

Оригинальные работы

И.В. ТАНАСИЕНКО¹, А.И. ЕМЕЦ¹, Я.В. ПИРКО¹,
В.И. КОРХОВОЙ¹, Н. АБУМХАДИ², Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Институт пищевой биотехнологии и геномики НАН Украины, Киев

² AgroBioInstitute, Sofia, Bulgaria

E-mail: alyemets@univ.kiev.ua

ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЛАКТОФЕРРИН ЧЕЛОВЕКА, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТАНТНОГО ГЕНА АЛЬФА-ТУБУЛИНА В КАЧЕСТВЕ СЕЛЕКТИВНОГО МАРКЕРНОГО ГЕНА



Метод биолистической трансформации был использован для генетического усовершенствования трех коммерческих сортов ячменя отечественной селекции (Оксамытовский, Водограй и Гетьман). Для трансформации использовали конструкцию *rHLFTuBA*, содержащую ген интереса, ген человеческого лактоферрина (*hLF*) под контролем глотелинового *B-1 (GluB-1)* промотора риса. В качестве селективного маркерного гена использовали ген мутантного α -тубулина, обеспечивающего устойчивость к трифлюралу (гербицид динитроанилинового ряда). Для установления селективной концентрации трифлюрала был проведен скрининг его разных концентраций в диапазоне от 0,1 до 30 мкМ. После 2–3 месяцев селекции на 10 мкМ трифлюрала были получены две трансгенные линии растений ячменя сорта Оксамытовский и каллусная линия сорта Гетьман. Для подтверждения стабильной интеграции гена *hLF* был проведен ПЦР-анализ листьев растений-регенерантов после их адаптации в грунте. В обеих линиях ячменя был амплифицирован фрагмент гена *hLF* размером 734 п.н.

© А.И. ЕМЕЦ, И.В. ТАНАСИЕНКО, Я.В. ПИРКО,
В.И. КОРХОВОЙ, Н. АБУМХАДИ, Я.Б. БЛЮМ, 2011

Введение. Биолистическая трансформация – один из важных методов генетического усовершенствования злаковых, поскольку позволяет привносить ген интереса в растительный материал независимо от его генетического статуса. Но несмотря на широкий спектр однодольных, используемых для различных модификаций в процессе трансформации микро-частицами, одним из немаловажных аспектов эффективности генетических манипуляций является подбор оптимального исходного материала. Для решения этой задачи ранее нами было осуществлено введение в культуру *in vitro* ряда коммерческих сортов ячменя отечественной и зарубежной селекции, районированных на территории Украины, которые могут эффективно использоваться для выращивания в зонах Полесья, Лесостепи и Степи [1]. Кроме того, были разработаны эффективные методы регенерации этих сортов для последующей генетической трансформации наиболее перспективных генотипов [1]. Поскольку злаковые, в том числе и ячмень, занимают ведущие позиции на рынке зерна и являются неотъемлемой частью рациона человека, а также в свете острого дефицита продуктов продовольствия во многих странах мира, основными направлениями усовершенствования сельскохозяйственных признаков данной культуры стало привлечение устойчивости ячменя к ряду гербицидов [2–4], болезней [5, 6] и абиотическим стрессам [7]. Возможность же использования этого злака для производства рекомбинантных протеинов, несмотря на перспективность данного подхода [8, 9], изучена незначительно.

Предлагаемая в нашей работе система предполагает использование зерновки ячменя в качестве биореактора для накопления и хранения рекомбинантного человеческого белка лактоферрина. Этот протеин (известный также как лактотрансферрин), представитель семейства трансферринов [10], впервые был выделен из коровьего молока [11]. Дальнейшие исследования показали его наличие в грудном молоке, бронхиальных выделениях, слюне, носовой и вагинальной слизи, сперме и желудочно-кишечном соке человека. Для этого мультифункционального белка характерен широкий спектр биологической активности, в частности он проявляет антимикробное, противовоспалительное и иммуномодулирующее действие. Большое значение имеют исследования

лактоферрина в области его использования как противоракового препарата для лечения лейкемии [12], фибросаркомы, меланомы и колоректальной карциномы [13]. На сегодняшний день с помощью методов генетической инженерии удалось получить экспрессию рекомбинантного лактоферрина человека (*hLF*) в микробных [5, 14], животных [15] и растительных [16, 17] системах.

Несмотря на столь широкий спектр исследований этого белка, эффективную систему экспрессии удалось получить лишь у *Aspergillus* [18], однако она требует дополнительных исследований в области очистки целевого продукта, и у растений риса [19]. Что касается животных систем экспрессии, то они имеют ряд недостатков, таких как длительный процесс получения трансформантов, потенциальная возможность вирусного заражения, сложное материально-техническое обеспечение, дорогостоящий процесс очистки [20]. Таким образом, остается актуальным дальнейший поиск эффективной системы продукции лактоферрина человека. Семена ячменя для этого отвечают многим критериям, в частности накапливают большое количество белков и обеспечивают их длительное хранение.

Важным аспектом получения большого количества трансформированных целевым геном растений является эффективная система селекции трансформантов. Первые работы по генетической трансформации ячменя были сфокусированы на использовании легко детектируемых маркерных генов, таких как *gus* ген, и селективных маркерных генов, обеспечивающих устойчивость к различным антибиотикам и гербицидам [28]. Несмотря на эффективность данных систем селекции и длительную историю их применения, использование подобных маркеров, несущих устойчивость к антибиотикам, в настоящее время подвержено общественной критике. В связи с возникшей ситуацией многие исследования были направлены на разработку новых методик селекции, исключающих внедрение в клетки-реципиенты генов устойчивости к антибиотикам. Было рассмотрено два основных подхода: 1) удаление маркерных генов из генома трансформированных растений после их регенерации; 2) разработка новых маркерных систем,

базирующихся на альтернативных селективных агентах [21].

Первый подход не нашел широкого применения ввиду значительной трудоемкости и отсутствия прогнозируемого результата [21]. Второй подход базировался на принципе модификации селективного агента продуктом маркерного гена в компоненты, позитивно влияющие на трансформированные клетки, сопутствуя, таким образом, росту и развитию трансформированных регенерантов в сравнении с нетрансформированным материалом [21]. Совсем недавно нами была разработана принципиально новая система селекции, основанная на использовании исключительно генетической информации, изначально присутствующей в растительном геноме [22]. Были созданы векторные конструкции, где в качестве селективного маркерного гена использовали ген мутантного α -тубулина из гусиной травы (*Eleusine indica* L.), который обеспечивает устойчивость к динитроанилинам [22]. Эта система была успешно апробирована для получения трансгенных линий табака, льна, палчатого проса и сои [22].

В нашей работе была проведена биолистическая трансформация коммерческих сортов ячменя Водограй, Гетьман и Оксамытовый геном лактоферрина человека (*hLF*). В качестве селективного маркерного гена также был использован мутантный ген α -тубулина, обеспечивающий устойчивость к трифлюралину (гербицид динитроанилинового ряда). В качестве исходного материала для получения культуры эмбрионного каллуса брали зрелые зародыши ячменя, что позволило интенсифицировать работу и избежать сезонной зависимости проведения экспериментов.

Материалы и методы. *Растительный материал.* В качестве эксплантов для получения эмбрионного каллуса использовали зрелые зародыши семян ячменя сортов Гетьман, Оксамытовый и Водограй, любезно предоставленные сотрудниками Института земледелия НААН Украины. Введение в культуру *in vitro* и получение каллусной ткани проводили согласно протоколу, разработанному нами ранее [1].

Создание конструкции. Для биолистической трансформации использовали плазмиду рHFLT_uBA (рис. 1), содержащую ген человечес-

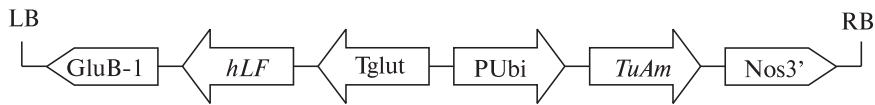


Рис. 1. Схема Т-ДНК конструкции рHLFTuBA. LB и RB – левая и правая границы Т-ДНК, GluB-1 – глутелиновый В-1 промотор риса, *hLF* – ген лактоферрина человека, *Tglut* – глутелиновый терминатор, PUbi – убихитиновый промотор кукурузы, *TuAm* – ген мутантного α-тубулина, Nos3' – нопаиновый терминатор

кого лактоферрина *hLF* и селективный маркерный ген мутантного α-тубулина. Ген лактоферрина человека находился под контролем глутелинового В-1 (GluB-1) промотора риса, а также глутелинового терминатора, ген мутантного α-тубулина (*TuAm*) гусиной травы – под контролем убихитинового (Ubi) промотора кукурузы.

Трансформация и селекция. В работе использовали прибор для бомбардмента, который был собран в нашей лаборатории в соответствии с ранее опубликованной схемой [23]. Для биолиственной трансформации использовали эмбриогенный каллус ячменя. Для трансформации брали вольфрамовые частицы диаметром 0,7 мкм (Duchefa M10). Трансформацию проводили согласно ранее разработанному протоколу [24]. Трансформированный материал высаживали на среду для каллусогенеза и регенерации [1], дополненную 10 мкМ трифлюралина. Селективная концентрация агента была установлена в результате предварительного тестирования чувствительности клеточных линий к различным концентрациям указанного соединения в диапазоне от 0,1 до 30 мкМ. Для каждой концентрации вещества высаживали по 25 эксплантов (калусная ткань) в трех повторностях. Спустя 45 дней снимали показатели относительного прироста массы ткани ячменя. Статистическую обработку данных проводили согласно методу Лакина [25].

Молекулярно-генетический анализ. ПЦР-анализ использовали для подтверждения трансгенной природы отселектированных линий ячменя. Для этого геномную ДНК из листьев трансгенных растений выделяли с помощью набора G2N10–1КТ («Sigma», США). Наличие *hLF*-гена фиксировали в результате амплификации фрагмента этого гена размером 734 п.н., используя пары праймеров *GL-F* (5'-TGTCTTC-CTCGTCCCTGCTGTTCC-3') и *GL-R* (5'-CAT-ACCTCGTCCCTTTCAGCCTCG-3'). ПЦР про-

водили на амплификаторе Thermal Cycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакционная смесь (объемом 25 мкл) содержала пятикратный ПЦР-буфер с сульфатом аммония («Helicon», Россия), 10–50 нг растительной ДНК, по 0,2 мкМ праймеров, по 200 мкМ dNTPs, 0,5 ед. Taq-полимеразы («Fermentas», Литва). Амплификацию проводили при следующих условиях: первичная денатурация: один цикл – 94 °С (3 мин); 45 циклов при 94 °С (30 с), 62 °С (30 с), 72 °С (60 с); окончательная полимеризация – 72 °С (7 мин). Продукты ПЦР разделяли в 1%-ном агарозном геле и окрашивали этидиум бромидом.

Результаты исследований и их обсуждение. Для биолиственной трансформации использовали каллус, полученный из зрелых зародышей ячменя, что позволило значительно упростить и ускорить процесс получения и наращивания исходного материала. Эмбриогенный каллус ячменя трансформировали геном человеческого лактоферрина (*hLF*), который находился под контролем глутелинового В-1 промотора риса, что предположительно обеспечивает экспрессию упомянутого гена исключительно в зерновках злака. Такой подход должен обеспечить высокий уровень экспрессии и накопления протеина, так как семена ячменя способны запасать значительные объемы белков (около 15 % массы зерновки) [9]. Другим немаловажным аспектом применения этой системы для продукции рекомбинантных белков является возможность длительного хранения целевого материала без потери его нативных свойств [9].

В связи с тем, что эффективность трансформации растений напрямую связана с возможностью эксплантов продуцировать эмбриогенную каллусную ткань и ее способностью к регенерации полноценных растений, были отобраны три сорта ячменя, характеризующихся высоким уровнем каллусообразования и регенерации полноценных растений (рис. 2).

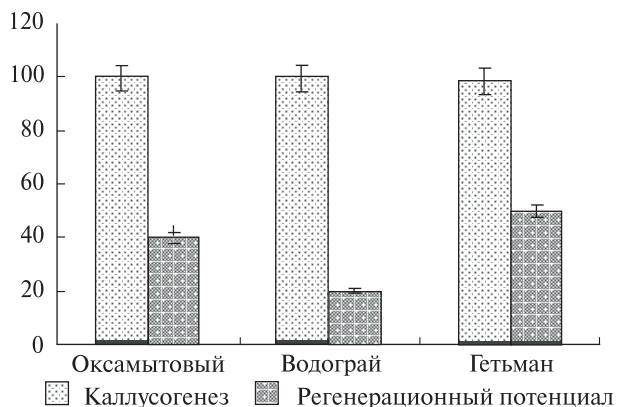


Рис. 2. Эффективность каллусообразования и регенерации растений (по вертикали, %) трех коммерческих сортов ячменя

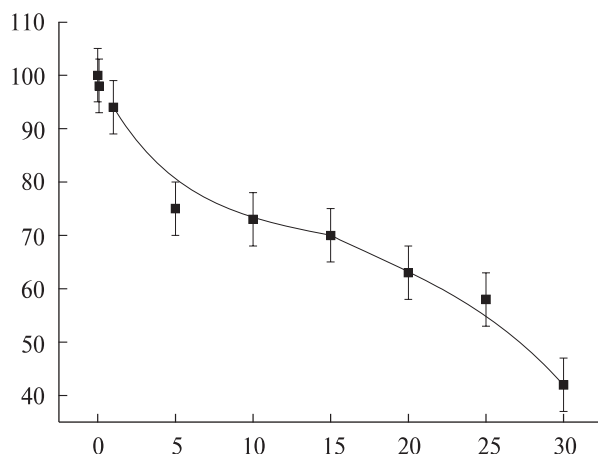


Рис. 3. Определение оптимальной концентрации селективного агента трифлуралаина (по горизонтали, мкМ); по вертикали – относительный прирост массы эксплантов, %

В качестве селективного маркерного гена использовали ген мутантного альфа-тубулина, обеспечивающего устойчивость к гербицидам динитроанилинового ряда. Ввиду того, что трифлуралин как один из самых выраженных представителей этого класса гербицидов отличается высоким сродством к растительному тубулину в сравнении с животным [22], именно он был использован в качестве селективного агента. Несмотря на то, что рассматриваемая система селекции была успешно протестирована на ряде модельных и представляющих коммерческую ценность объектов [22], нами был проведен скрининг

концентраций трифлуралаина в диапазоне от 0,1–30 мкМ (рис. 3 и 4) для селекции трансформентов ячменя.

В результате проведенных экспериментов было отмечено сильное ингибирование процессов регенерации и образование свеллинга корней и стеблей ячменя при высоких концентрациях трифлуралаина (от 15 мкМ и выше). Оптимальная концентрация для дальнейшего отбора трансформированного материала составляла 10 мкМ. При такой концентрации трифлуралаина наблюдали значительное снижение уровня пролиферации клеток, но при этом отсутствовал свеллинг тканей.

Воздействие селективного агента на трансформированный материал становилось заметным только к концу первого месяца культивирования эксплантов на соответствующей среде. Наблюдалась также задержка развития корневой системы, в связи с чем после образования первых корешков трансгенных растений селективное давление на регенеранты убирали. После 2–3 месяцев селекции в присутствии 10 мкМ трифлуралаина были получены три трансгенные линии растений ячменя сорта Оксамытовый (одна линия была утеряна во время адаптации) и каллусная линия сорта Гетьман. Клетки каллуса сорта Гетьман, полученные после длительной селекции на трифлуралаине, приобретали желтоватый оттенок (по сравнению с нативной культурой), сохраняя при этом пролиферативную активность (рис. 5). В процессе дальнейшего культивирования на каллусе указанного сорта формировались зеленые почки с корнеподобными структурами (рис. 5). Данные морфологические образования сохраняли свою жизнеспособность длительное время, однако полноценных фертильных растений не формировали. Каллусная ткань, не формирующая каких-либо морфологических образований, отличалась довольно сильной пролиферативной активностью, однако образование побегов на ней не наблюдалось.

Те полноценные растения-регенеранты, на которых формировалась развитая корневая система, высаживали в грунт и выращивали в условиях 16-часового фотопериода (рис. 6). Для подтверждения стабильной интеграции привнесенного гена был проведен ПЦР-ана-

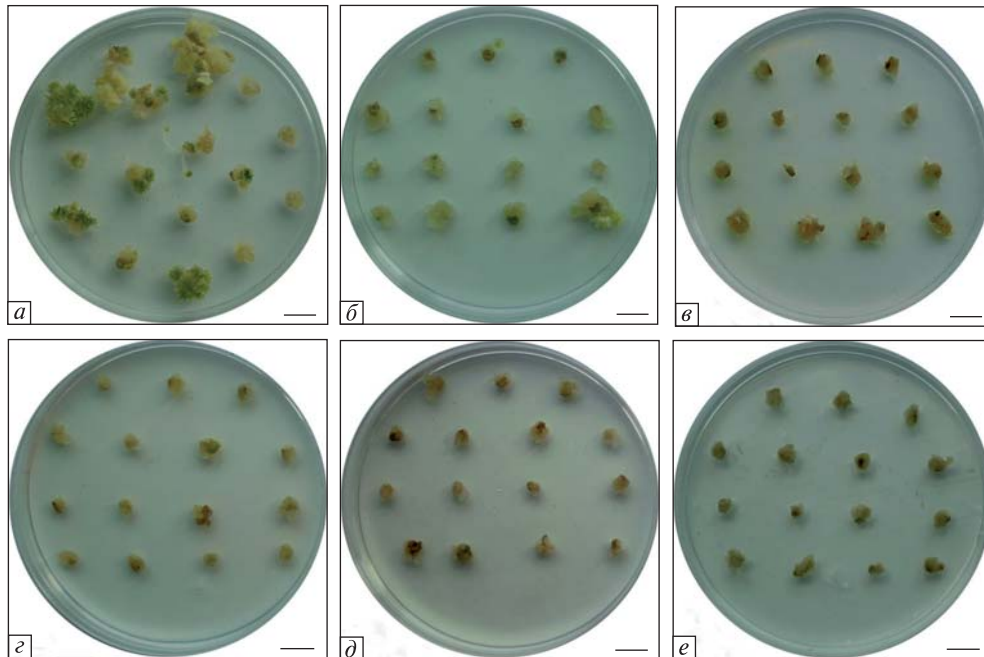


Рис. 4. Влияние различных концентраций трифлуралина на рост каллусной культуры сорта Гетьман: *a* – контроль, *b* – 0,1 мкМ, *v* – 5 мкМ, *z* – 10 мкМ, *d* – 20 мкМ, *e* – 30 мкМ. Бар – 1 см

лиз листьев растений-регенерантов, адаптированных в грунте. ПЦР-анализ подтвердил наличие фрагмента гена *hLF* в клетках-мишенях (рис. 5). Ввиду присутствия в злаковых нативного глютелинового промотора была проведена амплификация специфического фрагмента гена *hLF*, чтобы исключить возможность неспецифической амплификации промотора.

Сходные данные по эффективности трансформации материала, полученного из зрелых семян, были опубликованы ранее. Так, было получено два полноценных трансформанта сорта Харрингтон, несущих ген *bar* [16]. Несколькими годами ранее были получены два трансформанта коммерческого сорта Харуна Найо и четыре растения сорта Дисса из незрелых зародышей ячменя [26]. Более высокая эффективность трансформации была у сорта Баронесса (пять трансгенных растений), в то время как модельный сорт Голден Промис продемонстрировал сравнительно низкий уровень трансформации (два трансгенных растения) [27]. Был опубликован протокол получения трансформированных растений-регенерантов

Биолистическая трансформация разных сортов ячменя геном лактоферрина человека

Сорта	Количество, шт.			
	эксплантов	устойчивых к трифлуралину линий	регенерировавших растений	растений, экспрессирующих ген <i>hLF</i>
Оксамытовый	100	3	2	2
Водограй	100	–	–	–
Гетьман	100	10	–	*

* Каллусные линии сорта Гетьман не были тестированы с помощью ПЦР-анализа, ввиду низкого выхода концентрации ДНК при выделении китом G2N10-1KT («Sigma», США).

из незрелых зародышей ячменя с использованием сорта Харингдон, эффективность трансформации которого также не превышала двух трансгенных растений, и сорта Голден Промис, эффективность трансформации которого составляла четыре трансгенных регенеранта [28].

Сходная эффективность регенерации была получена и на модельном сорте Конлон

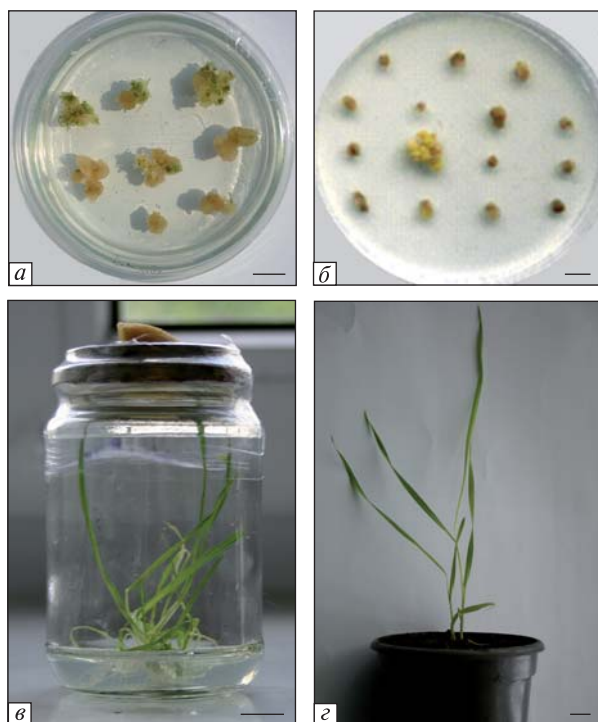


Рис. 5. Результаты селекции трансгенных линий ячменя на 10 мкМ трифлуралина: *a* – калусная линия сорта Гетьман с зелеными почкообразными структурами; *b* – селекция калусной ткани сорта Оксамытовий; *v* – укоренение растения-регенеранта сорта Оксамытовий; *z* – трансгенное растение сорта Оксамытовий в условиях теплицы. Бар – 1 см

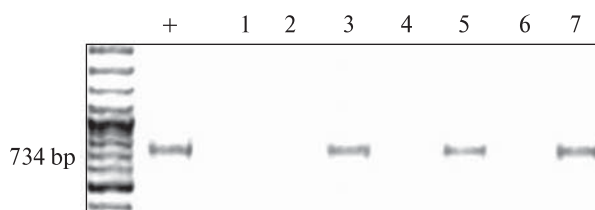


Рис. 6. ПЦР-анализ трансгенных линий ячменя, несущих ген лактоферрина человека (*hLF*): М – маркер, «+» – плаزمида pHLFTuBA (позитивный контроль), 1 – негативный контроль; 2 – нетрансформированный ячмень (негативный контроль); 3, 5, 7 – трансформированные линии ячменя, полученные вследствие селекции на трифлуралине; 4, 6 – вода

[29]. Трансформация калусной ткани, полученной из незрелых зародышей модельного сорта Голден Промис, также не отличалась высоким уровнем эффективности трансформации (три растения-регенеранта), при этом

наблюдали образование значительного количества хлорофилл-дефектных растений [30]. Обойти проблему регенерации хлорофилл-дефектных растений удалось несколькими годами позже путем изменения концентрации селективного агента или при использовании метода ступенчатой селекции [28]. В нашей работе не было зафиксировано хлорофилл-дефектных растений ни во время изучения регенерационного потенциала используемых в работе сортов [1], ни во время трансформации и селекции трансгенных линий.

Таким образом, в настоящей работе осуществлена эффективная биолистическая трансформация ячменя целевым геном лактоферрина (*hLF*) с применением новой системы селекции, базирующейся на использовании мутантного гена α -тубулина в качестве селективного маркерного гена. Результаты ПЦР-анализа подтвердили стабильную интеграцию гена (*hLF*) в клетки мишени.

I.V. Tanasienko, A.I. Yemets, Y.V.

Pirko, V.I. Korhkovyy, N. Abumhadi, Ya.B. Blume

PRODUCTION OF TRANSGENIC BARLEY LINES PRODUCING HUMAN LACTOFERRIN USING MUTANT ALFA-TUBULIN GENE AS SELECTIVE MARKER GENE

Method of biolistic transformation was used for genetic improvement of commercial barley cultivars (Oksamitoviy, Vodogray and Getman). The plasmid pHLFTuBA was used for particle bombardment that consists of the *hLF* gene under the control of the barley glutelin B-1 promoter and a selectable marker gene, α -tubulin conferring resistance to trifluralin (dinitroanilin herbicide). Preliminary screening of different trifluralin concentration range from 0,1 to 30 μ M was tested for determination of effective selective agent concentration. Two transgenic barley line of genotype Oksamitoviy and transgenic callus line of cultivar Getman were obtained after selection on 10 μ M of trifluralin. To confirm the transgenic nature of regenerated plants, the PCR analysis was carried out. The 734bp length fragment of *hLF* gene was amplified from both regenerated plants.

I.V. Tanasienko, A.I. Emetz, Y.V. Pirko,

V.I. Korhkoviy, N. Abumhadi, Ya.B. Blume

ОТРИМАННЯ ТРАНСГЕННИХ ЛІНІЙ ЯЧМЕНЮ, ЩО ПРОДУКУЮТЬ ЛАКТОФЕРРИН ЛЮДИНИ, ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ МУТАНТНОГО ГЕНА АЛЬФА-ТУБУЛІНУ ЯК СЕЛЕКТИВНОГО МАРКЕРНОГО ГЕНА

Метод біолистичної трансформації використовували для генетичного вдосконалення трьох комерційних

сортів ячменю вітчизняної селекції (Оксамитовий, Водограй і Гетьман). Для трансформації використовували конструкцію рНЛFTuBA, що містила ген інтересу, ген людського лактоферину (*hLF*) під контролем глутелінового В-1 (*GluB-1*) промотору рису. Як селективний маркерний ген використовували ген мутантного α -тубуліну, що забезпечував стійкість до трифлораліну (гербіцид динітроанілінового ряду). Для встановлення селективної концентрації агенту було проведено скринінг різних концентрацій трифлораліну в діапазоні від 0,1 до 30 мкМ. Після 2–3 місяців селекції на 10 мкМ трифлораліну було отримано дві трансгенні лінії рослин ячменю сорту Оксамитовий та калусну лінію сорту Гетьман. Для підтвердження стабільної інтеграції гена *hLF* було проведено ПЦР-аналіз листків рослин-регенерантів після їх адаптації в ґрунті. В обох лініях було ампліфіковано фрагмент гена розміром 734 п.н.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Танасиенко И.В., Емец А.И., Блюм Я.Б. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации яровых сортов ячменя, районированных на территории Украины // Цитология и генетика. – 2009. – 43, № 4. – С. 12–19.
2. Farago J., Nemcova, L. Regeneration of bialaphos resistant plants after biolistic transformation of two commercial cultivars of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) grown in Slovakia // Vedecke-Prace. – 2001. – 30. – P. 169–176.
3. Manoharan M., Dahleen L.S. Genetic transformation of commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivar Conlon by particle bombardment of callus // Plant Cell Rep. – 2002. – 21. – P. 76–80.
4. Assem S.K., Hussein Ebtissam H.A., Saad M.E., El-Itriby H.A., Madkour M.A. Comparison of the efficiency of some novel maize promoters in monocot and dicot plants // Arab J. Biotech. – 2002. – 5. – P. 57–66.
5. Wang M., Abbott D., Upadhyaya N., Jacobsen J., Waterhouse P. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes // Aust. J. Plant Physiol. – 2001. – 28. – P. 149–156.
6. Sharma V., Monostori T., Gobel C., Hansch R., Bittner F., Wasternack C., Feussner I., Mendel R., Hause B., Schulze J. Transgenic barley overexpressing a 13-lipoxygenase to modify oxylipin signature // Phytochemistry. – 2006. – 67. – P. 264–276.
7. Delhaize E., Ryan P., Hebb D., Yamamoto Y., Sasaki T., Matsumoto H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2004. – 101. – P. 15249–15254.
8. Dahleen L.S., Manoharan M. Recent advances in barley transformation // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. – 2007. – 43. – P. 493–506.
9. Ritala A., Wahlstrom E., Holkeri H., Malkelainrn K., Baez J., Makinen K., Nuutila A. Production of recombinant industrial protein using barley cell cultures // Protein Exp. Purif. – 2008. – 59. – P. 274–281.
10. Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M. Lactoferrin: a review // Vet. Med. – 2008. – 53. – P. 457–468.
11. Sorensen M., Sorensen S. The proteins in whey // Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg. – 1939. – 23. – P. 55–99.
12. Yoo Y., Watanabe R., Koike Y., Mitobe M., Shimazaki K., Watanabe S. Apoptosis in human leukemic cells induced by lactofer-ricin, a bovine milk protein-derived peptide: involvement of reactive oxygen species. Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – 237. – P. 624–628.
13. Eliassen L.T., Berge G., Sveinbjornsson B., Svendsen J.S., Vorland L.H., Rekdal O. Evidence for a direct anti-tumor mechanism of action of bovine lactoferricin // Anticancer Res. – 2002. – 22. – P. 2703–2710.
14. Liang Q., Richardson T. Expression and characterization of human lactoferrin in yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J. Agr. Food Chem. – 1993. – 41. – P. 1800–1807.
15. Van Berkel H., Nuijens H., Van Veen A., Abrahams P., Thomassen J. The protein structure of recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows closely matches the structure of human milk-derived lactoferrin // Transgenic Res. – 2005. – 14. – P. 397–405.
16. Zhang Z., Coyne P., Vidaver K., Mitra A. Expression of human lactoferrin cDNA confers resistance to *Ralstonia solanacearum* in transgenic tobacco plants // Phytopathology. – 1998. – 88. – P. 730–734.
17. Anzai H., Takaiwa F., Katsumata K. Production of human lactoferrin in transgenic plants // Lactoferrin: Structure, Function and Applications / Eds K. Shimazaki, H. Tsuda, M. Tomita, T. Kuwata, P. Perraudin. – Amsterdam : Elsevier, 2000. – P. 265–271.
18. Ward P., Piddington C., Cunningham G., Zhou X., Wyatt R., Conneely O. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic // Biotechnol. – 1995. – 13. – P. 498–503.
19. Nandi S., Yalda D., Lu S., Nikolov Z., Fujiyama K., Huang N. Process development and economic evolution of recombinant human lactoferrin expressed in rice grain // Transgenic Res. – 2005. – 14. – P. 237–249.
20. Stefanova G., Vlahova M., Atanassov A. Production of recombinant human lactoferrin from transgenic plants // Biol. Plant. – 2008. – 52. – P. 423–428.
21. Chen I., Thiruvengadam V., Lin W.-D., Chang H.-H., Hsu W.-H. Lysine racemase: a novel non-antibiotic selectable marker for plant transformation // Plant Mol. Biol. – 2009. – 72. – P. 153–169.
22. Yemets A., Radchuk V., Bayer O., Bayer G., Pakhomov A., Vance Baird W., Blume Y.B. Development of transformation vectors based upon a modified plant alpha-tubulin gene as the selectable marker // Cell Biol. Int. – 2008. – 32. – P. 566–570.

23. *Finer J., Vain P., Jones M., McMullen M.* Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells // *Plant Cell Rep.* – 1992. – **11**. – P. 232–238.
24. *Abumhadi N., Trifonova A., Takumi S., Nakamura C., Todorovska E., Getov L., Christov N., Atanassov A.* Development of the particle inflow gun and optimizing the particle bombardment method for efficient genetic transformation in mature embryos of cereals // *Biotechnol. Biotec. Eq.* – 2001. – **15**. – P. 87–96.
25. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – С. 352.
26. *Hagio T., Hirabayashi T., Machii H., Tomotsune H.* Production of fertile transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plant using the hygromycin-resistance marker // *Plant Cell Rep.* – 1995. – **14**. – P. 329–334.
27. *Ahlandsberg S., Sathish P., Sun C., Jansson C.* Green fluorescent protein as a reporter system in the transformation of barley cultivars // *Physiol. Plant.* – 1999. – **107**. – P. 194–200.
28. *Cho M.-J., Jiang W., Lemaux G.* Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism // *Plant Sci.* – 1998. – **138**. – P. 229–244
29. *Tobias D., Manoharan M., Pritsch C., Dahleen L.* Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Conlon) // *Plant Cell Rep.* – 2007. – **26**. – P. 631–639.
30. *Wan Y., Lemaux P.G.* Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plant // *Plant Physiol.* – 1994. – **104**. – P. 37–48.

Поступила 10.09.09