УДК 575.222.7:581.1

# ТРАНСФОРМАЦІЯ ХЛОРОПЛАСТНОЇ ДНК РОСЛИН РОДИНИ *SOLANACEAE*: ДОСЯГНЕННЯ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

Н.А. МАТВЄЄВА

Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 148
e-mail: joyna56@gmail.com

*Створення рослин з трансформованою хлоропластною ДНК є одним з пріоритетних напрямків у сучасній генетичній інженерії рослин, адже протягом останніх двадцяти років досягнуто великих успіхів у розробленні стратегії генетичної трансформації пластому та зроблено практичні кроки у створенні транспластомних рослин. Це пов'язано з низкою переваг, що мають такі рослини, та можливістю їхнього застосування в сільському господарстві і медицині. В огляді наведено основні досягнення у використанні різних методів (біолістична, ПЕГ-індукована трансформація та соматична гібридизація) та подано результати, отримані за створення транспластомних рослин родини Solanaceae, стійких до біотичних та абіотичних факторів, а також рослин-продуцентів рекомбінантних білків.*

*Ключові слова: Solanaceae, біотехнологія, трансформація пластому, рекомбінантні білки.*

**Трансформація хлоропластної ДНК.** Хлоропластна трансформація є цільовою інтеграцією чужинного гена або генів у пластидний геном. Можливість трансформування хлоропластного геному було показано у 1988 р. Boyton et al., які здійснили перенесення чужинного гена в хлоропласт одноклітинної водорості *Chlamydomonas reinhardtii* шляхом бомбардування мікрочастками [1].

Інтерес до створення рослин із трансформованою хлоропластною ДНК пов'язаний перш за все з високим рівнем експресії та можливістю накопичення суттєво більшої кількості білкового продукту порівняно з експресією того ж гена, що знаходиться в ядерній ДНК [2], що було з'ясовано, зокрема, при перенесенні генів β-глюкуронідази та неоміцинфосфотрансферази II [3, 4]. У клітинах рослин міститься близько 100 хлоропластів, хоча їхня кількість значно варіює, а в одному хлоропласті – до 100 копій хлоропластного геному [5]. Отже, клітини рослин мають велику кількість копій хлоропластної ДНК (близько 10000) [6]. Таким чином, якщо чужинний ген вбудовується в хлоропластну ДНК, до 10000 його копій будуть присутні в трансформованій клітині. Зокрема, це було підтверджено роботою Maliga [7] при трансформації тютюну шляхом бомбардування листових дисків вольфрамовими частками з нанесеною на них ДНК. Завдяки наявності великої кількості копій можна очікувати на високий рівень експресії внесеного гена [8]. Чужинний білок у клітинах із трансформованою хлоропластною ДНК синтезується у значній кількості, складаючи до 40 % загального розчинного клітинного білка [9].

© Н.А. МАТВЄЄВА. 2009

Рослини з трансгенами в ядерній ДНК можуть становити загрозу довкіллю через неконтрольоване розповсюдження цих генів з пилком та перенесення їх до інших рослин. Разом з тим, відоме материнське успадкування цитоплазматичних генів за статевої гібридизації [10]. Оскільки пилок трансластомних рослин не містить генетично модифікованої ДНК, при культивуванні таких рослин виключається спонтанне, неконтрольоване перенесення трансгенів до геному бур'янів.

Перевагою трансформації саме хлоропластної ДНК є те, що, на відміну від трансформації ядерної ДНК, вона здійснюється шляхом гомологічної рекомбінації [11, 12]. Висока специфічність за місцем вбудовування гена, що переноситься, дає можливість уникнути впливу так званого неконтрольованого ефекту положення або явища "мовчання" перенесених генів, що в деяких випадках має місце в рослинах з трансформованою ядерною ДНК [13]. Поліцистронний тип експресії при трансформації хлоропластів завдяки прокаріотній організації пластид дозволяє вводити в клітину декілька генів одночасно [14].

Безпосередньо в процесі трансформування рослинних клітин відбувається вбудовування чужинного гена лише в одну або декілька копій хлоропластної ДНК. Отже, щойно трансформовані клітини містять хлоропласти, які, крім трансформованої, також мають ДНК дикого типу; таким чином, спостерігається явище гетеропластомності – інтерпластидної або інтрапластидної. У першому випадку в клітині присутні хлоропласти як з трансформованою ДНК, так і хлоропласти дикого типу. При інтрапластидному стані в одному хлоропласті присутні трансформована та нетрансформована ДНК. При селекції відбувається елімінація хлоропластів дикого типу, отже, зникає інтерпластидна гетеропластомність. На відміну від цього, інтрапластидна гетеропластомність може залишатися навіть при досить тривалому культивуванні на селективному середовищі, адже присутність однієї або декількох копій трансгенів надає органелі стійкості до селективного агента [15].

Основною метою експериментів з трансформації пластомної ДНК є досягнення стану стабільної трансформації, за якою всі копії пластидного геному є трансформованими, тобто, знаходяться в гомопластидному стані, одночасно копії дикого типу пластидного геному (з нетрансформованою ДНК) елімінують у процесі селекції. Стабільну трансформацію хлоропластної ДНК тютюну було здійснено ще в 1990 р. [16]. Для трансформування використано плазміду pZS148 з фрагментом пластидної ДНК стійкого до стрептоміцину та спектиноміцину мутанту тютюну. В результаті селекції на середовищі, що містило спектиноміцин, було отримано гомопластомні трансгенні рослини.

Використання стійкості до спектиноміцину та стрептоміцину, що зумовлюється присутністю бактеріального гена аміноглікозид-3-аденілтрансферази (*aadA*), є найчастіше застосовуваним способом селекції рослин з трансформованими пластидами. Так, ген *aadA* використали Svab et al. як селективний [17]. При селекції на середовищі зі спектиноміцином вірогідна поява рослин, що є чутливими до стрептоміцину. В той же час проведення селекції в присутності двох антибіотиків дає можливість відібрати рослини, які стійкі як до стрептоміцину, так і до спектиноміцину, таким чином виключаючи або зводячи до мінімуму вірогідність появи спонтанних мутантів.

Селективними генами, які дають можливість здійснювати селекцію трансластомних рослин за ознакою стійкості до канаміцину, є *aphA-6* та *neo* [18, 19].

Для уникнення потенційної шкідливості генів резистентності до антибіотиків становить інтерес отримання трансластомних рослин, вільних від маркерів стійкості до антибіотиків. Для цього використовують, зокрема, ген бетаїнальдегіддегідрогенази шпінату (*badh*), наявність якого дозволяє інактивувати токсичний бетаїнальдегід, причому така селекція значно ефективніша, ніж за використання спектиноміцину [20]. Бактеріальний ген *bar*, який кодує фосфінотрицинацетилтрансферазу та зумовлює стійкість до гербіциду фосфінотрицину, в поєднанні з геном *aadA* також застосовують для створення трансластомних рослин [21]. Для отримання трансластомних рослин використовують репортерні гени *gus* та *GFP*, наявність яких можна визначити візуально [22, 27].

**Методи створення трансластомних рослин.** Процес трансформації пластидного геному рослин складається з трьох послідовних етапів: інтродукції трансформуючого вектора в пластиди; інтеграції трансгена в пластидний геном шляхом гомологічної рекомбінації; селекції клітин, що мають трансформований геном з подальшою регенерацією рослин у селективних умовах.

Для введення генів у рослинні клітини використовують методи ПЕГ-індукованої та біолістичної трансформації. Рослини із трансформованими пластидами також створюють шляхом соматичної гібридизації.

Значна кількість робіт зі створення трансластомних рослин виконана із використанням методу біолістичної трансформації. Цей метод полягає в прямому внесенні ДНК у клітини за допомогою спеціальної установки "short gun", в якій частки із золота або вольфраму з нанесеною ДНК під тиском гелію рухаються з великою швидкістю та транспортують ДНК у клітини рослин [24, 25]. За використання цього методу можна трансформувати більшість сільськогосподарських рослин, як дводольних, так і однодольних, а також мікроорганізми та клітини тварин [26]. Методом біолістичної трансформації створено ряд рослин родини пасльонових з трансформованим пластомом – тютюн [19], картоплю [27], томат [28], петунію [29].

Метод ПЕГ-індукованої трансформації полягає у прямому внесенні ДНК до протопластів із використанням поліетиленгліколю (ПЕГ), розчину з іонами кальцію та лужним pH [30, 31]. Можливість використання цього методу для отримання трансластомних рослин було показано більше 20 років тому. Так, в роботі Spörlein et al. [32] виявлено наявність експресії репортерного *gas*-гена в протопластах *Nicotiana plumbaginifolia* після ПЕГ-індукованої трансформації. Цим методом було отримано трансластомні рослини *Nicotiana tabacum* [33], *Lycopersicon esculentum* [34], *Solanum tuberosum* [35]. Використання ПЕГ-індукованої трансформації потребує наявності ефективних методик культивування ізольованих протопластів, що обмежує застосування цього методу.

Соматична гібридизація дає можливість реконструювати не лише ядерний, але і пластомний геном [36], адже злиття протопластів є системою транспорту генетичної інформації, завдяки якій може бути здійснено перенесення генів, зокрема тих, що знаходяться в хлоропластах, між рослинними клітинами. Завдяки цьому метод соматичної гібридизації можна вважати таким, що дозволяє здійснювати конструювання клітин із новим унікальним набором генів та отримувати рослини з трансформованим хлоропластним геномом.

**Трансластомні рослини родини *Solanaceae*.** До теперішнього часу надійні, відтворювані методики трансформації хлоропластної ДНК розроблено тільки для рослин роду *Nicotiana*. Одними з перших

робіт були дослідження Svab et al. [17, 37] щодо створення трансластомних рослин тютюну з високою ефективністю, Daniell et al. [22] щодо експресії гена хлорамфеніколацетилтрансферази в хлоропластах тютюну. Koop et al. [31] трансформували пластидну ДНК *Nicotiana tabacum*, обробляючи розчином ПЕГ протопласти з листків тютюну. Авторами було оптимізовано протокол трансформації і селекції на середовищі з антибіотиками (спектиноміцином та стрептоміцином) та отримано трансластомні рослини.

Трансформація хлоропластної ДНК інших рослин, зокрема картоплі та томатів, як за допомогою ПЕГ-індукованої трансформації протопластів, так і при застосуванні біолістичного методу, вимагає наявності високої ефективності регенерації рослин із листків, межвузль, бульб або інших експлантів. Об'єктивні труднощі трансформування хлоропластної ДНК викликані як відсутністю ефективних методик регенерації рослин з протопластів, так і значними відмінностями в регенераційній здатності рослин різних сортів [38].

Першою з трансформації хлоропластної ДНК *Solanum tuberosum* стала робота Sidorov et al. [27]. За використання векторів pZS197 та pMON30125, що були сконструйовані для трансформації пластидного геному тютюну, автори методом бомбардування отримали рослини картоплі з трансформованими хлоропластами. Запорукою успіху було використання лінії FL1607, для якої спостерігали високоефективну пряму регенерацію пагонів з листових пластинок на середовищі з 5 мг/л зеатину та 0,1 мг/л НОК. Шість рослин, стійких до спектиноміцину, було отримано після 46 бомбардувань (pZS197). Три лінії з отриманих виявились стійкими до двох антибіотиків – спектиноміцину та стрептоміцину (концентрації 300 та 500 мг/л відповідно). В експериментах із використанням вектора pMON30125 14 ліній, стійких до спектиноміцину, було отримано після 104 бомбардувань. Три з них виявили також резистентність до стрептоміцину. Методом блот-гібридизації за Саузерном було показано, що три спектиноміцин/стрептоміцинстійкі лінії, отримані після трансформації плазмідою pZS197, є гомопластомними трансформантами. Вони мали тільки трансгенну хлДНК при відсутності ДНК дикого типу. Аналогічні результати отримано після блот-гібридизації за Саузерном ліній, регенерованих після трансформації плазмідою pMON30125. Ефективність трансформації, що склала 1 подію на 15 або 30 бомбардувань, виявилася нижчою, ніж та, що описана для тютюну [17] – одна подія на 1 постріл. Автори вважають, що це може бути результатом різниці ефективності регенерації тютюну та картоплі або внаслідок застосування у векторних конструкціях фланкуючих послідовностей з геному тютюну.

Ще однією роботою з трансформації хлоропластної ДНК картоплі [35] було показано можливість інтеграції та експресії чужинних генів у пластидний геном комерційного сорту картоплі Desiree при використанні векторних конструкцій pZS197, pMSK18 та pNtcZ70 з селективним геном *aadA*. Після бомбардування листових пластинок та наступної селекції на середовищі з 3 мг/л зеатинрибозиду, 2 мг/л індолілоцтової кислоти, 1 мг/л гіберелової кислоти та 300 мг/л спектиноміцину з 179 бомбардувань (pZS197) було отримано 21 стійку до спектиноміцину лінію, 10 з яких виявилися стійкими також до стрептоміцину в концентрації 300 мг/л. 9 стійких до спектиноміцину пагонів отримано після трансформації конструкцією pMSK18, 4 з яких були стійкими і до стрептоміцину. З 8 спектиноміцинстійких ліній, трансформованих вектором pNtcZ70, всі були чутливими до стрептоміцину. ПЛР-аналіз показав,

що всі спектиноміцин/стрептоміцинстійкі лінії містять ген *aadA*, в той час як рослини, стійкі лише до одного антибіотику, є спонтанними мутантами та не містять селективного гена.

Ефективність трансформації картоплі сорту Desiree в обговорюваному дослідженні (1 трансформант на 18 пострілів для конструкції pZS197 та 1 на 25 пострілів для конструкції pMSK18) наближається до результатів, отриманих Sidorov et al. [27]. На думку авторів, досить висока ефективність є результатом використання векторних конструкцій pZS197 та pMSK18, в яких фланкуючі послідовності тютюну до 98 % є ідентичними ділянкам accD-rbcL (pZS197) та rps12-rrn16 (pMSK18) хлоропластного геному картоплі.

Рослини *Lycopersicon esculentum* також були об'єктом трансформації з метою отримання транспластомних рослин. Так, Ruf et al. [28] трансформували хлоропластну ДНК рослин томату шляхом бомбардування листових дисків, хоча ефективність трансформації виявилася нижчою, ніж за пластидної трансформації тютюну. Трансген експресувався як в листках, так і в плодах, хоча в плодах трансформованих рослин трансген експресувався в кількості, що становила приблизно 50 % від рівня експресії в листках. Автори вважають, що запропонована система отримання транспластомних томатів може бути застосована для продукування їстивних вакцин, антитіл та фармацевтичних препаратів.

Транспластомні рослини томату отримано не тільки шляхом бомбардування мікрочастками, але й за допомогою ПЕГ-індукованої трансформації. Таку роботу було проведено з використанням вектора з геном стійкості до спектиноміцину та стрептоміцину [34]. Вивчаючи успадкування ознаки стійкості до антибіотиків, автори виявили материнське успадкування гена *aadA*, що підтвердило пластомну природу трансформації отриманих рослин.

Zubko et al. [29] створили транспластомні рослини *Petunia hybrida*. Вихідним матеріалом для експерименту слугували листові експланти комерційного сорту Pink Wave, що відрізнялися високою регенераційною здатністю. Методом бомбардування отримано рослини з геном *aadA*, причому ефективність трансформації була досить високою та дорівнювала 1 події на 10 пострілів. Автори, врахувавши негативний досвід попередніх експериментів, здійснювали селекцію трансформантів на середовищі, що містило одночасно спектиноміцин та стрептоміцин для уникнення появи спонтанних мутантів. Цей підхід до етапу селекції виявився вдалим, адже було відібрано трансформовані рослини, які за результатами молекулярно-біологічного аналізу були гомопластомними трансформантами. Ці рослини укорінювалися, цвіли та за фенотипом не відрізнялися від рослин дикого типу.

Із застосуванням методу біолістичної трансформації отримано транспластомні рослини *Solanum rickii* [39]. Для трансформації використано векторну конструкцію з геном *aadA* під контролем промотору 16S рДНК тютюну та термінатор гена *rbcL* із пластому *Chlamydomonas reinhardtii*. Селективний ген *aadA* фланкований ділянками хлоропластної ДНК, які включали гени *rpl32* (рибосомний білок) і *trnL* (тРНК лейцину) тютюнового пластому, що мав забезпечувати вбудовування гена *aadA* у гомологічну ділянку хлоропластного геному. Частота трансформації становила 1 подія на 10 бомбардувань, що, очевидно, пов'язано з високою здатністю до регенерації використаних стеблових та листових експлантів *S. rickii*, частота регенерації яких становила до 100 %. Показано, що використання одночасно двох антибіотиків, стрептоміцину та спектиноміцину, дозво-

ляє ефективно проводити селекцію трансформантів та уникати появи спонтанних мутантів, що підтверджено результатами ПЛР аналізу регенерованих рослин.

Ще одним можливим шляхом отримання транспластомних рослин є соматична гібридизація. Це може бути здійснено при злитті ізольованих протопластів рослин, які мають цільовий ген у хлоропластній ДНК, із протопластами рослин, в які цей ген необхідно перенести. Такий спосіб використано для перенесення трансформованих хлоропластів *S. rickii* до гібридів з *L. peruvianum* [40] та *Solanum tuberosum* [41]. Для перенесення хлоропластів *S. rickii* до гібридів *L. peruvianum* + (*S. rickii*) застосовано метод γ-злиття. Використання хлорофілдефектного мутанта *L. peruvianum* та рослин *S. rickii* з селективним геном у хлоропластах дозволило відібрати зелені рослини, що мали саме трансформовані пластиди *S. rickii*, а опромінення донора хлоропластів та використання поживного середовища для регенерації рослин *L. peruvianum* дозволило відібрати рослини з ядерним матеріалом реципієнта.

Перенесення трансформованих хлоропластів із геном від дикого виду *S. rickii* до картоплі також здійснено шляхом соматичної гібридизації мезофільних протопластів [41]. Рослини картоплі двох сортів – Лугівський і Слов'янка – містили в ядерній ДНК ген *nptII, S. rickii* – ген *aadA* у пластидах. Селекцію клонів із трансформованою хлоропластною ДНК з геном *aadA* здійснювали на середовищі з трьома антибіотиками – канаміцином, стрептоміцином та спектиноміцином. Наявність у гібридних рослин гена *aadA* свідчила про перенесення хлоропластів із трансформованою ДНК в гібриди *S. tuberosum*+ *S. rickii*.

О'єктами трансформації можуть бути гібридні та цибридні рослини. У цибридні рослини *Nicotiana tabacum*+*(Salpiglossis sinuata*) методом ПЕГ-індукованої трансформації вводили ген стійкості до спектиноміцину [42, 43]. Для отримання транспластомних рослин здійснювали соматичну гібридизацію протопластів *Salpiglosis sinuata* з протопластами з мезофілу листків транспластомних рослин *N. tabacum*+(*S. sinuata*), опроміненими γ-промінням в дозі 500–600 Гр. В результаті було отримано рослини *S. sinuata,* стійкі до спектиноміцину та стрептоміцину. Таким чином, поєднання двох методів – трансформації та соматичної гібридизації – дає можливість створення трансгенних рослин, які не вдається за певних причин отримати шляхом прямой трансформації.

**Транспластомні рослини, стійкі до гербіцидів та комах.** Експерименти зі створення рослин родини *Solanaceae* з трансформованою хлоропластною ДНК було спрямовано як на розроблення методології трансформації із використанням лише селективних генів, так і на створення рослин з практично корисними властивостями. Такими властивостями є, зокрема, стійкість до гербіцидів і шкідників та можливість синтезування в трансгенних рослинах біологічно активних або фармацевтичних речовин. Об'єктом, з яким було проведено переважну більшість експериментів, є тютюн, загально визнаний модельний об'єкт біотехнологічних досліджень. У численних експериментах у хлоропластний геном рослин тютюну було інтродуковано більш ніж 40 трансгенів, що надавали рослинам бажаних агрономічних властивостей або експресія яких призводила до синтезування в трансгенних рослинах антигенів та інших білків медичного призначення [44, 45].

Практика досить широкого використання гербіцидів, зокрема, гліфосату та фосфінотрицину, вимагає створення сортів сільськогосподарських культур, що є стійкими до цих сполук. Застосування ін-

сектицидних препаратів для захисту рослин від комах може бути небезпечним та завдає шкоди довкіллю. Отже, виникає потреба у створенні сортів сільськогосподарських культур, які не ушкоджуються комахами. Такі рослини можуть бути отримані шляхом генетичної трансформації, а створення саме транспластомних рослин із генами стійкості до гербіцидів або комах має суттєві переваги, адже через материнське успадкування попереджає перенесення цих генів до інших рослин.

Стійкі до гербіциду рослини тютюну створено Daniell et al. [46] шляхом стабільної інтеграції гена 5-енол-пірувілшикимат-3-фосфатсинтази петунії в хлоропластний геном. Рослини першого покоління, отримані після самозапилення транспластомних рослин, залишалися нормальними в присутності селективного агента. Трансгенні рослини, на відміну від контрольних, витримували обробку високими концентраціями гліфосату. Робота, виконана Daniell et al. становить інтерес, адже використання саме транспластомних рослин, що мають гени стійкості до гербіцидів у хлоропластному геномі, може попередити неконтрольоване розповсюдження цих генів з пилком.

Білок дельта-ендотоксин, синтезований *Bacillus thuringiensis* [47], є токсичним для комах та застосовується для боротьби з ними у інсектицидних препаратах. Отже, становило інтерес створити рослини з трансформованим хлоропластним геномом, в яких синтезується цей білок. У трансгенних рослинах тютюну, що були зконструйовані Kota et al. [48], спостерігалося накопичення в листках білкового продукту в концентрації, що дорівнювала 2–3 % від загального розчинного білка. Ці рослини були резистентні до ураження тютюновою листовійкою *Heliothis virescens*, бавовниковою совкою *Helicoverpa zea*. Блот-аналіз за Саузерном виявив стабільну інтеграцію в хлоропластний геном гена c*ry2Aa2* у великій кількості (5000–10000 копій на клітину).

McBride et al. [2] показано, що ампліфікація химерного гена *B. thuringiensis* в хлоропластах тютюну призводить до синтезу інсектицидного білка. Суперекспресія в хлоропластному геномі гена *cry2Aa2* дозволила отримати рослини з високим рівнем синтезу протеїну. Вони виявилися токсичними для *H. virescens*, *H. zea, Spodoptera exigua*, причому загибель комах склала 100 % [9]. Рослини тютюну з геном *cry2Aa2* у хлоропластній ДНК також отримано Chakrabarti et al. [49], концентрація цільового білка становила близько 10 %.

**Рослини з трансформованим хлоропластним геномом – продуценти фармацевтичних білків та антигенів.** Рослини як біофабрики фармацевтичних білків мають низку переваг порівняно з бактеріальними або тваринними системами. Рослини з трансформованим ядерним геномом можуть бути використані для продукування терапевтичних протеїнів [50], однак низький рівень експресії стає на перешкоді комерціалізації таких продуктів. Транспластомні рослини також можуть синтезувати фармацевтичні білки, бактеріальні та вірусні антигени. Їхні переваги пов'язані перш за все з відносно невеликою собівартістю білків рослинного походження, що у 10–30 разів менша за вартість бактеріальних білків, адже рослини для росту потребують лише мінеральні елементи ґрунту, світло та воду. Використання рослин з трансформованою хлоропластною ДНК дозволяє досягнути високої продуктивності синтезу цільових білків. Позитивними моментами використання трансгенних рослин є більша безпека генно-інженерних продуктів через відсутність у рослинних клітинах вірусів і пріонів, можливість тривалого зберігання (наприклад, у зерні) та

використання без додаткової переробки як їстівні вакцини.

Тютюн є привабливим об'єктом експериментів зі створення рослин-продуцентів антигенів завдяки мінімізації ризиків потрапляння трансгенних рослин до харчових ланцюгів. Крім того, для тютюну розроблено високоефективні методики культивування *in vitro*, регенерації рослин, генетичної трансформації, що дає можливість використання рослин цього виду як одного з основних об'єктів для створення трансгенних рослин – продуцентів фармацевтичних білків. Наявність нікотину є перешкодою для використання трансформованих рослин як їстівних вакцин, але створення рослин із низьким вмістом нікотину відкриває перспективи для орального застосування трансгенного тютюну [51].

У хлоропластах тютюну показано експресію секреторного білка соматотропіну в розчинній фізіологічно активній формі [52]. Концентрація цього білка виявилася досить високою – більш ніж 7 % тотального розчинного білка. Такий показник значно вищий за концентрацію білка при ядерній трансформації, що є свідченням безумовної переваги трансформації саме хлоропластної ДНК.

Guda et al. [53] порівняли рівні накопичення у трансгенних та транспластомних рослинах тютюну полімерів PBP (bioelastic protein-based polymers), що застосовуються в медицині для попередження післяопераційних спайок. Авторами показано, що цей рівень у рослинах із трансформованим пластомом у 100 разів вищий, ніж в рослинах із трансформованою ядерною ДНК.

Транспластомні рослини можуть синтезувати гідроксибензойну кислоту [54], полігідроксибутират [55], ксилоназу [56], триптофан [57], монеллін [58].

Рослини можуть бути використані для отримання сироваткового альбуміну людини. Високий рівень експресії цього білка (до 11,1 %) в трансформованих рослинах показано Fernández-San Millán et al. [59].

Виявлено, що інтерферон-$\alpha$2b синтезується в рослинах картоплі та тютюну з трансформованою ядерною ДНК [60, 61], однак рівень експресії гена виявився низьким. Разом з тим, інтеграція гена *ifn-* $\alpha$*2b* у хлоропластний геном дає можливість значно збільшити синтез інтерферону. Так, рослини тютюну були трансформовані геном *ifn-*$\alpha$*2b* [62]. Трансгенні рослини синтезували інтерферон у кількості до 20 % загального розчинного білка або 3 мг на грам листків. Інтерферон рослинного походження мав біологічну активність, аналогічну комерційному препарату PEG-Intron™, та інгібував розвиток вірусів імунодефіциту і везикулярного стоматиту.

Бактеріальні гени також можуть експресуватися у тканинах рослин. Зокрема, у хлоропластах рослин синтезувався антиген TetC, що зумовлює стійкість до правцевої інфекції, причому кількість цільового білка становила 10–25 % загального розчинного білка [63, 64].

Для створення рослин-продуцентів антигенів сибірської виразки інтегровано ген *pagA* у хлоропластний геном тютюну [65]. У листках отриманих транспластомних рослин концентрація антигена становила 14,2 % загального розчинного білка. Дослідження показали, що активність антигена, виділеного з тютюну, не відрізняється від активності антигена, синтезованого *Bacillus anthracis*, а імунізація мишей антигеном хлоропластного походження у 100 % випадків дозволяла запобігти загибелі тварин після введення летальних доз токсину.

Здійснено експерименти з метою використання транспластомних рослин для створення вакцини проти сибірської виразки. Показано, що антиген рослинного походження викликає ефективну імунну

відповідь [66]. Створено трансформовані рослини тютюну з геном *pag*, які містили функціонально активний імуногенний білок у кількості 2,5 мг/г сирої ваги листя [67]. За розрахунками, з одного акру площі посівів трансгенних рослин можна отримати до 360 млн доз вакцини. Проведені експерименти дають підстави сподіватися, що розроблені методики отримання транспластомних рослин, зокрема, біолістична трансформація, можуть бути використані для створення їстивних вакцин проти сибірської виразки [68].

Шляхом бомбардування отримали рослини тютюну з генами термолабільного та термостабільного токсину *Escherichia coli* [69–71]. Кількість термолабільного ентеротоксину становила 2,5 % загального розчинного білка, що у 250 разів вище за концентрацію цього білка при ядерній трансформації. Методами ПЛР та гібридизації за Саузерном показано інтегрування генів у хлоропластний геном.

Рослини тютюну, що синтезують бактеріальні білки (Gal/GalNAc лектин *Entamoeba histolytica*, ліпопротеїн OspA) є джерелом для створення вакцин проти амебіазу [72] та хвороби Лайма [73].

Прикладом успішної реалізації ідеї створення рослин-продуцентів фармацевтичних білків є отримання транспластомних рослин із геном холерного токсину. Інтеграція в хлоропластний геном гена з *Vibrio cholerae* дала можливість отримати трансгенні рослини тютюну, які мали цільовий білок у кількості 4,1 % від загального білка, що в 400 разів більше, ніж при експресії того ж гена в ядерному геномі [74]. Інтродуковані гени стабільно успадковувалися рослинами наступних поколінь.

Антимікробні пептиди, виділені з різних організмів (жаб, комах, ссавців) мають антибіотичну активність. Пептид MSI-99 синтезувався в транспластомних рослинах тютюну [75]. Білкові екстракти з трансформованих рослин пригнічували ріст *Pseudomonas syringae* pv *tabaci*. Крім того, ці екстракти інгібували ріст спор *Aspergillus flavus, Fusarium moliniforme, Verticillium dahlia.*

Проведено дослідження створення рослин з геном *gag,* які можуть стати основою для створення вакцини проти ВІЛ. Інтеграція гена в хлоропластах призводила до значно більшої концентрації синтезованого цільового білка ( до 7–8 % загального розчинного білка або 312–363 мг/кг ваги) порівняно з кількістю білка в рослинах з трансформованою ядерною ДНК [76].

Трансформацію хлоропластної ДНК було використано для створення рослин – потенційних джерел HPV-16 L1 вакцини, що дасть можливість запобігти розвитку захворювання, яке спричиняється папіломавірусом людини (HPV). Транспластомні рослини тютюну отримано після трансформації векторами з химерним геном, що кодує синтез L1 білка, причому акумулювання цільового білка становило 1,5 % загального білка [77].

Рослини тютюну з імуногенним протеїном A27L (вірус коров'ячої віспи) було створено Rigano et al. [78]. Так само, як і в дослідженні [77], автори порівнювали ефективність синтезування цільового білка в рослинах з трансформованою ядерною та хлоропластною ДНК. Показано, що вбудовування трансгена в хлоропластний геном дає можливість у 500 разів збільшити накопичення білка, концентрація якого в транспластомних рослинах становила 18 % загального білка.

Вивчено синтезування VP6 білка в хлоропластах тютюну для створення вакцини проти ротавірусної інфекції [79]. VP6 протеїн накопичувався в проростках та молодих листках у кількості близько 0,6 – 3 % від загального розчинного білка, а концентрація білка залежала від використаного промотора та віку листків.

Вакцини, що можуть бути використані у ветеринарії, становлять інтерес, отже, увага дослідників та комерційних компаній зосереджена на створенні трансгенних рослин, що синтезують антигени до патогенів тварин. Рослини є перспективними продуцентами таких антигенів, адже однією з основних вимог, крім безпечного використання, є економічність їхнього продукування. Привабливою також є можливість орального застосування вакцин рослинного походження, адже при такому використанні відпадає необхідність етапу очищення, що значно скорочує виробничі витрати.

Molina et al. [80] отримали рослини, що синтезували 2L21 пептид, який може забезпечити захист від собачого папіломавірусу. Експресія рекомбінантного протеїну залежала від віку рослин, що трансформували, адже високий рівень продукування білка спостерігали у зрілих рослин під час цвітіння, значно нижчий – у молодих рослин. Максимальна кількість CTB-2L21 білка дорівнювала 7,49 мг/г сирої ваги (31 % загального білка), GFP-2L21 білка – 5,96 мг/г сирої ваги (22,6 % загального білка).

Рослини тютюну виявилися ефективною системою для продукування антигенів вірусу ящуру, що є небезпечною хворобою тварин. Біолістичним методом Yinü Li et al. [81] створили рослини з трансформованою хлоропластною ДНК, що мали ген *VP1*. Три отримані спектиноміцинстійкі лінії виявилися також стійкими до стрептоміцину та мали інтегрований у хлоропластний геном ген *VP1*, причому концентрація цільового білка становила 2–3 % .

**Перспективи використання транспластомних рослин.** Рослини з трансформованою хлоропластною ДНК є системою, що може продукувати білки як малого (20 амінокислот) [75], так і великого розміру [2], мономерні [52, 59] або полімерні білки [74]. У трансформованих хлоропластах рослин можуть синтезуватися антигени протозойних, бактеріальних (холера, сибірська виразка, правець) [64, 65, 67, 74], вірусних патогенів (собачий папіломавірус, ротавірус) [79, 80].

Трансформація хлоропластної ДНК є привабливою та може стати ефективним інструментом для створення рослин, стійких до гербіцидів, таких, що не вражаються комахами, тих, що можуть бути використані як фабрики для синтезу фармацевтичних речовин або як їстівні вакцини. Значні досягнення у розробленні методик конструювання рослин тютюну з вище названими властивостями відкриває перспективи для створення рослин родини Solanaceae з трансформованим пластомом та їхнього подальшого використання в сільському господарстві і медицині. Такі сподівання знаходять підтвердження в нових публікаціях. Так, Singh et al. [82] у 2009 р. опубліковано результати роботи з трансформування хлоропластного геному *Solanum melongena* L., таким чином, до переліку видів родини *Solanaceae* з трансформованим пластомом додано ще один. Перспективи щодо практичного використання трансластомних рослин родини *Solanaceae* є реальними, адже, крім зазначених вище досліджень зі створення трансластомних рослин тютюну – продуцентів фармацевтичних білків, є розробки щодо отримання трансластомних рослин томату, які можуть знайти застосування у медицині як їстівні вакцини: Zhou et al. [83] отримали транластомні рослини, що синтезують антигени p24 та Nef вірусу імунодефіциту людини, які є компонентами вакцини проти СНІДу, в концентрації до 40 % загального білка.

Отже, за останні 20–30 років досягнуто значних успіхів в отриманні рослин із трансформованими пластидами. Розроблено методики трансформування хлоропластної ДНК (біолістична, ПЕГ-індукована трансформація і соматична гібридиза-

ція) та створено транспластомні рослини, зокрема, такі, що належать до родини *Solanaceae*. Такі особливості трансформації хлоропластної ДНК як материнське успадкування генів, високий рівень експресії, специфічність за місцем інтеграції трансгена, поліцистронний тип експресії, є безумовними перевагами використання транспластомних рослин, а можливість синтезування цими рослинами білків медичного призначення робить їхнє створення перспективним.

**Перелік літератури**


1. *Boynton J.E., Gillham N.W., Harris E.H. et al*. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles // Science. – 1988. – Vol. 240, № 4858. – P. 1534 – 1538.
2. *McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J. et al.* Amplification of the chimeric Bacillus gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco // Bio/Technology. – 1995. - Vol. 13, № 4. – P. 362 – 365.
3. *Staub J.M., Maliga P*. Accumulation of D1 polypeptide in tobacco plastids is regulated via the untranslated region of the psbA mRNA // EMBO J. – 1992. – Vol. 12, № 2. – P. 601–606.
4. *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. – Vol. 91, № 15. – P. 7301–7305.
5. *Pyke K.A.* Plastid division and development // Plant Cell. – 1999. – Vol.11, № 4. – P. 549–556.
6. *Bendich A.J.* Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? // BioEssays. – 1987. – Vol. 6, № 6. – P. 279–282.
7. *Maliga P.* Towards plastid transformation in flowering plants // Trends in Biotechnol. – 1993. – Vol. 11, № 3. – P. 101–107.
8. *Ye G.-N., Hajdukiewicz P.T.J., Broyles D. et al.* Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate syntase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco // Plant J. – 2001. – Vol. 25, № 3. – P. 261–270.
9. *Cosa B. de, Moar W., Lee S.B., Miller M., Daniell H.*Overexpression of Bt cry2Aa2 operon in chloroplast leads to formation ofinsecticidal crystals // Nat. Biotechnol. – 2001. – Vol. 19, № 1. - P. 71–74.
10. *Birky C.W.* Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1995 – Vol. 92, № 25. – P. 11331–11338.
11. *Staub J.M., Maliga P.* Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation // Plant Cell. – 1992. –Vol. 4, № 1. – P. 39–45.
12. *Bower R., Birch R.G.* Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment // Plant J. – 1992. – Vol. 2, № 3. - P. 409–416.
13. *Kooter J.M., Matzke M.A., Meyer P*. Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control // Trends Plant Sci. – 1999. – Vol. 4, № 9. – P. 340–347.
14. *Staub J. M., Maliga P.* Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic mRNAs are efficiently translated in tobacco plastids // Plant J. – 1995. – Vol. 7, № 5. – P. 845–848.
15. *Bock R.* Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology // J. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 312, № 3. – P. 425–438.
16. *Svab Z., Hajdukiewitz P., Maliga P*. Stable transformation of plastids in higher plants // Proc. Nat. Acad. Sci. USA . - 1990. – Vol. 87, № 21. – P. 8526–8530.
17. *Svab Z., Maliga P.* High frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90, № 3. – P. 913–917.
18. *Huang F.C., Klaus S.M., Herz S., Zou Z., Koop H.U., Golds T.J*. Efficient plastid transformation in tobacco using the aphA-6 gene and kanamycin selection // Mol. Genet. Genomics. 2002. – Vol. 268, № 1. – P.19–27.

19. *Carrer H., Hockenberry T.N., Svab Z., Maliga P*. Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco // Mol Gen Genet. – 1993. – Vol. 241, № 1–2. – P. 49–56.
20. *Daniell H., Muthukumar B., Lee S.B*. Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic selection // Curr. Genet. – 2001. – Vol. 39, № 2. – P. 109–116.
21. *Lutz K.A., Knapp J.E., Maliga P.* Expression of bar in the plastid genome confers herbicide resistance // Plant Physiol. – 2001. – Vol.125, № 4. – P. 1585–1590.
22. *Daniell H., Vivekananda J., Nielsen B.L., Ye G.N., Tewari K.K.* Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87, № 1 . – P. 88–92.
23. *Daniell H., Sanford J.C.* Optimization of delivery of foreign DNA into higher–plant chloroplasts // Plant Mol. Biol. – 1990. – Vol. 15, № 6. – P. 809–819.
24. *Klein T.M., Wolf E.D., Wu R., Sanford J.C*. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells // Nature. – 1987. – Vol. 327, № 6117. – P. 70–73.
25. *Sanford J.C., Klein T.M., Wolf E.D. et al*. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process // Part. Sci. Technol. – 1987. – Vol. 5, № 1. – P. 27–37.
26. *Klein T. M., Arentzen R., Lewis P. A., Fitzpatrick–McElligott S*. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment // BioTechnol. – 1992. – Vol. 10, № 3. – P. 286–291.
27. *Sidorov V.A., Kasten D., Pang S.Z. et al*. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker // Plant J. – 1999. – Vol. 19, № 2. – P. 209–216.
28. *Ruf S., Hermann M., Berger I.J. et al*. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit // Nat. Biotechnol. – 2001. – Vol. 19, № 9. – P. 870–875.
29. *Zubko M., Zubko E., Van Zuilen K., Meyer P. , Day A*. Stable transformation of petunia plastids // Transgen. Res. – 2004. – Vol. 13, № 6. – P. 523–530.
30. *O'Neill C., Horváth G.V., Horváth E. et al.* Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems // Plant J. – 1993. – Vol. 3, № 5. – P. 729 – 738.
31. *Koop H–U., Steinmüller K., Wagner H. et al*. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol–mediated protoplast transformation // Planta. – 1996. – Vol. 199, № 2. – P.193–201.
32. *Spörlein B., Streubel M., Dahlfeld G., Westhoff P., Koop H. U*. PEG–mediated plastid transformation: a new system for transient gene expression assays in chloroplasts // Theor. and Appl. Genet. – 1991. – Vol. 82, № 6. – P.717–722.
33. *Golds T., Maliga P., Koop H.–U.* Stable plastid transformation in PEG–treated protoplasts of *Nicotiana tabacum* // Biotechnol. – 1993. – Vol. 11, № 1. – P. 95–97.
34. *Nugent G.D., Nave M., Gulic A. et al*. Plastid transformants of tomato selected using mutations affecting ribosome structure // Plant Cell Rep. – 2005. – Vol. 24, № 6. – P. 341–349.
35. *Nguen T. T., Nugent G., Card T., Dix P.J*. Generation of homoplasmic plastid transformants of a commercial cultivar of potato (*Solanum tuberosum* L.) // Plant Sci. – 2005. – Vol. 168, № 6. – P. 1495 – 1500.
36. *Than N. D., Medgyesy P.* Limited chloroplast gene transfer via recombination overcomes plastome–genome incompatibility between *Nicotiana tabacum* and *Solanum tuberosum* // Plant Mol. Biol. – 1989. – Vol. 12, № 1. – P. 87–93.
37. *Svab Z., Harper E.C., Jones J.D.G., Maliga P.* Aminoglycoside-3-adenylyntransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum* // Plant Mol Biol. – 1990. – Vol. 14, № 2. – P. 197–205.
38. *Seabrook J.A., Douglass L.K., Tai G.C*. Segregation for somatic embriogenesis on stem-internode explants from potato seed-

lings // Plant Cell Tiss. and Organ Culture. – 2001. – Vol. 65, № 1. – P. 69–73.

39. *Матвеева Н.А., Шаховский А.М., Кучук Н.В.* Генетическая трансформация хлоропластной ДНК *Solanum rickii* // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 5. – С. 3–8.
40. *Матвеева Н.А., Момот В.П., Шаховський А.М., Кучук Н.В*. Регенерация цибридных растений *Lycopersicon peruvianum* + (*Solanum rickii*) с трансформированными хлоропластами/ // Цитология и генетика. – 2005. – Т. 39, № 6. – С. 3–9.
41. *Матвеева Н.А., Шаховський А.М., Кучук Н.В.* Соматические гибриды между трансгенными растениями картофеля *Solanum tuberosum* и транспластомными растениями *Solanum rickii* // Цитология и генетика.– 2008. – Т. 42, № 4. – С. 38–44.
42. *Сытник Е.С., Парий А.Ф., Комарницкий И.К. и др*. Анализ ядерного и митохондриального геномов у транспластомных растений *Salpiglossis sinuata*, полученных путем переноса трансформированных пластид от цибрида *Nicotiana tabacum*+ *(S. sinuata*) // Цитология и генетика. – 2003. – Vol. 37, № 5. – С. 3–9.
43. *Kuchuk N., Sytnyk K., Vasylenko M. et al*. Genetic transformation of plastids of different *Solanaceae* species using tobacco cells as organelle hosts // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 113, № 3. – P. 519–527.
44. *Daniel H., Kumar S., Dufourmantel N.* Breakthrough in chloroplast genetic engineering of agronomically important crops // Trends Biotechnol. – 2005. – Vol. 23, № 5. – P. 238–245.
45. *Bock R.* Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming // Curr Opin Biotechnol. – 2007. – Vol. 18, № 2. – P. 100–106.
46. *Daniell H., Datta R., Varma S. et al.* Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome // Nat Biotechnol.– 1998. – Vol. 16, № 4. – P. 345–348.
47. *Dankocsik C., Donovan W.P., Jany C.S*. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies kurstaki by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity // Mol. Microbiol. – 1990. – Vol. 4, № 12. – P. 2087–2094.
48. *Kota M., Daniell H., Varma S. et al*. Overexpression of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protein in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt–resistant insects // Proc Natl Acad Sci USA.– 1999.– Vol. 96, № 5.– P. 1840–1845.
49. *Chakrabarti S.K., Lutz K.A., Lertwiriyawong B., Svab Z., Maliga P*. Expression of the cry9Aa2 B.t. gene in tobacco chloroplasts confers resistance to potato tuber moth // Transgenic Res. – 2006. – Vol. 15, № 4. – P. 481–488.
50. *Horn M.E., Woodard S.L., Howard J.A.* Plant molecular farming: systems and products // Plant Cell Rep. – 2004. – Vol. 22, № 10. – P.711–720.
51. *Menassa R., Du C., Yin Z.Q. et al.* Therapeutic effectiveness of orally administered transgenic low–alcaloid tobacco expressing human interleukin–10 in a mouse model of colitis // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5, № 1. – P. 50–59.
52. *Staub J.M., Garcia B., Graves J. et al*. High–yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts // Nat Biotechnol. – 2000. – Vol. 18, № 3. – P. 333–338.
53. *Guda C., Lee S.–B., Daniell H.* Stable expression of a biodegradable protein–based polymer in tobacco chloroplasts // Plant Cell Rep. – 2000. –Vol. 19, № 3. – P. 257–262.
54. *Viitanen P.V., Devine A.L., Khan M.S. et al.* Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Escherichia coli* ubiC gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for p-hydroxybenzoic acid biosynthesis //Plant Physiol. – 2004. – Vol. 136, № 4. – P. 4048–4060.
55. *Lössl A., Eibl C., Harloff H.J., Jung C., Koop H.U.* Polyester synthesis in transplastomic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.): significant contents of polyhydroxybutyrate are associated with

growth reduction // Plant Cell Rep. – 2003. – Vol. 21, № 9. – P. 891–899.

56. *Leelavathi S., Gupta N., Maiti S. et al.* Overproduction of an alkali– and thermo–stable xylanase in tobacco chloroplasts and efficient recovery of the enzyme // Mol. Breed. – 2003. – Vol. 11, № 1. – P. 59–67.
57. *Zhang X.H., Brotherton J.E., Widholm J.M., Portis A.R* Targeting a nuclear anthranilate synthase a–subunit gene to the tobacco plastid genome results in enhanced tryptophan biosynthesis. Return of a gene to its pre–endosymbiotic origin // Plant Physiol . – 2001. – Vol.127, № 1. – P.131–141.
58. *Roh K.H., Shin K.S., Lee Y.H. et al*. Accumulation of sweet protein monellin is regulated by the psbA 5'UTR in tobacco chloroplasts // J Plant Biol. – 2006. – Vol. 49, № 1. – P. 34–43.
59. *Fernández–San Millán A., Mingo–Castel A., Miller M., Daniell H.* A chloroplast transgenic approach to hyper–express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation // Plant Biotechnol. J. – 2003. – Vol. 1, № 2 – P. 71–79.
60. *Ohya K, Matsumura T, Ohashi K, Onuma M, Sugimoto C*. Expression of two subtypes of human IFN–alpha in transgenic potato plants // J. Interf. Cytok. Res. – 2001. – Vol. 21, № 8. – P. 595–602.
61. *Edelbaum O., Stein D., Holland N. et al.* Expression of active human interferon–beta in transgenic plants // J. Interferon. Res. – 1992. – Vol.12, № 6. – P. 449–453.
62. *Arlen P.A., Falconer R., Cherukumilli S. et al.* Field production and functional evaluation of chloroplast–derived interferon–alpha2b // Plant Biotechnol J. – 2007. – Vol. 5, № 4. – P. 511–525.
63. *Tregoning J.S., Nixon P., Kuroda H. et al*. Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts // Nucleic Acids Res. – 2003. – Vol. 31, № 4. – P. 1174–1179.
64. *Tregoning J., Maliga P., Dougana G., Nixon P. J.* New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC // Phytochemistry. – 2004 – Vol. 65, № 8. – P. 989–994.
65. *Koya V., Moayeri M., Leppla S.H., Daniell H.* Plant–based vaccine: mice immunized with chloroplast–derived anthrax protective antigen survive anthrax lethal toxin challenge // Infect Immun. – 2005. – Vol. 73, № 12. – P. 8266–8274.
66. *Kamarajugadda S., Daniell H.* Chloroplast–derived anthrax and other vaccine antigens: their immunogenic and immunoprotective properties // Expert Rev. Vaccines. – 2006. – Vol. 5, № 6. – P. 839–849.
67. *Watson J., Koya V., Leppla S.H., Daniell H.* Expression of *Bacillus anthracis* protective antigen in transgenic chloroplasts of tobacco, a non–food/feed crop // Vaccine. – 2004. – Vol. 22, № 31–32. – P. 4374–4384.
68. *Aziz M.A., Sikriwal D., Singh S. et al.* Transformation of an edible crop with the pagA gene of *Bacillus anthracis* // FASEB J. – 2005. – Vol. 19, № 11. – P.1501–1503.
69. *Kang T.-J., Han S.-Ch., Kim M.–Y., Kim Y.-S., Yang M.-S.* Expression of non–toxic mutant of *Escherichia coli* heat–labile enterotoxin in tobacco chloroplasts // Protein expression and purification. – 2004. – Vol. 38, № 1. – P. 123–128.
70. *Rosales–Mendoza S., Alpuche–Solis A.G., Soria–Guerra R.E. et al.* Expression of an *Escherichia coli* antigenic fusion protein comprising the heat labile toxin B subunit and the heat stable toxin, and its assembly as a functional oligomer in transplastomic tobacco plants // Plant J. – 2009. – Vol. 57, № 1. – P. 45–54.
71. *Kang T.J., Loc N.H., Jang M.O. et al.* Expression of the B subunit of *E. coli* heat–labile enterotoxin in the chloroplasts of plants and its characterization // Transgenic Res. – 2003. – Vol. 12, № 6. – P. 683–691.
72. *Chebolu S., Daniell H.* Stable expression of Gal/GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* in transgenic chloroplasts and immunogenicity in mice towards vaccine development for amoebiasis // Plant Biotechnol. J. – 2007. – Vol. 5, № 2. – P. 230–239.
73. *Glenz K., Bouchon B., Stehle T. et al.* Production of a recombinant bacterial

lipoprotein in higher plant chloroplasts // Nat Biotechnol. – 2006. – Vol. 24, № 1. – P. 76–77.

74. *Daniell H., Lee S.B., Panchal T. et al.* Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts // J. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 311, № 5. – P. 1001–1009.
75. *DeGray G., Rajasekaran K., Smith F. et al.* Expression of an antimicrobial peptide via the chloroplast genome to control phytopathogenic bacteria and fungi // Plant Physiol. – 2001. – Vol.127, № 3. – P. 852–862.
76. *Scotti N., Alagna F., Ferraiolo E. et al.* High–level expression of the HIV-1 Pr55(gag) polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts // Planta. – 2009. – Vol. 229, № 5. – P.1109–1122.
77. *Lenzi P., Scotti N., Alagna F. et al.* Translational fusion of chloroplast-expressed human papillomavirus type 16 L1 capsid protein enhances antigen accumulation in transplastomic tobacco // Transgen. Res. – 2008. – Vol. 17, № 6. – P.1091–1102.
78. *Rigano M., Manna C., Giulini A. et al*. Transgenic chloroplasts are efficient sites for high–yield production of the vaccinia virus envelope protein A27L in plant cells // Plant Biotechnol. J. – 2009 . – Vol. 7, № 6. – P. 577–591.
79. *Birch–Machin I., Newell C.A., Hibberd J.M., Gray J.C.* Accumulation of rotavirus VP6 protein in chloroplasts of transplastomic tobacco is limited by protein stability // Plant Biotechnol. J.– 2004. – Vol.2, № 3. – P. 261–270.
80. *Molina A., Hervás–Stubbs S., Daniell H. et al.* High–yield expression of a viral peptide animal vaccine in transgenic tobacco chloroplasts // Plant Biotechnol. J.– 2004. –Vol. 2, № 2. – P.141–153.
81. *Li Y., Sun M., Liu J. et al.* High expression of foot–and–mouth disease virus structural protein VP1 in tobacco chloroplasts // Plant Cell Reports. – 2006. – Vol. 25, № 4. – P. 329–333.
82. *Singh A.K., Verma S.S., Bansal K.C.* Plastid transformation in eggplant (*Solanum melongena* L.) // Transgen. Research. – 2009. DOI 10.1007/s11248-009–9290z.
83. *Zhou F., Badillo–Corona J.A., Karcher D. et al.* High–level expression of human immunodeficiency virus antigens from the tobacco and tomato plastid genomes // Plant Biotechnol J. – 2008. – Vol. 6, № 9. – P. 897–913.

*Представлено В.А. Кунахом*
*Надійшла 28.08.2009*

## ТРАНСФОРМАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *SOLANACEAE*: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

*Н.А. Матвеева*

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 148
e-mail: joyna56@gmail.com

Конструирование растений с трансформированной хлоропластной ДНК является одним из приоритетных направлений современной генетической инженерии растений. На протяжении последних двадцати лет достигнуты значительные успехи в разработке стратегии генетической трансформации пластома и сделаны практические шаги по созданию трансластомных растений. Это связано с рядом преимуществ, которые имеют растения с трансформированной хлоропластной ДНК, а также возможностью их практического использования в сельском хозяйстве и медицине. В обзоре приведены основные достижения в использовании различных методов получения трансластомных растений семейства Solanaceae (биолистическая, ПЭГ-индуцированная трансформация, соматическая гибридизация), а также результаты в направлении создания растений – продуцентов рекомбинантных белков.

*Ключевые слова: Solanaceae*, биотехнология, трансформация пластома, рекомбинантные белки.

PLASTID TRANSFORMATION OF *SOLANACEAE*: PROGRESS AND PERSPECTIVE

*N.A. Matvieieva*

Institute of Cell Biology and Genetic Engineering of National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Zabolotnogo str. 148
e-mail: joyna56@gmail.com

Designing of plants with transformed plastome is one of priority directions of modern genetic plants engineering. During last twenty years significant success in development of strategy of plastome transformation was achieved and practical steps towards transplastomic plants production were made. In this review the basic achievements in genetic engineering of Solanaceae plants (biolistic and PEG-induced transformation, somatic hybridization) and also the results in the construction of plants, producers of recombinant proteins are discussed.

*Key words:* *Solanaceae*, biotechnology, plastome transformation, recombinant proteins.