization from senescent organs. However, expression patterns of some genes coding for S-like RNases were similar to some pathogen-responsive genes (both local and systemic induction after wounding or pathogen inoculation). In addition, some pathogenesis-related proteins (PR-4 family) possess RNase activity and can inhibit growth of pathogenic fungi. Investigation of transgenic plants revealed that high ribonuclease activity in apoplast correlated with increased resistance against tobacco mosaic virus. Thus, S-like RNases may have a new function as a part of the plant basal antiviral defense mechanism. Another set of transgenic plants bears an antisense suppressor of the proline dehydrogenase gene (PDH) constructed with an Arabidopsis target gene segment. Tobacco, maize and sunflower plants with this heterologous suppressor were characterized with a moderate decrease in PDH activity and a mild (1.5–3-fold) increase in the proline content under normal conditions. It was also found that these plants were more tolerant to various abiotic stresses (drought, NaCl, cold, toxic heavy metals), which may result from the protective proline effect early in exposure to stress, preventing the cellular gene expression machinery from damage by stress-generated free radicals.

Key words: plants; genetic engineering; pathogen resistance; stress tolerance; proline; ribonucleases.

Первые линии трансгенных растений были получены более тридцати лет назад (Bevan et al., 1983; Murai et al., 1983) с помощью векторной системы, основанной на *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton, 1983). За минувшие три десятилетия технологии получения трансгенных растений стали общепринятым способом исследования функций отдельных генов и их систем, а также проложили путь для получения сортов с новыми ценными свойствами для нужд сельского хозяйства и биотехнологических производств (Kamthan et al., 2016; Nogué et al., 2016). Использование трансгенных форм для проведения исследований можно косвенно оценить по количеству научных публикаций, в названии или аннотации которых наряду с названием растения присутствуют термины *transgene* или *transgenic*. Этот подход широко применялся для работ не только с классическими «модельными» растениями (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*), но и с важнейшими сельскохозяйственными культурами:

Вид растения	Кол-во статей*
Любое растение (термин plant)	26 222
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7 983
<i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco)	6 443
<i>Solanum tuberosum</i> (potato)	1 450
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	1 016

* Аннотированы в системе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), август 2016 г.

Классическая схема получения трансгенных растений приведена на рис. 1. Планирование создания трансгенных растений включает разработку схемы генетической конструкции, структура которой обусловлена видом растений и способом трансформации. Эффективность трансформации зависит не только от вида растений, но и от генотипа и может в значительной степени варьировать у разных сортов (Altpeter et al., 2016). Для трансформации двудольных растений обычно используют разоруженные штаммы *Agrobacterium tumefaciens*, однако агробактериальная трансформация многих видов однодольных растений затруднена, и в этом случае применяют другие методы, например бомбардировку частицами с сорбированной на них ДНК генетической конструкции с последующим отбором каллусов на селективных фонах и регенерацией трансгенных растений. Для агробактериальной трансформации используют бинарные векторы, способные реплицироваться и в *Escherichia coli*, и в агробактерии. *A. tumefaciens* переносит в геном растений сегмент ДНК (Т-область), расположенный между концевыми повторами (LB, RB) (Bourras et al., 2015; Peyret, Lomonosoff, 2015). В структуре Т-области генетической конструкции можно выделить два ключевых элемента (см. рис. 1): репортерный ген для отбора трансформантов на селективных средах и собственно целевой генетический элемент для экспрессии в клетках растения, ради которого и проводится эксперимент по получению и анализу трансгенных форм. В качестве такого целевого элемента могут использоваться белок-кодирующие гены, гены микроРНК, сегменты генов-мишеней для синтеза антисмысловых или самокомплементарных (двухцепочечных) РНК. Важное значение имеют служебные элементы (промотор, поли(А)-

сигнал, трансляционные энхансеры), а также адаптация структуры чужеродной ДНК для правильной экспрессии в клетках растений (сайты инициации и терминации трансляции, вторичная структура в 5'-нетранслируемом районе, в некоторых случаях – оптимизация кодонного состава для максимизации уровня экспрессии) (Egelkrout et al., 2012; Smirnova et al., 2012; Кочетов и др., 2014; Герасимова и др., 2016).

Важнейший этап планирования генетической конструкции – выбор промотора. На ранних этапах развития генной инженерии применялся ограниченный круг промоторов вирусного или агробактериального происхождения (35S, pNOS, pMAS), а также промоторы высокоэкспрессирующихся генов (актина, убиквитина, тубулина). Однако для решения поставленных в эксперименте задач может потребоваться экспрессия трансгена, ограниченная определенной тканью, периодом развития или внешними условиями (индуцибельные промоторы). Накопление информации о транскриптомах и паттернах экспрессии генов растений (в том числе трансгенов под управлением различных промоторных районов в трансгенных растениях) значительно расширило возможности по дизайну генетических конструкций (Smirnova et al., 2012). В ИЦиГ СО РАН был получен ряд линий трансгенных растений для изучения функций отдельных генов и механизмов генетического контроля фенотипических характеристик, некоторые из которых описаны ниже.

Линии трансгенных растений с измененным уровнем активности апопластных рибонуклеаз

В геноме растений содержатся гены экстраклеточных рибонуклеаз (РНКаЗ), функции которых традиционно связывали с ремобилизацией фосфатов из отмирающих частей растений (S-подобные РНКазы), а также с устойчивостью к фитопатогенным грибам (некоторые белки семейства PR-4) (Филипенко и др., 2013; Jashni et al., 2015; Stigter, Plaxton, 2015). Было выдвинуто предположение о возможной роли РНКаЗ апопласта в устойчивости к вирусам (подавляющее большинство вирусов растений содержат РНК-геномы, которые могут разрушаться рибонуклеазами). Для проверки этого предположения были созданы линии трансгенных растений *Nicotiana tabacum*, экспрессирующие гены панкреатической РНКазы *Bos taurus*, S-подобной РНКазы *Zinnia elegans*, а также линии табака с супрессированным геном собственной S-подобной РНКазы *Nk1* (Сангаев и др., 2007, 2010; Trifonova et al., 2007, 2012).

На рис. 2 приведены схемы двух генетических конструкций: для синтеза экстраклеточной РНКазы растительного происхождения использована кДНК гена *ZRNaseII* циннии, помещенная под управление сильного конститутивного промотора 35S РНК ВМЦК (см. рис. 2, а); для супрессии гена S-подобной РНКазы табака *Nk1* использованы сегменты этого гена, расположенные в виде инвертированного повтора (см. рис. 2, б). Видно, что экспрессия генетических конструкций изменяет спектр активных рибонуклеаз в белковых экстрактах растений в сравнении с исходными (нетрансгенными)

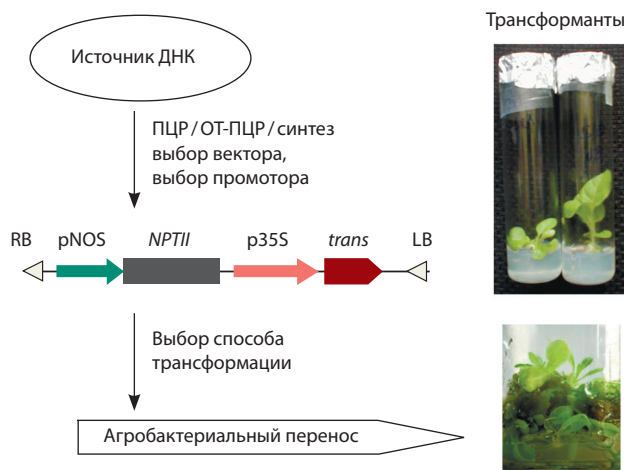
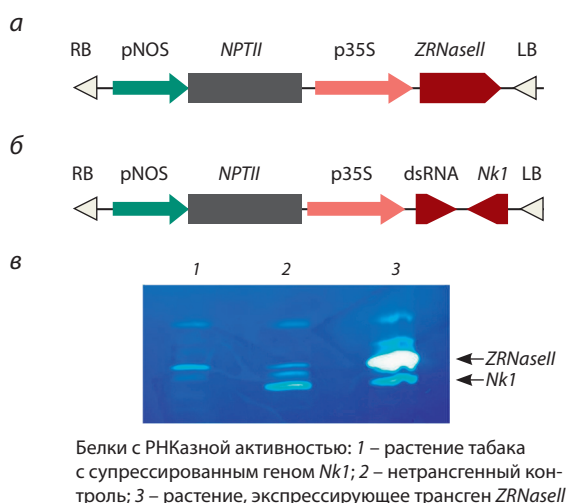


Рис. 1. Классическая схема получения трансгенных растений.

ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ – обратная транскрипция; синтез – синтетические сегменты ДНК; RB, LB – концевые повторы, окаймляющие T-область в бинарном векторе; *NPTII* – ген неомизинтрансферазы II *E. coli*, один из вариантов репортерного гена, обеспечивающий отбор трансгенных растений на селективных средах; pNOS – промотор гена нопалинсинтазы *A. tumefaciens*; p35S – промотор гена 35S РНК вируса мозаики цветной капусты; *trans* – трансген или антисмысловый сегмент/инвертированный повтор для супрессии гена-мишени с помощью РНК-интерференции. Агробактериальный перенос осуществляется с помощью «разоруженных» штаммов *A. tumefaciens*, T-области Ti-плазмиды которых делетированы, и в геном клетки растения переносится T-область из бинарного вектора. В качестве примера приведены фотографии канамицин-устойчивых трансформантов *Nicotiana tabacum*.

формами в заданном направлении (см. рис. 2, в). При этом трансгенные растения и исходный сорт табака не имели видимых различий (см. рис. 2, з).

Для экспрессии гетерологичного гена (секреторной РНКазы млекопитающих) использовался другой вариант генетической конструкции, в котором кДНК панкреатической РНКазы *Bos taurus* была помещена под управление промотора 2' гена маннопинсинтазы. В отличие от сильного конститутивного промотора 35S ВМЦК, этот промотор характеризовался более низким уровнем экспрессии в норме, а также высоким уровнем локальной индукции в районе повреждения тканей растений (Trifonova et al., 2007). Поскольку вирусы часто попадают в растения с помощью переносчиков-фитофагов, паттерн транскрипции промотора 2' был близок к природным вариантам генов защитных белков. Обе конструкции обеспечивали высокий уровень рибонуклеазной активности в апопласте (в 8–15 раз выше, чем у контроля), при этом линии трансгенных растений характеризовались существенной задержкой развития вируса табачной мозаики (Trifonova et al., 2007, 2012), а также вируса мозаики огурца, принадлежащих к разным таксономическим группам (Sugawara et al., in press). Гипотетические механизмы противовирусного действия экстраклеточных РНКаз могут быть основаны как на уязвимости геномной РНК вирусов на некоторых этапах их проникновения в растительную клетку, так и на имитации механизма программируемой клеточной смерти: при нарушении целостности тканей содержимое апопласта может проникнуть в цитоплазму



Белки с РНКазной активностью: 1 – растение табака с супрессированным геном *Nk1*; 2 – нетрансгенный контроль; 3 – растение, экспрессирующее трансген *ZRNasell*

2



Рис. 2. Трансгенные растения с измененным уровнем экспрессии экстраклеточных рибонуклеаз.

а, б – схемы генетической конструкции: а – для экспрессии кДНК гена S-подобной РНКазы *Zinnia elegans* (*ZRNasell*); б – дцРНК-супрессора гена S-подобной РНКазы *Nicotiana tabacum* *Nk1*; в – фореграмма белков с РНКазной активностью (в матрице геля содержатся РНК, использован специальный краситель) (Сангаев и др., 2010); з – трансгенные (RNS) и нетрансгенные (SR1) растения *N. tabacum*.

поврежденных клеток, в этом случае активные РНКазы выполняют функции «киллерных» белков, убивающих клетку и предотвращающих репликацию геномной РНК проникшего в нее вируса.

Таким образом, результаты анализа вирусоустойчивости трансгенных растений с модифицированным уровнем РНКазной активности в апопласте позволили сделать заключение, что эти белки могут формировать «нуклеазный» барьер для РНК-вирусов и рассматриваться как элементы неспецифической системы защиты, сходные по паттерну экспрессии и некоторым функциям с PR-белками (pathogenesis-related proteins) (Trifonova et al., 2007). Помимо информации общенаучного характера, на основе полученных данных можно разработать новые способы получения сортов сельскохозяйственных растений с повышенным уровнем неспецифической устойчивости к вирусам. Для этого возможно использовать трансгены экстраклеточных РНКаз, а также генотипы с высокой РНКазной активностью в апопласте, отобранные после анализа их генетической изменчивости по указанному признаку (Sindarovska et al., 2014). В настоящее время уве-

личение уровня базовой (неспецифической) устойчивости к фитопатогенам в комбинации с направленным увеличением специфической устойчивости рассматривается как одно из наиболее перспективных направлений селекции (Lee et al., 2016).

Линии трансгенных растений со сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы

В клетках многих видов растений пролин выполняет функции совместимого осмолита, и изменения в его содержании важны для быстрой адаптации растений к изменению в режиме водоснабжения. Кроме этого, согласно некоторым данным, пролин способен инактивировать свободные радикалы и защищать белки и мембраны растительных клеток от повреждений (Hayat et al., 2012). Считалось, что пролин может синтезироваться из глутамата, скорость-лимитирующим ферментом его синтеза служит пирролин-5-карбоксилатсинтаза (П5КС). Функции гена П5КС у разных видов растений активно исследовались, в том числе на модели трансгенных растений (Verdoy et al., 2006; Vendruscolo et al., 2007; и др.). Однако функции генов катаболизма пролина, в частности скорость-лимитирующего гена пролиндегидрогеназы (ПДГ), изучены в значительно меньшей степени.

Для определения вклада гена ПДГ в контроль стрессоустойчивости растений были разработаны трансгенные формы табака со сниженным уровнем его экспрессии (рис. 3). В составе генетической конструкции был использован короткий антисмысловой сегмент гена ПДГ арабидопсиса (см. рис. 3, а), что привело к частичной супрессии гена ПДГ, снижению активности фермента в два раза и к умеренному повышению активности пролина в норме (см. рис. 3, б). Анализ морфофизиологических характеристик растений показал, что трансгенные формы не имели видимых отличий от исходного сорта *Nicotiana tabacum* SR1, однако характеризовались увеличенным уровнем устойчивости к засухе, холоду, токсичным солям тяжелых металлов (см. рис. 3, в). В целом частичная супрессия гена ПДГ приводила к заметному сдвигу нормы реакции по признакам устойчивости к разным абиотическим стрессам (Кочетов и др., 2004; Колодяжная и др., 2007; Ибрагимова и др., 2012). Трансгенные формы растений подсолнечника и кукурузы, полученные с помощью этой же генетической конструкции, также отличались повышенной выживаемостью в условиях дефицита воды и засоления, что говорит о консервативной роли гена ПДГ в контроле стрессоустойчивости (Moiseeva et al., 2014; Tishchenko et al., 2014).

По-видимому, полученные результаты можно объяснить свойством пролина защищать молекулы белков от повреждений. При резком изменении условий окружающей среды (водоснабжение, повышение или понижение температуры и т. п.) у растений индуцируется экспрессия генов стрессового ответа, запускающих комплекс адаптационных процессов. В случае интенсивного стрессового воздействия без периода акклиматизации белки клеточного аппарата экспрессии могут быть повреждены, и своевременный синтез защитных белков не будет

запущен. Трансгенные формы со сниженным уровнем активности ПДГ характеризуются умеренно повышенным содержанием пролина в норме, что дает определенные преимущества на самых ранних этапах стрессового воздействия, в частности обеспечивает защиту факторов аппарата транскрипции и трансляции и синтез защитных белков, с помощью которых происходит дальнейшая адаптация клеток растений на биохимическом и физиологическом уровнях. Трансгенные растения оказались более устойчивыми к солям тяжелых металлов, токсическое действие которых во многом связано с повреждением молекул белков (см. рис. 3, в), что может рассматриваться как подтверждение этой гипотезы. В последние годы происходит переосмысление роли метаболической цепи синтеза пролина в процессах, протекающих в растении, и появляется большое количество новых данных о роли этой аминокислоты в формировании гаметофита (Biancucci et al., 2015), контроле старения растений (Zhang, Becker, 2015), защите от фитопатогенов (Qamar et al., 2015) и других ключевых процессах. Разработанные нами линии трансгенных растений также могут быть востребованы в качестве генетических моделей для исследования в указанных направлениях.

Важное значение имеет структура генетической конструкции, в которой в качестве антисмыслового супрессора был использован короткий сегмент кДНК гена арабидопсиса. Гетерологичный антисмысловый супрессор не приводил к полному выключению гена ПДГ в растениях *N. tabacum* (и, возможно, кукурузы), поэтому морфологические характеристики и сроки развития трансгенных форм в норме не имели значимых различий с исходным сортом, по крайней мере в условиях теплицы и в экспериментах *in vitro*. Выявленные закономерности можно использовать для получения новых сортов сельскохозяйственных растений с повышенной неспецифической устойчивостью к абиотическим стрессам, для чего могут применяться как методы трансгенеза, так и анализ имеющейся в популяциях генетической изменчивости по активности гена ПДГ/содержанию пролина в норме с последующим вовлечением отобранных генотипов в селекционный процесс с помощью методов маркер-ориентированной селекции (Spoljarević et al., 2011).

Другие методы генной инженерии для изучения генетического контроля признаков растений

В последние годы арсенал генно-инженерных технологий существенно расширился. К числу наиболее интересных технологий относится вирус-индуцируемый генетический сайленсинг (virus-induced gene silencing – VIGS), основанный на включении сегмента гена растения-хозяина в состав вирусного генома для индукции РНК-интерференции и выключения экспрессии гена-мишени на посттранскрипционном уровне (Жирнов и др., 2015; Lacome, 2015). Эффект от применения VIGS сходен с эффектом, наблюдаемым у трансгенных растений, несущих генетические конструкции с антисмысловыми или дцРНК-супрессорами (см. рис. 2, б и 3, а). Однако получение трансгенных форм для некоторых видов растений

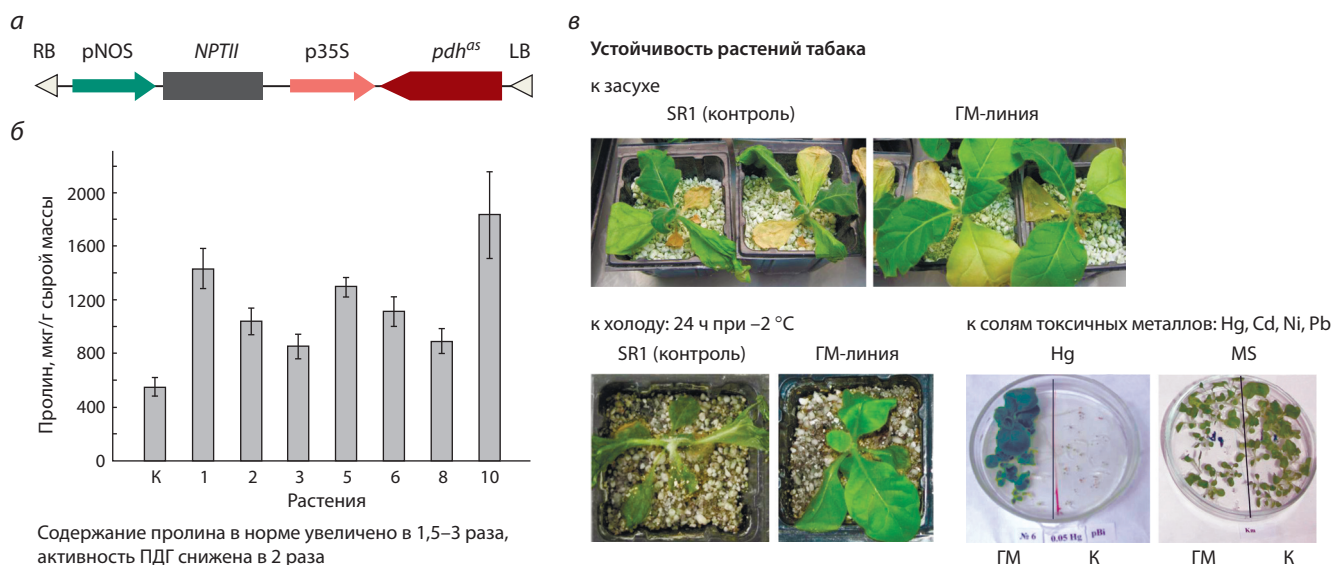


Рис. 3. Трансгенные растения со сниженным уровнем экспрессии гена пролиндегидрогеназы.

а – схема генетической конструкции для частичной супрессии гена пролиндегидрогеназы растений (*pdh^{as}* – антисмысловой сегмент гена *A. thaliana*); *б* – содержание пролина в листьях трансформантов; *в* – устойчивость трансформантов (ГМ-линии растений) по отношению к засухе, холоду, а также солям тяжелых металлов (Кочетов и др., 2004; Колодяжная и др., 2006, 2007; Ибрагимова и др., 2012).

представляет собой сложную процедуру. Кроме того, супрессия некоторых генов может блокировать развитие растений, поэтому получение таких трансгенных форм невозможно. VIGS позволяет выключить экспрессию гена-мишени в большинстве клеток взрослого (нетрансгенного) растения, что предоставляет дополнительные возможности в эксперименте. Технически для индукции VIGS используют агробактериальную трансфекцию (внесение суспензии *A. tumefaciens* в ткань листа). В составе T-области генетической конструкции под управлением растительного промотора расположена кДНК растительного вируса (как правило, нетрансмиссивный вариант, инфицирующий большинство тканей экспериментального растения, но не способный передаваться другому растению обычным для данного вируса способом). В состав этой кДНК включают сегмент гена-мишени, что приводит к индукции РНК-интерференции. Одним из наиболее часто и широко используемых вариантов является векторная система, основанная на вирусе погромковости табака (Жирнов и др., 2015; Lacomme, 2015).

В качестве примеров применения VIGS можно привести недавние работы по изучению транскрипционных факторов, контролирующих устойчивость к засухе (Wang et al., 2016) и фузариозу (Kumar et al., 2016): анализ последствий «выключения» экспрессии гена в клетках взрослого растения используется как часть комплексного процесса исследования, направленного на всестороннее выявление функций целевых генов.

Другой очень интересный генно-инженерный подход – это гетерологичный генетический сайленсинг (host-induced gene silencing – HIGS). Этот подход основан на индукции в растении РНК-интерференции с помощью трансгеноза или VIGS, но используются антисмысловые

сегменты не собственных генов растения, а генов взаимодействующих с растением организмов, например патогенных грибов или фитофагов (Koch, Kogel, 2014). Оказалось, что siRNA способны проникать в клетки фитофага и запускать эволюционно-консервативный механизм РНК-интерференции. Примером применения этой технологии служат работы по направленной HIGS-опосредованной супрессии важных генов *Puccinia triticina* (Panwar et al., 2013), *Fusarium oxysporum* (Koch et al., 2013), нематод (Dubreuil et al., 2009), насекомых (Kumar et al., 2012).

По-видимому, в ближайшем будущем будут разработаны новые технологии генной инженерии растений для непосредственного воздействия на фитофагов или другие организмы, взаимодействующие с растениями. Недавно был предложен подход, основанный на синтезе в трансгенных растениях автономных репликонов вирусной природы, не способных реплицироваться в клетках растений, но способных инфицировать клетки фитофагов (alien replicon producing organisms – ARPO), что может предоставить новые возможности в области биоконтроля природных популяций различных организмов (Kochetov, 2014).

Заключение

Методы и подходы генной инженерии необходимы для проведения фундаментальных исследований в области генетики растений. Трансгенные формы дают уникальные возможности для выявления функций отдельных генов, межгенных взаимодействий и в конечном итоге – для реконструкции сложных ансамблей генов, контролирующих формирование морфологических, биохимических и физиологических характеристик растений и механизмы адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды.

Благодарности

Исследования поддержаны бюджетным финансированием по государственному заданию (проект 0324-2015-0005) и грантом РФФИ (14-04-01036).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Герасимова С.В., Смирнова О.Г., Кочетов А.В., Шумный В.К. Наработка рекомбинантных белков в клетках растений. Физиология растений. 2016;63(1):31-43.
- Жирнов И.В., Трифонова Е.А., Кочетов А.В., Шумный В.К. Вирусиндуцируемый сайленсинг как метод изучения функций генов высших растений. Генетика. 2015;51:558-567.
- Ибрагимова С.С., Колодяжная Я.С., Герасимова С.В., Кочетов А.В. Роль гена пролиндегидрогеназы в поддержании стрессоустойчивости у растений. Физиология растений. 2012;59:99-107.
- Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В., Комарова М.Л., Романова А.В., Коваль В.С., Шумный В.К. Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. Генетика. 2006;42:278-281.
- Колодяжная Я.С., Титов С.Е., Кочетов А.В., Трифонова Е.А., Романова А.В., Комарова М.Л., Коваль В.С., Шумный В.К. Трансформанты табака, экспрессирующие антисмысловую последовательность гена пролиндегидрогеназы, проявляют устойчивость к тяжелым металлам. Генетика. 2007;43:994-998.
- Кочетов А.В., Титов С.Е., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Коваль В.С., Макарова Н.Н., Илинский Ю.Ю., Трифонова Е.А., Шумный В.К. Повышение содержания пролина и осмотического давления клеточного сока у трансформантов табака, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. Генетика. 2004;40:282-285.
- Кочетов А.В., Филипенко Е.А., Смирнова О.Г., Шумный В.К. Энкапсулы трансляции для генной инженерии растений. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4):610-617.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В. Инактивация гена *Nkl* в растениях табака *Nicotiana tabacum* SR1 за счет РНК-интерференции. Генетика. 2010;46:131-134.
- Сангаев С.С., Трифонова Е.А., Титов С.Е., Романова А.В., Колодяжная Я.С., Комарова М.Л., Сапоцкий М.В., Малиновский В.И., Кочетов А.В., Шумный В.К. Трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* SR1, экспрессирующие экстраклеточную рибонуклеазу *Zinnia elegans*. Генетика. 2007;43:1002-1005.
- Филипенко Е.А., Кочетов А.В., Kanaaya Y., Малиновский В.И., Шумный В.К. PR-белки с рибонуклеазной активностью и устойчивость растений к патогенным грибам. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17:326-334.
- Altpeter F., Springer N.M., Bartley L.E., Blechl A.E., Brutnell T.P., Citovsky V., Conrad L.J., Gelvin S.B., Jackson D.P., Kausch A.P., Lemaux P.G., Medford J.I., Orozco-Cárdenas M.L., Tricoli D.M., Van Eck J., Voytas D.F., Walbot V., Wang K., Zhang Z.J., Stewart C.N. Jr. Advancing crop transformation in the era of genome editing. Plant Cell. 2016;28(7):1510-1520.
- Bevan M.W., Flavell R.B., Chilton M.D. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature. 1983;304:184-187.
- Biancucci M., Mattioli R., Forlani G., Funck D., Costantino P., Trovato M. Role of proline and GABA in sexual reproduction of angiosperms. Front. Plant Sci. 2015;4(6):680.
- Bourras S., Rouxel T., Meyer M. *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer: how a plant pathogen hacks the nuclei of plant and nonplant organisms. Phytopathology. 2015;105(10):1288-1301.
- Chilton M.D. A vector for introducing new genes into plants. Sci. Am. 1983;248:36-45.
- Dubreuil G., Magliano M., Dubrana M.P., Lozano J., Lecomte P., Favery B., Abad P., Rosso M.N. Tobacco rattle virus mediates gene silencing in a plant parasitic root-knot nematode. J. Exp. Bot. 2009;60:4041-4050.
- Egelkrot E., Rajan V., Howard J.A. Overproduction of recombinant proteins in plants. Plant Sci. 2012;184:83-101.
- Hayat S., Hayat Q., Alyemeni M.N., Wani A.S., Pichtel J., Ahmad A. Role of proline under changing environments: a review. Plant Signal Behav. 2012;7(11):1456-1466.
- Jashni M.K., Mehrabi R., Collemare J., Mesarich C.H., de Wit P.J. The battle in the apoplast: further insights into the roles of proteases and their inhibitors in plant-pathogen interactions. Front. Plant Sci. 2015;6:584.
- Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. Genetically modified (GM) crops: milestones and new advances in crop improvement. Theor. Appl. Genet. 2016;129(9):1639-1655.
- Koch A., Kogel K.H. New wind in the sails: improving the agronomic value of crop plants through RNAi-mediated gene silencing. Plant Biotechnol. J. 2014;12(7):821-831.
- Koch A., Kumar N., Weber L., Keller H., Imani J., Kogel K.H. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2013;110(48):19324-19329.
- Kochetov A.V. The alien replicon: artificial genetic constructs to direct the synthesis of transmissible self-replicating RNAs. BioEssays. 2014;36:1204-1212.
- Kumar A., Yogendra K.N., Karre S., Kushalappa A.C., Dion Y., Choo T.M. WAX INDUCER1 (HvWIN1) transcription factor regulates free fatty acid biosynthetic genes to reinforce cuticle to resist *Fusarium* head blight in barley spikelets. J. Exp. Bot. 2016;67(14):4127-4139.
- Kumar P., Pandit S.S., Baldwin I.T. Tobacco rattle virus vector: a rapid and transient means of silencing *Manduca sexta* genes by plant mediated RNA interference. PLoS One. 2012;7:e31347.
- Lacomme C. Strategies for altering plant traits using virus-induced gene silencing technologies. Methods Mol. Biol. 2015;1287:25-41.
- Lee S., Whitaker V.M., Hutton S.F. Mini review: Potential applications of non-host resistance for crop improvement. Front. Plant Sci. 2016;11(7):997.
- Moiseeva Y.M., Velikov V.A., Volokhina I.V., Gusev Yu.S., Yakovleva O.S., Chumakov M.I. Agrobacterium-mediated transformation of maize with antisense suppression of the proline dehydrogenase gene by an in planta method. British Biotechnol. J. 2014;4(2):116-125.
- Murai N., Kemp J.D., Sutton D.W., Murray M.G., Slightom J.L., Merlo D.J., Reichert N.A., Sengupta-Gopalan C., Stock C.A., Barker R.F., Kemp J.D., Hall T.C. Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vectors. Science. 1983;222:476-482.
- Nogué F., Mara K., Collonnier C., Casacuberta J.M. Genome engineering and plant breeding: impact on trait discovery and development. Plant Cell Rep. 2016;35(7):1475-1486.
- Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. Host-induced gene silencing of wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* pathogenicity genes mediated by the Barley stripe mosaic virus. Plant Mol. Biol. 2013;8:595-608.
- Peyret H., Lomonossoff G.P. When plant virology met *Agrobacterium*: the rise of the deconstructed clones. Plant Biotechnol. J. 2015;13(8):1121-1135.
- Qamar A., Mysore K.S., Senthil-Kumar M. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant defense against invading pathogens. Front. Plant Sci. 2015;6(6):503.
- Sindarovska Y.R., Guzyk O.I., Yuzvenko L.V., Demchenko O.A., Didenko L.F., Grynevych O.I., Spivak M.Y. Ribonuclease activity of buckwheat plant (*Fagopyrum esculentum*) cultivars with different sensitivities to buckwheat burn virus. Ukr. Biochem. J. 2014;86(3):33-40.
- Smirnova O.G., Ibragimova S.S., Kochetov A.V. Simple database to select promoters for plant transgenesis. Transgenic Res. 2012;21:429-437.

- Spoljarević M., Agić D., Lisjak M., Gumze A., Wilson I.D., Hancock J.T., Teklić T. The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. *Plant Signal Behav.* 2011; 6(2):251-257.
- Stigter K.A., Plaxton W.C. Molecular mechanisms of phosphorus metabolism and transport during leaf senescence. *Plants (Basel)*. 2015; 4(4):773-798.
- Tishchenko O.M., Komisarenko A.G., Mykhalska S.I., Sergeeva L.E., Adamenko N.I., Morgun B.V., Kochetov A.V. Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in vitro and in planta using Lba4404 strain harboring binary vector pBi2E with dsRNA-suppressor of proline dehydrogenase gene. *Cytol. Genetics*. 2014;48:218-226.
- Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L., Scherban A.B., Shumny V.K., Polyakova A.M., Lapshina L.A., Kochetov A.V., Malinovsky V.I. Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus. *Plant Cell Reports*. 2007;26:1121-1126.
- Trifonova E.A., Romanova A.V., Sangaev S.S., Sapotsky M.V., Malinovsky V.I., Kochetov A.V. Inducible expression of the gene of *Zimnia elegans* coding for extracellular ribonuclease in the SR1 *Nicotiana tabacum* plants. *Biologia Plantarum*. 2012;56:571-574.
- Vendruscolo E.C., Schuster I., Pileggi M., Scapim C.A., Molinari H.B., Marur C.J., Vieira L.G. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J. Plant Physiol.* 2007; 164(10):1367-1376.
- Verdoy D., Coba De La Peña T., Redondo F.J., Lucas M.M., Pueyo J.J. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Environ.* 2006;29(10):1913-1923.
- Wang C., Lu W., He X., Wang F., Zhou Y., Guo X., Guo X. The cotton mitogen-activated protein kinase kinase 3 functions in drought tolerance by regulating stomatal responses and root growth. *Plant Cell Physiol.* 2016;57(8):1629-1642.
- Zhang L., Becker D.F. Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Front. Plant Sci.* 2015;22(6):552.