БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ, БИОТЕХНОЛОГИЯ И АКВАКУЛЬТУРА

УДК 602.62/.64:579

DOI: 10.21072/eco.2024.09.1.04

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Челебиева Э. С.[1], Кладченко Е. С.[1], Данцюк Н. В.[1], Боровков А. Б.[1], Водясова Е. А.[1,2]

[1] *ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН», г. Севастополь, Российская Федерация,*

[2] *ФГБУН «Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Российская Федерация,*

e-mail: elina.chelebieva@gmail.com

Аннотация: В данном обзоре обобщается информация о применении методов генной инженерии для модификации диатомовых и зелёных микроводорослей с целью получения штаммов с улучшенными или заданными признаками. Рассматриваются кратко основные методы, достигнутые результаты и перспективы использования генетически модифицированных штаммов микроводорослей в биотехнологии. Представлены успешные примеры применения методов направленного редактирования генома для модификации модельных видов микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard, 1888 и *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897. Показано, что нокауты и оверэкспрессия ключевых генов позволяют значительно увеличивать накопление липидов в биомассе водорослей без существенного влияния на рост, демонстрируя перспективность данного подхода в оптимизации биотехнологического потенциала штаммов.

Ключевые слова: микроводоросли, генная инженерия, биотехнология, продуценты

Введение

В последнее время изменение климата, рост населения и увеличение потребления энергии сместили интерес исследователей к поиску альтернативных её источников из возобновляемых ресурсов [Hossain et al., 2020; Goswami et al., 2022; Peter et al., 2022]. Микроводоросли — это фотоавтотрофные эукариотические организмы, способные преобразовывать солнечную энергию в химическую посредством фотосинтеза [Kholssi, Lougraimzi, Moreno-Garrido, 2023]. Они играют ключевую роль в глобальном углеродном цикле, биогеохимическом круговороте питательных веществ и биоремедиации [Worden et al., 2015; Novoveska et al., 2019].

Микроводоросли способны накапливать высокоценные пигменты и липиды, которые в дальнейшем могут быть использованы для производства биотоплива, нутрицевтиков, косметических продуктов, пищевых добавок и фармацевтических препаратов, а также в процессах биоремедиации [Brennan, Owende, 2010; Ng et al., 2017; Xu et al., 2019; Zulu et al., 2018; Kalra, Gaur, Goel, 2021; Cao et al., 2023]. Пигменты, экстрагируемые из микроводорослей, считаются более безопасными по сравнению с синтетическими аналогами и демонстрируют высочайшую биологическую активность с точки зрения антиоксидантных свойств, что обуславливает их растущую популярность на мировом рынке пигментов [Basheer et al., 2020; Patel et al., 2022; Cao et al., 2023]. Например, кетокаротиноид астаксантин, продуцируемый зелёной микроводорослью *Haematococcus lacustris* (Girod-Chantrans) Rostafinski, 1875, считается мощнейшим

природным антиоксидантом: его активность превосходит активность витамина Е в 500 раз [Ambati et al., 2019]. Фикобилипротеины, такие как фикоэритрин и фикоцианин, выделенные из красных и сине-зелёных водорослей соответственно, находят применение в биомедицинских исследованиях благодаря своим уникальным спектральным характеристикам [Sonani et al., 2017]. Фукоксантин, обладающий значительными противовоспалительными свойствами, и сцитонемин, являющийся сильнейшим УФ-протектором, — уникальные пигменты, получаемые из водорослей, пока не могут быть синтезированы другими микроорганизмами [Gao et al., 2021; Wang et al., 2021]. Некоторые виды, такие как *Dunaliella salina* (Dunal) Teodoresco, 1905, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897 и *Nannochromopsis oceanica* Suda & Miyashita, 2002, могут накапливать до 50–70 % общего количества липидов в биомассе [Xin et al., 2024; Song et al., 2024]. Состав липидов микроводорослей включает как насыщенные жирные кислоты (НЖК), так и длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). НЖК могут быть использованы для производства биодизельного топлива и других олеохимических продуктов [Klievik et al., 2023]. К длинноцепочечным ПНЖК относятся незаменимые докозагексаеновая кислота (DHA, 22:6, ω-3) и эйкозапентаеновая кислота (EPA, 20:5, ω-3), они обеспечивают многофункциональное воздействие на организм человека, влияя на когнитивные способности, снижая риск развития ишемической болезни сердца, онкологических и нейродегенеративных заболеваний [Ohnishi, Saito, 2013; Calder, 2018; Basheer et al., 2020].

Ожидается, что мировой рынок микроводорослей будет расти и к концу 2027 года выручка составит примерно 1,37 миллиарда долларов США [Cao et al., 2023]. Однако коммерческое производство пигментов и липидов из микроводорослей сталкивается с существенными ограничениями, включая высокие затраты на производство, строгие требования к условиям культивирования, чувствительность к загрязнению и накоплению определённых пигментов [Hu et al., 2018; Cao et al., 2023; Webster et al., 2024]. К примеру, несмотря на большое число видов микроводорослей, перспективных для коммерческого производства чрезвычайно востребованного кетокаротиноида астаксантина (*Chromochloris zofingiensis* (Dönz) Fucíková & L.A.Lewis, 2012 (= *Chlorella zofingiensis* Dönz, 1934; *H. lacustris* (= *Haematococcus pluvialis* Flotow, 1844); *Coelastrella rubescens* (Vinatzer) Kaufnerová & Eliás, 2013; *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss, 1965; *Tetraselmis* sp.; *Scenedesmus* sp. *и* др.), в настоящее время промышленное получение астаксантина основано на единственном виде — *H. lacustris* [Webster et al., 2024]. При этом у *H. lacustris* есть ряд недостатков, которые затрудняют его коммерческое культивирование: медленный рост, узкий диапазон температурной устойчивости, слабая устойчивость вегетативных клеток к стрессу, высокий риск контаминации, жёсткие клеточные стенки зрелых апланоспор [Solovchenko, 2015; Xu et al., 2023]. В настоящее время *H. lacustris* является наиболее изученным видом микроводорослей, способным накапливать вторичные каротиноиды. Это делает его удобным модельным организмом для исследований. Кроме того, *H. lacustris* — единственный вид микроводорослей, который имеет статус промышленного источника природного астаксантина. Эти факторы требуют разработки эффективных стратегий для оптимизации производства и улучшения устойчивости культур к внешним воздействиям. С целью повышения продуктивности биомассы микроводорослей активно разрабатываются и внедряются различные подходы, среди которых особенно интересны методы генной инженерии и синтетической биологии [Ng et al., 2017; Cao et al., 2023]. Применение методов генной инженерии, таких как РНК-интерференция, трансгенез и редактирование генома, открывает возможности для направленной модификации метаболических путей микроводорослей с целью оптимизации накопления ценных соединений [Diao et al., 2020; Liang Z., Liang M., Jiang J., 2020; Sun et al., 2018; Sun et al., 2021; Nora et al., 2019; Cao et al., 2023].

В данной работе мы обобщаем информацию о трудностях использования методов генной инженерии при работе с микроводорослями, резюмируем результаты их применения для увеличения продуктивности микроводорослей и выхода целевых продуктов (например, каротиноидов, терпеноидов, вакцин, фармацевтических препаратов, ценных ферментов промышленного назначения и т. п.) и описываем перспективы использования генетически модифицированных штаммов.

Методы генетической трансформации микроводорослей

Микроводоросли представляют собой перспективные объекты для биотехнологии благодаря возможности их культивирования в крупных масштабах и контролируемых условиях, использованию фотосинтеза для фиксации углерода и высокой устойчивости [Kazamia, Smith, 2014; Mao et al., 2020; Zhang et al., 2021; Patel et al., 2022]. Однако существует ряд технологических проблем, которые могут быть преодолены с помощью генетических методов и принципов синтетической биологии [Scaife, Smith, 2016; Moses et al., 2017]. Генная инженерия даёт возможность управления метаболическими путями и генами для создания эффективных штаммов. На начальном этапе необходимо, в зависимости от цели, выбрать хозяина, гены-мишени, системы селекции и инструменты редактирования ДНК. Основные этапы в области геномных модификаций микроводорослей представлены на рисунке 1.

Рис. 1. Основные этапы в области геномных модификаций микроводорослей

В настоящее время разработано множество инструментов, позволяющих направленно редактировать геном или направленно изменять транскрипцию, которые могут быть применены для широкого спектра организмов. Основные этапы включают в себя создание вектора, трансформацию и селекцию [Andrianantoandro et al., 2006; Ng et al., 2017; Jagadevan et al., 2018]. Недостаточная эффективность методов трансфекции становится основным препятствием на пути разработки штаммов. Среди основных методов трансформации микроводорослей можно выделить электропорацию, биобаллистическую бомбардировку и бактериальную конъюгацию, в том числе и использование *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend, 1907 [Wang et al., 2012; Ng et al., 2017]. Отдельно стоит выделить хлоропластную трансформацию микроводорослей.

Бактериальная конъюгация представляет собой перенос плазмидной ДНК от бактерии к другому организму. Этот механизм является универсально консервативным и обычно содержит все необходимые гены как для вертикального, так и для горизонтального переноса ДНК [Virolle et al., 2020]. Конъюгацию можно использовать для переноса плазмид в микроводоросли. Данный метод широко применяется для цианобактерий, его эффективность для эукариотических водорослей ограничена способностью штамма-реципиента получать и сохранять чужеродную ДНК [Gutiérrez, Lauersen, 2021]. Методы конъюгации разработаны для многих микроводорослей, таких как *Acutodesmus obliquus*, *Neochloris oleoabundans* [Muñoz et al., 2021] и *P. tricornutum* [Sharma et al., 2018]. Агробактериальная трансформация происходит с использованием *A. tumefaciens*, почвенной бактерии, вызывающей болезнь корончатого галла, и представляет собой эффективный метод доставки ДНК в растения [Fu et al., 2016]. В 2004 году впервые было доказано, что *A. tumefaciens*, содержащая гены uidA, gfp и hpt, успешно трансформирует ядерный геном *C. reinhardtii*, что обеспечивает значительно более высокую эффективность по сравнению со стеклянными шариками [Kumar et al., 2004]. С тех пор трансформация, осуществляемая с использованием агробактерии, стала ещё более популярной и успешной.

Электропорация включает применение электрических импульсов для создания временных пор в клеточных мембранах, что позволяет внедрить экзогенную ДНК в клетку. Электропорация проводится в специально разработанных кюветах и камерах, где высокоинтенсивные электрические импульсы позволяют крупным молекулам, включая ДНК, пройти через фосфолипидный бислой клеточной мембраны [Rathod et al., 2017]. Оптимизация включает в себя интенсивность, длительность и количество электрических импульсов, используемых для повышения эффективности доставки экзогенной ДНК, но обычно устанавливается в диапазоне от 600 до 6000 В, от 2 до 500 мс и от 1 до 15 импульсов [Coll, 2006]. Эффективность трансформации варьирует в зависимости от диаметра клеток и состава клеточной мембраны, толщины клеточной стенки, концентрации клеток или скорости деления. Электропорация была впервые успешно использована в экспериментах с зелёной микроводорослью *C. reinhardtii* [Shimogawara et al., 1998], что увеличило эффективность трансформации в 100 раз по сравнению с предыдущими методами. С тех пор методы электропорации были разработаны для многих видов, включая *N. oceanica* [Kilian et al., 2011] и *P. tricornutum* [Niu et al., 2012].

Биобаллистическая бомбардировка является распространённым методом для внедрения ДНК в клетки, так как его можно применять для трансформации ядерных, митохондриальных или хлоропластных геномов [Gutiérrez, Lauersen, 2021]. Метод заключается в выстреливании из специального устройства — «пушки» — металлических частиц, покрытых ДНК. Биобаллистическая бомбардировка была использована для трансформации многих видов микроводорослей, включая *H. lacustris* [Yuan et al., 2019], *P. tricornutum* [Apt, Grossman, Kroth-Pancic, 1996], ядер [Debuchy, Purton, Rochaix, 1989] и хлоропластов *C. reinhardtii* [Ramesh, Bingham, Webber, 2011]. Это один из немногих методов, позволяющих специфически трансформировать ДНК хлоропластов или митохондрий. Биобаллистическая бомбардировка применяется для генетической модификации микроводорослей, когда требуется трансформация органелл или преодоление барьеров клеточной стенки.

Хлоропластная трансформация проводится для фотосинтезирующих организмов [Manuell et al., 2007; Day, Goldschmidt-Clermont, 2011; Gan et al., 2018] с целью биопроизводства каротиноидов, терпеноидов, вакцин, фармацевтических препаратов и ценных ферментов промышленного значения [Siddiqui et al., 2020; Occhialini et al., 2020]. Первая трансформация хлоропласта описана для C. reinhardtii в конце 1980-х годов [Boynton et al., 1988]. В хлоропласте C. reinhardtii было показано функционирование маркера устойчивости к антибиотикам aadA, репортера b-глюкуронидазы и системы репрессоров lac [Goldschmidt-Clermont, 1991; Ishikura et al., 1999; Kato et al., 2007]. Для гаптофитной микроводоросли *Tisochrysis lutea* был создан вектор трансформации хлоропласта, несущий ген устойчивости к фосфинотрицину [Bo et al., 2020].

Трансформация хлоропластов имеет ряд преимуществ перед ядерной трансформацией, в том числе благодаря отсутствию эпигенетических эффектов и материнскому наследованию пластид [Verma, Daniell, 2007; Tabassum et al., 2024]. В отличие от ядерных трансгенов, трансгены, интегрированные в геном хлоропластов, могут обеспечивать сверхэкспрессию нескольких целевых белков на очень высоком уровне. По сравнению с инженерией ядерных генов, трансформация генома хлоропластов даёт возможность направленной вставки трансгенов посредством гомологичной рекомбинации. Кроме того, в хлоропластах легко происходит высокоуровневая экспрессия трансгенов и компартментализованное избыточное накопление белков, содержащих дисульфидные связи, и предотвращается нежелательное гликозилирование [Tissot-Lecuelle et al., 2014]. Это объясняется тем, что в хлоропластах содержится множество копий генома на клетку и отсутствует сайленсинг генов. Хлоропластная трансформация также обеспечивает высокий уровень рекомбинантных белков, это позволяет одновременно экспрессировать несколько генов из оперонов без возникновения эффектов положения.

Для успешной хлоропластной трансформации необходимо выполнение трёх ключевых условий: выбор надёжного метода доставки ДНК, наличие активного аппарата гомологичной рекомбинации и высокоэффективные протоколы отбора и регенерации [Adem, Beyene, Feyissa, 2017]. Хлоропластная трансформация может осуществляться посредством прямого или непрямого переноса генов. Подход прямого переноса генов включает физические или химические реакции, в то время как метод непрямого переноса генов использует биологические векторы для введения генов в целевую клетку/ткань [Kumar, Ling, 2021; Siddiqui et al., 2020; Bo et al., 2020].

Таким образом, использование хлоропластов в качестве векторов для трансгенов представляет собой перспективный подход в биотехнологии, позволяющий эффективно производить целевые белки с минимальными побочными эффектами.

РНК-интерференция в микроводорослях

РНК-интерференция (РНК-и) была впервые описана A. Fire и соавторами в 1998 г. [Fire et al., 1998]. Они установили, что двухцепочечные РНК могут выступать в качестве мощного и специфического негативного регулятора экспрессии генов в нематоде *Caenorhabditis elegans*. РНК-и представляет собой консервативный процесс у эукариот, при котором малые РНК (длиной 20–30 нуклеотидов) вызывают инактивацию целевой последовательности с использованием различных механизмов, включая ингибирование трансляции, деградацию РНК и/или транскрипционную репрессию [Cerutti, Casas-Mollano, 2006; Carthew, Sontheimer, 2009; Meister, 2013; Wei et al., 2017; Liang et al., 2019].

У большинства видов водорослей пути РНК-и остаются практически неизученными даже на уровне выявления важнейших генных факторов в секвенированных геномах. Тем не менее анализ 14 видов микроводорослей с секвенированными геномами показывает, что основные компоненты механизма RNAi, по-видимому, полностью отсутствуют у нескольких водорослей с небольшими ядерными геномами, таких как красные водоросли *Cyanidioschyzon merolae* и *Galdieria sulphuraria*, а также зелёных водорослей *Ostreococcus lucimarinus*, *Ostreococcus tauri*, *Bathycoccus prasinos* и *Micromonas pusilla*. Это согласуется с гипотезой о том, что механизм РНК-и появился рано, в ходе эволюции эукариот, и был утрачен независимо в нескольких линиях, и, следовательно, компоненты механизма РНК-и присутствуют у видов водорослей каждого из *Glaucophyta*, *Rhodophyta u Chlorophyta*, но с сильным распределением [Kim, Ma, Cerutti, 2015].

В микроводорослях РНК-и как инструмент обратной генетики был установлен лишь для нескольких видов [Cerutti et al., 2011; Liang et al., 2019]. Первое сообщение о применении РНК-и в микроводорослях было сделано в результате исследований *C. reinhardtii*, когда была разработана система, состоящая из трансгенов с тандемными инвертированными повторами, которые последовательно вызывали совместное замолкание целевых генов [Rohr et al., 2004]. У *P. tricornutum* были успешно использованы конструкции, содержащие антисмысловые или инвертированные повторяющиеся последовательности выбранных генов-мишеней [De Riso et al., 2009]. Наиболее значительный объём работ за последние годы по использованию РНК-и для регулирования или отключения экспрессии генов был выполнен на *C. reinhardtii* [Rosales-Mendoza, Paz-Maldonado, Soria-Guerra, 2012; Somchai et al., 2016; Charoonnart, Purton, Saksmerprome, 2018]. Вероятно, требования к сопряжению оснований для опосредованной малыми РНК репрессии у данной микроводоросли более сходны с таковыми у многоклеточных по сравнению с обширной комплементарностью, характерной для наземных растений, что позволяет использовать миРНК *Chlamydomonas* в качестве потенциального модулятора экспрессии многочисленных эндогенных мишеней благодаря этим смягчённым требованиям к сопряжению оснований. Таким образом, использование РНК-и в микроводорослях успешно и может применяться для понижения экспрессии или нокдауна целевых генов, а также является перспективным подходом к генетическим модификациям.

Направленное редактирование генома микроводорослей

За последние два десятилетия наблюдается значительный прогресс в области редактирования генома. Нуклеазы «цинковых пальцев» (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и система CRISPR/Cas были адаптированы для введения направленных двухцепочечных разрывов ДНК в эукариотические клетки [Kim, Cha, Chandrasegaran, 1996; Christian et al., 2010]. ZFN были созданы путём слияния доменов связывания ДНК «цинковых пальцев» белков с доменом расщепления эндонуклеазы для формирования функционального димера, расщепляющего ДНК в целевых локусах. Аналогично ZFN, TALEN сконструированы путём слияния ДНК-связывающего домена, производного от транскрипционных активаторов, подобных эффекторам, и неспецифического домена расщепления ДНК [Kroth et al., 2018]. Однако, несмотря на широкое использование ZFN и TALEN в качестве инструментов редактирования генома, известно лишь несколько успешных, включая первый отчёт о редактировании генома с использованием ZFN у *Chlamydomonas* [Sizova et al., 2013; Daboussi et al., 2014; Kurita et al., 2020; Greiner et al., 2017]. Сложность конструирования и низкая эффективность редактирования также ограничивают применение ZFN и TALEN.

В отличие от ZFN и TALEN система CRISPR/Cas9 является более простым и эффективным инструментом редактирования генома [Jeong, Jang, Jin, 2023]. Она основана на бактериальной системе CRISPR/Cas9 противовирусной защиты и включает два компонента: белок Cas9 и одноцепочечную гидовую РНК (sgRNA). Изменяя последовательности sgRNA, можно легко нацеливаться на новую геномную последовательность, что делает систему CRISPR/Cas9 мощным инструментом редактирования генома. Для дизайна sgRNA требуются полные геномные данные для предотвращения нецелевых эффектов. Система CRISPR/Cas9, представляющая собой рибонуклеопротеиновый комплекс, состоящий из Cas ДНК-эндонуклеаз и небольших, обработанных CRISPR РНК, использует последовательность направляющей РНК длиной ~20 п. н. (sgRNA или gRNA — гидовые РНК), которая распознаёт и связывается с целевой ДНК через сопряжение оснований. Система CRISPR/Cas9 не полагается на сложное взаимодействие последовательности белок-ДНК для распознавания мишени. Она зависит только от сопряжения оснований РНК-ДНК, что делает систему более универсальной в разработке и реализации и менее дорогой, чем системы распознавания белков, где сложность и трудность разработки и синтеза белков может стать препятствием [Shalem, Sanjana, Zhang, 2015]. Система CRISPR/Cas9 может быть использована для одновременного редактирования нескольких целевых участков генома с помощью нескольких направляющих РНК в одном массиве CRISPR/Cas9 [Liang et al., 2019]. Геном *C. reinhardtii* впервые отредактирован с помощью технологии CRISPR/Cas9 в 2014 году [Jiang et al., 2014]. В этом исследовании успех в транзиторной экспрессии генов Cas9 и sgRNA контрастировал с восстановлением только одной устойчивой к рапамицину колонии, несущей соответствующим образом модифицированный целевой сайт FKB12, в 16 независимых экспериментах по трансформации с участием >109 клеток. Неспособность восстановить трансформанты с интактными или экспрессированными генами Cas9 после трансформации только геном Cas9 (или даже геном, кодирующим Cas9, лишённый нуклеазной активности) предоставила убедительные доказательства токсичности Cas9 при конститутивном продуцировании Cas9 в *C. reinhardtii.* Позже та же группа исследователей трансформировала мутант конструкциями Cas9/intron-sgRNA и соответствующим образом разработанными синтетическими ssDNA длиной 80 нуклеотидов, комплементарными гену аргининосукцинатлиазы (ARG), что привело к успешной гомологичной рекомбинации [Jiang, Weeks, 2017].

Высокоэффективная система на основе CRISPR/Cas9 была оптимизирована для создания стабильных целевых нокаутов генов у диатомовой микроводоросли *P. tricornutum*. Оптимизированный для диатомовых кодонов Cas9 управлялся промотором гена хлорофилл a/c-связывающего белка фукоксантина (LHCF2), а sgRNA находилась под контролем промотора U6 *P. tricornutum* [Nymark et al., 2016]. С использованием в качестве модельного организма микроводоросли *N. oceanica* IMET1 был создан эффективный метод направленного генного нокаута микроводорослей на основе CRISPR/Cas9 при использовании sgRNA-направленного белка Cas9 для расщепления специфически направленных последовательностей ДНК, соответствующих sgRNA [Wang et al., 2016]. Метод позволил примерно в 10 раз повысить эффективность создания мутантных штаммов с направленным нокаутом генов, что на несколько порядков выше, чем в случае с *C. reinhardtii* [Jiang et al., 2014]. В последнее время CRISPRi — новый подход, сходный с традиционной РНК-интерференцией, применяется в метаболической инженерии для манипулирования даунрегуляцией генов в определённых путях с продуктами, представляющими интерес. Поскольку CRISPRi осуществляет регуляцию генов без двунитевых разрывов, у трансформантов не возникает проблем, характерных для методов редактирования генов, таких как случайное встраивание генов не по назначению.

Достижения в геномных модификациях микроводорослей

Диатомовые водоросли

Генная инженерия для диатомовых водорослей сталкивается с ограничениями из-за отсутствия эффективных методов редактирования генома, несмотря на увеличение количества секвенированных видов микроводорослей. До недавнего времени в экспериментах с диатомеями были доступны только посттранскрипционное снижение экспрессии генов (РНК-и) или использование линий с переизбытком экспрессии генов [Russo et al., 2023].

Для модельной диатомовой водоросли *P. tricornutum* было успешно продемонстрировано применение транскрипционных активатор-подобных эффекторных нуклеаз (TALENs) для направленного мутагенеза или вставки генов. Кроме того, показано, что у *P. tricornutum* подавление пируватдегидрогеназы киназы привело к повышению содержания липидов до 82 % и незначительному снижению роста [Gimpel, Henríquez, Mayfield, 2015], оверэкспрессия малик-энзима повысила содержание липидов в 2.5 раза, не влияя на скорость роста [A Look Back … , 1998], оверэкспрессия глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD) из пентозофосфатного пути усилила производство NADPH, что увеличило накопление липидов до 55.7 % сухой биомассы [Xue et al., 2017]. Были получены несколько штаммов *P. tricornutum* с новыми признаками, включая ауксотрофные варианты, демонстрирующие перспективность для промышленных производств при снижении расходов на культивирование и высоком выходе целевых продуктов [Slattery et al., 2020; Slattery et al., 2022], штаммы с повышенной продукцией триацилглицерина после нарушения эндогенной UGPase [Daboussi et al., 2014] и гиперсинтезом тритерпеноидов или монотерпеноида гераниола путём гетерологичной экспрессии растительных генов [D'Adamo et al., 2019; Fabris et al., 2020].

Направленный нокдаун многофункциональных ферментов — липазы/фосфолипазы/ацилтрансферазы увеличил выход липидов у *Thalassiosira pseudonana*, не влияя на скорость роста. Мутантные штаммы продуцировали в 2.4–3.3 раза больше липидов в сравнении с коллекционным штаммом при кремниевом голодании [Trentacoste et al., 2013]. Трансформированные штаммы диатомовой водоросли *T. pseudonana* с нокдауном многофункционального гена, демонстрирующего активность липазы, фосфолипазы и лизофосфатидной ацилтрансферазы, показали сходные темпы роста в сравнении с диким штаммом при повышенном содержании липидов в условиях как непрерывного освещения, так и при чередовании свет/темнота [Trentacoste et al., 2013]. Это указывает на перспективность использования РНК-и для манипулирования метаболизмом микроводорослей.

В другом исследовании с помощью РНК-и удалось подавить на 62–83 % уровень транскрипции карбоновой ангидразы (CA) в мутантных клетках *T. pseudonana*. При этом скорость фотосинтетического выделения кислорода была на 68–100 % выше, чем у дикого типа. Показано, что нокдаун генов опосредован CG-, CHG- и CHH-типами метилирования ДНК (где H обозначает A, C или T) в кодирующей области целевого гена [Wei et al., 2017].

Таким образом, эти результаты демонстрируют успешное применение методов генетической модификации для диатомовых водорослей, что позволяет манипулировать их метаболизмом и улучшать целевые характеристики, такие как липидная продуктивность и фотосинтетическая активность.

Зелёные микроводоросли

Одноклеточная зелёная микроводоросль *C. reinhardtii* является модельным организмом для молекулярной инженерии [Harris, 2001; Mussgnug, 2015; Scranton et al., 2015]. Технология РНК-и была использована для снижения экспрессии генов, кодирующих белки светоулавливающих антенных комплексов (LHC). Показано, что модифицированные штаммы обладают более высокой устойчивостью к фотоповреждениям [Mayfield, Franklin, 2005]. Исследование гена

светоулавливающей антенны 1 (TLA1), который регулирует размер хлорофилловой (Chl) антенны у *C. reinhardtii*, показало, что оверэкспрессия и замолкание с помощью РНК-и модулируют экспрессию светоулавливающего белка и обеспечивают понимание регуляции размера антенны Chl этим геном [Mitra et al., 2012]. Более того, при индуцировании РНК-и-опосредованного замолкания гена хлорофиллид-а оксигеназы (CAO) уровень хлорофилла b был частично снижен. Результатом этого стало изменение размера периферических светозащитных усиков для повышения эффективности фотосинтеза, что привело к более чем двукратному увеличению скорости фотосинтеза при высокой интенсивности освещения и 30%-ному увеличению скорости роста при насыщающей интенсивности света [Perrine, Negi, Sayre, 2012].

В другом исследовании для определения роли пяти генов диацилглицерол-ацилтрансфераз в биосинтезе триацилглицеролов (ТАГ) был проведён их нокдаун с помощью РНК-интерференции и оценено влияние на накопление липидов. Позже этот же метод использовали для подавления гена цитратсинтазы (CIS), чтобы выяснить, влияет ли снижение его экспрессии на поток углерода в биосинтезе ТАГ. Результаты показали, что увеличение липидов путём подавления экспрессии CIS в микроводорослях возможно. Кроме того, был изучен нокдаун с помощью РНК-и гена изоформы 1 фосфоенолпируваткарбоксилазы (PEPC1). Это увеличивало экспрессию генов, связанных с биосинтезом ТАГ [Deng et al., 2012; Deng, Cai, Fei, 2013; Deng et al., 2014].

В 2013 году сообщили об одновременном нокдауне трёх белков светоулавливающего комплекса (LHCMB1, 2 и 3) в мутанте *C. Reinhardtii* — Stm6Glc4 с высокой продукцией H2 с использованием стратегии тройного нокдауна РНК-и. Полученный в результате мутант — Stm6Glc4L01 демонстрировал светло-зелёный фенотип, переменную сниженную экспрессию генов LHCBM, улучшенную эффективность преобразования света в H2 (180 %) и биомассу (165 %) [Oey et al., 2013].

Одно из самых инновационных применений РНК-и в микроводорослях заключалось в использовании специфической для вируса последовательности шпилечной РНК для трансформации *C. reinhardtii*. Трансформированные клетки были заражённым вирусом креветок, что показало повышение выживаемости креветок на 22 % по сравнению с креветками, которых кормили микроводорослями дикого типа, показав большой потенциал этого метода для борьбы с заболеваниями в аквакультуре животных [Somchai et al., 2016].

Была продемонстрирована эффективность (94 %) и стабильность семи поколений через CRISPRi-опосредованную регуляцию гена PEPC1 в *C. reinhardtii*. Ген PEPC1, кодирующий белки, необходим для контроля потока углерода, задействованного в цикле TCA, он играет ключевую роль в разделении углерода на субстраты в конкуренции с синтезом липидов. Все штаммы с пониженным уровнем CrPEPC1 имеют светло-зелёный цвет хлорофилла при высокой скорости накопления биомассы и липидов. Применение CRISPRi для репрессии генов в клетках *C. reinhardtii* путём глушения экзогенно подаваемого гена rfp и получение высокоэффективной репрессии гена CrPEPC1 позволило манипулировать распределением потока углерода для увеличения производства липидов [Kao, Ng, 2017].

Штаммы *C. reinhardtii* с дефицитом крахмала были успешно получены путём нарушения генов, кодирующих АДФ-глюкоза-пирофосфорилазу [Zabawinski et al., 2001] или изоамилазу [Posewitz et al., 2004]. Подавление экспрессии фосфоенолпируваткарбоксилазы привело к увеличению содержания липидов (от 14 до 28 %) [León-Saiki et al., 2017].

Показано, что трансгенный штамм *C. reinhardtii* демонстрирует существенно более высокий уровень биосорбции металлов — цинка и кадмия в сравнении с диким штаммом [Ibuot et al., 2020]. *C. reinhardtii*, трансформированный с использованием *Agrobacterium*, продемонстрировал значительную устойчивость к цианиду калия и способность к фиторемедиации до 150 мг/л [Sobieh et al., 2022]. Предполагается, что сконструированные штаммы перспективны в биоремедиации.

Возможность использования *D. salina* в качестве потенциальной трансгенной системы для производства рекомбинантных белков была показана относительно недавно. Экспрессированная шпилечная РНК (hpRNA), содержащая последовательности, гомологичные гену GAPDH, была использована для снижения экспрессии этого гена от 40 до 67 % с помощью РНК-интерференции по отношению к дикому типу [Jia Y. et al., 2009]. У *D. salina* была проведена трансформация с помощью плазмиды pGH, содержащей гены AccD и ME, для увеличения содержания липидов. Сравнение профиля жирных кислот трансформированной линии клеток водорослей и контрольных значений показало оверэкспрессию генов ME/AccD в трансформантах, что привело к увеличению общего количества жирных кислот на 12 % [Talebi et al., 2014].

Особый интерес представляет использование метаболической инженерии биосинтеза каротиноидов в *D. salina* для производства кетокаротиноидов. Была проведена модификация пути, которая включала введение гена bkt из *H. pluvialis*, кодирующего β-каротин-кетолазу (4,4′β-оксигеназу), а также нацеливание на хлоропласт для производства кетокаротиноидов. β-каротин-кетолаза (bkt) под контролем промотора меньшей субъединицы Rubisco *Dunaliella* вместе с последовательностью транзитного пептида была введена в водоросль с помощью стандартной процедуры агробактериальной трансформации. Отобранные трансформанты были подтверждены с помощью экспрессии GFP и GUS, ПЦР и саузерн-блот-анализа. Было отмечено значительное повышение уровня эндогенной гидроксилазы в трансформантах, где экспрессия bkt была выше в условиях лимитирования питательных веществ. Анализ состава каротиноидов-трансформантов с помощью ВЭЖХ и МС-анализа показал наличие астаксантина и кантаксантина с максимальным содержанием сухой массы (3.5 и 1.9 мкг/г соответственно). Таким образом, была показана целесообразность использования *D. salina* для производства кетокаротиноидов, включая астаксантин [Anila et al., 2016].

Была амплифицирована β-каротиновая гидроксилаза из микроводоросли *C. reinhardtii*, и анализ показал, что амплифицированный ген принадлежит к группе гидроксилаз BCH-типа. Амплифицированный ген β-каротингидроксилазы с промотором Rubisco и хлоропластным транзитным пептидом был введён в геном *D. salina* путём генетической агробактериальной трансформации. Анализ каротиноидов показал трёхкратное увеличение содержания виолаксантина на вегетативной стадии роста и двукратное увеличение зеаксантина в стрессовых условиях у трансформированной *D. salina* [Simon et al., 2016].

Поскольку система CRISPR/Cas обладает функцией точного редактирования генов, ген β-каротингидроксилазы был выбран в качестве примера для изучения применения *D. salina* с целью повышения уровня экспрессии генов. На основе pKSE401 были сконструированы три бинарных вектора CRISPR/Cas9 для нацеливания на экзоны 1 и 3 β-каротингидроксилазы *D. salina* CCAP19/18 (Dschyb). По сравнению со штаммами дикого типа уровень β-каротина у мутантов значительно увеличился, почти до 1.4 мкг/мл, а уровень зеаксантина у мутантов снизился в разной степени. Все полученные результаты являются убедительным доказательством успеха направленного редактирования генов у *D. salina* и имеют важное практическое значение для промышленной биотехнологии [Hu et al., 2021].

Инактивация синтеза крахмала у *Chlorella pyrenoidosa* приводит к перенаправлению углерода от синтеза крахмала к биосинтезу липидов, особенно в условиях азотного голодания. Мутант STL-PI имел более высокую скорость роста и накапливал на 20.4 % больше полиненасыщенных жирных кислот и на 18 % меньше насыщенных жирных кислот, чем родительский штамм 82T. При культивировании в безазотной среде содержание липидов в клетках мутантного штамма увеличилось с (25.2 ± 1.2) до (38.0 ± 2.3) % в сухой массе [Ramazanov A., Ramazanov Z., 2006]. Также в *C. pyrenoidosa* оверэкспрессия NAD(H) киназы повысила накопление липидов на 110.4 % без снижения скорости роста [Ravindran et al., 2017].

Одногенная конструкция dpp с 35S промотором CaMV (вирус мозаики цветной капусты) позволила увеличить содержание липидов в *Chlorella minutissima* UTEX 2219 в 2 раза по сравнению с диким типом [Hsieh, Su, Chien, 2012].

Ген транскрипционного фактора GmDof4 из сои был встроен в *Chlorella ellipsoidea*, что привело к увеличению накопления липидов с 46 до 53 % без негативного влияния на скорость роста [Zhang et al., 2014]. Оверэкспрессия пяти ацилтрансфераз (фосфатаза фосфатидной кислоты, LPAAT, глицерол-3-фосфатдегидрогеназа, GPAT и DGAT) у зелёной микроводоросли *C. minutissima* привела к двукратному увеличению содержания липидов в биомассе [Fayyaz et al., 2020].

Генетические манипуляции с природным продуцентом астаксантина *H. lacustris* затруднены из-за отсутствия стабильной и удобной системы трансформации. Вектор pH124-EGFP-Ble, содержащий ble в качестве селективного гена и EGFP в качестве репортерного гена, был сконструирован и использован для эффективной трансформации. Интеграция и экспрессия ble и EGFP были подтверждены в трансформантах. Более того, оптимальная комбинация для трансформации протопластов *H. lacustris* была определена как 5 мкг линеаризованного вектора, используемого для трансформации клеток в лаг-фазе роста, а затем трансформированным протопластам давали восстановиться при низкоинтенсивном освещении в течение 6 ч [Guo et al., 2022]. Трансформация с использованием *Agrobacterium для* переноса генов в *Haematococcus* даёт большое количество ложноположительных результатов и низкую воспроизводимость [Kathiresan, Sarada, 2009; Sharon-Gojman et al., 2015]. В свою очередь, эндогенный ген pds, устойчивый к норфлуразону, и ген aadA, управляемый промотором Tub, были успешно перенесены в геном *H. lacustris* методом биобаллистической бомбардировки [Sharon-Gojman et al., 2015; Yuan et al., 2019].

Проблемы и ограничения генной инженерии водорослей

Генетическая инженерия микроводорослей является сложной задачей, требующей дальнейших исследований для преодоления существующих ограничений и проблем, несмотря на её потенциал для оптимизации промышленной биотехнологии [Cao et al., 2023; Webster et al., 2024]. Хотя в последнее время наблюдается прогресс [Kong et al., 2019; Mishra et al., 2019; Muñoz et al., 2021], методы и подходы к трансформации клеток микроводорослей не до конца разработаны. Эффективность трансформации зависит от выбора подходящего метода переноса генов, что связано с вариабельностью состава клеточной стенки у разных видов микроводорослей. Один из основных вопросов заключается в том, что биохимические пути метаболизма у микроводорослей не до конца изучены. Геномные последовательности доступны только для ограниченного числа видов.

Манипуляции с геномом микроводорослей довольно сложны из-за их сложной клеточной структуры. Это связано с тем, что состав клеточной стенки водорослей варьирует от вида к виду и организмы с жёсткой клеточной стенкой являются сложным модельным объектом для переноса генов. Например, эффективность трансформации *H. lacustris,* продуцента высокоценного кетокаротиноида астаксантина, существенно снижается из-за медленной скорости роста, чувствительности к загрязнителям и особенностей перехода в состояние споры при стрессовых условиях, в которых идёт накопление целевого пигмента [Tran, Kaldenhoff, 2020]. После трансформации микроводорослей основной задачей является отбор трансформантов, который обычно проводится с использованием селективных маркеров, обеспечивающих преимущество в выживании. Широко применяется метод вставки генов устойчивости к антибиотикам для отбора трансформантов [Lumbreras, Stevens, Purton, 1998; Ng et al., 2017]. При этом необходимо учитывать, что выбор антибиотика должен соответствовать среде обитания исследуемых микроводорослей.

Отбор трансформантов морских микроводорослей сопряжён с дополнительными сложностями, поскольку высокая концентрация соли снижает активность антибиотиков, а некоторые антибиотики, такие как стрептомицин и канамицин, не могут быть использованы даже при низкой концентрации соли [Ng et al., 2017]. При редактировании генома микроводорослей вставка чужеродного гена может осуществляться как в ядерный геном, так и в геном хлоропластов [Couso et al., 2011; Eilers et al., 2016; Steinbrenner, Sandmann, 2006; Tran et al., 2012; Liu et al., 2013; Liu et al., 2014]. Экспрессия генов в хлоропластах показала более высокий и широкий диапазон накопления целевых метаболитов по сравнению с трансформациями ядерного генома [Ng et al., 2017]. Однако среди успешных трансформаций лишь некоторые рекомбинантные белки накапливаются в значительных количествах [Ng et al., 2017]. Это может быть связано с восприимчивостью рекомбинантных белков к протеазам или со вторичными структурами мРНК, блокирующими инициацию трансляции. Другим ограничением экспрессии в хлоропластах является то, что синтезируемые белки не секретируются, и для выделения целевого метаболита клетки должны быть лизированы с последующей очисткой [Rasala, Mayfield, 2011].

Кроме того, перспективы коммерциализации генно-модифицированных микроводорослей ограничены нормативно-правовым регулированием. В Российской Федерации, в отличие от других стран — лидеров промышленной альгобиотехнологии, законодательно запрещено использование генетически модифицированных организмов для получения биологически активных добавок и могут выращиваться только природные продуценты.

Использование генетически модифицированных штаммов микроводорослей остаётся под вопросом в связи с сомнениями о безопасности использования человеком продуктов, полученных таким путём. Несмотря на это, разработка высокоэффективных штаммов с помощью генной инженерии является ключевым звеном в будущих исследованиях для эффективных решений в области производства биотоплива или других ценных продуктов из микроводорослей. Применение омиксных технологий и развитие технологии CRISPR являются приоритетными в данном направлении.

Заключение

Использование микроводорослей и их метаболитов с каждым годом всё более востребовано в различных отраслях промышленности, включая пищевую, фармацевтическую, биотопливную и косметическую. Экстрагируемые из микроводорослей липиды, ПНЖК, каротиноиды считаются более безопасными для потребления человеком и зачастую обладают более высокой функциональной активностью в сравнении с синтетическими аналогами. Однако список природных продуцентов, пригодных для масштабного культивирования, ограничен в связи с рядом особенностей водорослей: лимитированной скоростью роста, восприимчивостью к загрязнениям, затратами при производстве. Методы синтетической биологии открывают новые возможности для генетической модификации и оптимизации биотехнологического потенциала микроводорослей. Нокдаун ключевых генов, внедрение чужеродных генов и геномное редактирование позволяет эффективно управлять метаболическими путями с целью повышения выхода ценных продуктов.

Кроме того, генетически модифицированные микроводоросли могут успешно применяться в биоремедиации и биосорбции. Недостаточная изученность метаболических путей, сложности в трансформации микроводорослей и законодательные ограничения в Российской Федерации пока тормозят прогресс в данной области, однако развитие инструментов и подходов генной инженерии и синтетической биологии открывают новые возможности для оптимизации биотехнологического потенциала микроводорослей.

Список литературы

1. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae : NREL/TR-580-24190 / *Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. ;* Nat. Renewable Energy Lab. – Golden, USA : NREL, 1998. – 294 p.
2. *Adem M., Beyene D., Feyissa T.* Recent achievements obtained by chloroplast transformation // Plant Methods. – 2017. – Vol. 13. – Art. 30. – URL: https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-017-0179-1. – Publ. date: 19.04.2017.
3. *Ambati R. R., Gogisetty D., Aswathanarayana R. G., Ravi S., Bikkina P. N., Bo L., Yuepeng S.* Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: current trends and future prospects // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2019. – Vol. 59, iss. 12. – P. 1880–1902. – https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561
4. *Andrianantoandro E., Basu S., Karig D., Weiss R.* Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline // Molecular Systems Biology. – 2006. – Vol. 2. – Art. 28. – URL: https://www.embopress.org/doi/full/10.1038/msb4100073. – Publ. date: 16.05.2006.
5. *Anila N., Simon D. P., Chandrashekar A., Ravishankar G. A., Sarada R.* Metabolic engineering of *Dunaliella salina* for production of ketocarotenoids // Photosynthesis research. – 2016. – Vol. 127, iss. 3. – P. 321–333. – https://doi.org/10.1007/s11120-015-0188-8
6. *Apt K. E., Grossman A. R., Kroth-Pancic P. G.* Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Molecular and General Genetics. – 1996. – Vol. 252, iss. 5. – P. 572–579. – https://doi.org/10.1007/BF02172403
7. *Basheer S., Huo S., Zhu F., Qian J., Xu L., Cui F., Zou B.* Microalgae in human health and medicine // Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products / eds by M. A. Alam [et al.]. – Singapore : Springer, 2020. – Chap. 5. – P. 149–174.
8. *Bo Y., Wang K., Wu Y., Cao H., Cui Y., Wang L.* Establishment of a chloroplast transformation system in *Tisochrysis lutea* // Journal of Applied Phycology. – 2020. – Vol. 32, iss. 5. – P. 2959–2965. – https://doi.org/10.1007/s10811-020-02159-4
9. *Boynton J. E., Gillham N. W., Harris E. H., Hosler J. P., Johnson A. M., Jones A. R., Randolph-Anderson B. L., Robertson D., Klein T. M., Shark K. B., Sanford J. C.* Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles // Science. – 1988. – Vol. 240, iss. 4858. – P. 1534–1538. – https://doi.org/10.1126/science.2897716
10. *Brennan L., Owende P.* Biofuels from microalgae — a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2010. – Vol. 14, iss. 2. – P. 557–577. – https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009
11. *Calder P. C.* Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future // Proceedings of the Nutrition Society. – 2018. – Vol. 77, iss. 1. – P. 52–72. – https://doi.org/10.1017/S0029665117003950
12. *Cao K., Cui Y., Sun F., Zhang H., Fan J., Ge B., Cao Y., Wang X., Zhu X., Wei Z., Yao Q., Ma J., Wang Y., Meng C, Gao Z.* Metabolic engineering and synthetic biology strategies for producing high-value natural pigments in Microalgae // Biotechnology Advances. – 2023. – Vol. 68. – Art. 108236. – https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108236
13. *Carthew R. W., Sontheimer E. J.* Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs // Cell. – 2009. – Vol. 136, iss. 4. – P. 642–655. – https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035
14. *Cerutti H., Casas-Mollano J. A.* On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man // Current Genetics. – 2006. – Vol. 50, iss. 2. – P. 81–99. – https://doi.org/10.1007/s00294-006-0078-x

15. *Cerutti H., Ma X., Msanne J., Repas T.* RNA-mediated silencing in algae: biological roles and tools for analysis of gene function // Eukaryotic cell. – 2011. – Vol. 10, iss. 9. – P. 1164–1172. – https://doi.org/10.1128/EC.05106-11
16. *Charoonnart P., Purton S., Saksmerprome V.* Applications of microalgal biotechnology for disease control in aquaculture // Biology. – 2018. – Vol. 7, iss. 2. – P. 24. – https://doi.org/10.3390/biology7020024
17. *Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., Voytas D. F.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases // Genetics. – 2010. – Vol. 186, iss. 2. – P. 757–761. – https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717
18. *Coll J. M.* Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: a review // Spanish Journal of Agricultural Research. – 2006. – Vol. 4, iss. 4. – P. 316–330.
19. *Couso I., Vila M., Rodriguez H., Vargas M. A., León R.* Overexpression of an exogenous phytoene synthase gene in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii* leads to an increase in the content of carotenoids // Biotechnology progress. – 2011. – Vol. 27, iss. 1. – P. 54–60. – https://doi.org/10.1002/btpr.527
20. *D'Adamo S., Schiano di Visconte G., Lowe G., Szaub-Newton J., Beacham T., Landels A., Allen M. J., Spicer A., Matthijs M.* Engineering the unicellular alga *Phaeodactylum tricornutum* for high-value plant triterpenoid production // Plant Biotechnology Journal. – 2019. – Vol. 17, iss. 1. – P. 75–87. – https://doi.org/10.1111/pbi.12948
21. *Daboussi F., Leduc S., Maréchal A., Dubois G., Guyot V., Perez-Michaut C., Amato A., Falciatore A., Juillerat A., Beurdeley M., Voytas D. F., Cavarec L., Duchateau P.* Genome engineering empowers the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for biotechnology // Nature Communications. – 2014. – Vol. 5. – Art. 3831. – https://doi.org/10.1038/ncomms4831
22. *Day A., Goldschmidt-Clermont M.* The chloroplast transformation toolbox: selectable markers and marker removal // Plant Biotechnology Journal. – 2011. – Vol. 9, iss. 5. – P. 540–553. – https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00604.x
23. *De Riso V., Raniello R., Maumus F., Rogato A., Bowler C., Falciatore A.* Gene silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Nucleic Acids Research. – 2009. – Vol. 37, iss. 14. – P. e96. – https://doi.org/10.1093/nar/gkp448
24. *Debuchy R., Purton S., Rochaix J. D.* The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus // EMBO Journal. – 1989. – Vol. 8, iss. 10. – P. 2803–2809. – https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08426.x
25. *Deng X., Cai J., Fei X.* Effect of the expression and knock-down of citrate synthase gene on carbon flux during triacylglycerol biosynthesis by green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // BMC Biochemistry. – 2013. – Vol. 14. – Art. 38. – https://doi.org/10.1186/1471-2091-14-38
26. *Deng X., Cai J., Li Y., Fei X.* Expression and knockdown of the PEPC1 gene affect carbon flux in the biosynthesis of triacylglycerols by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Biotechnology Letters. – 2014. – Vol. 36, iss. 11. – P. 2199–2208. – https://doi.org/10.1007/s10529-014-1593-3
27. *Deng X. D., Gu B., Li Y. J., Hu X. W., Guo J. C., Fei X.* W. The roles of acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 2 genes in the biosynthesis of triacylglycerols by the green algae *Chlamydomonas reinhardtii* // Molecular Plant. – 2012. – Vol. 5, iss. 4. – P. 945–947. – https://doi.org/10.1093/mp/sss040
28. *Diao J., Song X., Zhang L., Cui J., Chen L., Zhang W.* Tailoring cyanobacteria as a new platform for highly efficient synthesis of astaxanthin // Metabolic Engineering. – 2020. – Vol. 61. – P. 275–287. – https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.07.003

29. *Eilers U., Bikoulis A., Breitenbach J., Büchel C., Sandmann G.* Limitations in the biosynthesis of fucoxanthin as targets for genetic engineering in *Phaeodactylum tricornutum* // Journal of applied phycology. – 2016. – Vol. 28, iss.1. – P. 123–129. – https://doi.org/10.1007/s10811-015-0583-8
30. *Fabris M., George J., Kuzhiumparambil U., Lawson C. A., Jaramillo-Madrid A. C., Abbriano R. M., Vickers C. E., Ralph P.* Extrachromosomal genetic engineering of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* enables the heterologous production of monoterpenoids // ACS Synthetic Biology. – 2020. – Vol. 9, iss. 3. – P. 598–612. – https://doi.org/10.1021/acssynbio.9b00455
31. *Fayyaz M., Chew K. W., Show P. L., Ling T. C., Ng I. S., Chang J. S.* Genetic engineering of microalgae for enhanced biorefinery capabilities // Biotechnology advances. – 2020. – Vol. 43. – P. 107554. – https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107554
32. *Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // Nature. – 1998. – Vol. 391, iss. 6669. – P. 806–811. – https://doi.org/10.1038/35888
33. *Fu W., Chaiboonchoe A., Khraiwesh B., Nelson D. R., Al-Khairy D., Mystikou A., Alzahmi A., Salehi-Ashtiani K.* Algal cell factories: approaches, applications, and potentials // Marine Drugs. – 2016. – Vol. 14, iss. 12. – Art. 225. – https://doi.org/10.3390/md14120225
34. *Gan Q., Jiang J., Han X., Wang S., Lu Y.* Engineering the chloroplast genome of oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* // Frontiers in Plant Science. – 2018. – Vol. 9. – P. 439. – https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00439
35. *Gao, X., Jing, X., Liu, X., Lindblad P.* Biotechnological production of the sunscreen pigment scytonemin in cyanobacteria: progress and strategy // Marine Drugs. – 2021. – Vol. 19, iss. 3. – Art. 129. – https://doi.org/10.3390/md19030129
36. *Gimpel J. A., Henríquez V., Mayfield S. P.* In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity // Frontiers in microbiology. – 2015. – Vol. 6. – Art. 1376. – https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01376
37. *Goldschmidt-Clermont M.* Transgenic expression of aminoglycoside adenine transferase in the chloroplast: a selectable marker of site-directed transformation of *Chlamydomonas* // Nucleic Acids Research. – 1991. – Vol. 19, iss. 15. – P. 4083–4089. – https://doi.org/10.1093/nar/19.15.4083
38. *Goswami R. K., Agrawal K., Upadhyaya H. M., Gupta V. K., Verma P.* Microalgae conversion to alternative energy, operating environment and economic footprint: an influential approach towards energy conversion, and management // Energy Conversion and Management. – 2022. – Vol. 269. – Art. 116118. – https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.116118
39. *Greiner A., Kelterborn S., Evers H., Kreimer G., Sizova I., Hegemann P.* Targeting of photoreceptor genes in *Chlamydomonas reinhardtii* via zinc-finger nucleases and CRISPR/Cas9 // Plant Cell. – 2017. – Vol. 29, iss. 10. – P. 2498–2518. – https://doi.org/10.1105/tpc.17.00659
40. *Guo C., Anwar M., Mei R., Li X., Zhao D., Jiang Y., Zhuang J., Liu C., Wang C., Hu Z.* Establishment and optimization of PEG-mediated protoplast transformation in the microalga *Haematococcus pluvialis* // Journal of Applied Phycology. – 2022. – Vol. 34, iss. 3. – P. 1595–1605. – https://doi.org/10.1007/s10811-022-02718-x
41. *Gutiérrez S., Lauersen K. J.* Gene delivery technologies with applications in microalgal genetic engineering // Biology. – 2021. – Vol. 10, iss. 4. – P. 265. – https://doi.org/10.3390/biology10040265
42. *Harris E. H. Chlamydomonas* as a model organism // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 2001. – Vol. 52. – P. 363–406. – https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.363

43. *Hossain N., Hasan M. H., Mahlia T. M. I., Shamsuddin A. H., Silitonga A. S.* Feasibility of microalgae as feedstock for alternative fuel in Malaysia: a review // Energy Strategy Reviews. – 2020. – Vol. 32. – Art. 100536. – https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.esr.2020.100536
44. *Hsieh H. J., Su C. H., Chien L. J.* Accumulation of lipid production in *Chlorella minutissima* by triacylglycerol biosynthesis-related genes cloned from *Saccharomyces cerevisiae* and *Yarrowia lipolytica* // Journal of Microbiology. – 2012. – Vol. 50, iss. 3. – P. 526–534. – https://doi.org/10.1007/s12275-012-2041-5
45. *Hu J., Nagarajan D., Zhang Q., Chang J. S. Lee D. J.* Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: a review // Biotechnology Advances. – 2018. – Vol. 36, iss. 1. – P. 54–67. – https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009
46. *Hu L., Feng S., Liang G., Du J., Li A., Niu C.* CRISPR/Cas9-induced β-carotene hydroxylase mutation in *Dunaliella salina* CCAP19/18 // AMB Express. – 2021. – Vol. 11. – Art. 83. – https://doi.org/10.1186/s13568-021-01242-4
47. *Ibuot A., Webster R. E., Williams L. E., Pittman J. K.* Increased metal tolerance and bioaccumulation of zinc and cadmium in *Chlamydomonas reinhardtii* expressing a AtHMA4 C-terminal domain protein // Biotechnology and Bioengineering. – 2020. – Vol. 117, iss. 10. – P. 2996–3005. – https://doi.org/10.1002/bit.27476
48. *Ishikura K., Takaoka Y., Kato K., Sekine M., Yoshida K., Shinmyo A.* Expression of a foreign gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 1999. – Vol. 87, iss. 3. – P. 307–314. – https://doi.org/10.1016/S1389-1723(99)80037-1
49. *Jagadevan S., Banerjee A., Banerjee C., Guria C., Tiwari R., Baweja M., Shukla P.* Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production // Biotechnology for Biofuels. – 2018. – Vol. 11. – Art. 185. – https://doi.org/10.1186/s13068-018-1181-1
50. *Jeong B. R., Jang J., Jin E.* Genome engineering via gene editing technologies in microalgae // Bioresource Technology. – 2023. – Vol. 373. – Art. 128701. – https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128701
51. *Jia Y., Xue L., Liu H., Li J.* Characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene from the halotolerant alga *Dunaliella salina* and inhibition of its expression by RNAi // Current Microbiology. – 2009. – Vol. 58, iss. 5. – P. 426–431. – https://doi.org/10.1007/s00284-008-9333-3
52. *Jiang W., Brueggeman A. J., Horken K. M., Plucinak T. M., Weeks D. P.* Successful transient expression of Cas9 and single guide RNA genes in *Chlamydomonas reinhardtii* // Eukaryotic Cell. – 2014. – Vol. 13, iss. 11. – P. 1465–1469. – https://doi.org/10.1128/EC.00213-14
53. *Jiang W. Z., Weeks D. P.* A gene-within-a-gene Cas9/sgRNA hybrid construct enables gene editing and gene replacement strategies in *Chlamydomonas reinhardtii* // Algal Research. – 2017. – Vol. 26. – P. 474–480. – https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.001
54. *Kalra R., Gaur S., Goel M.* Microalgae bioremediation: a perspective towards wastewater treatment along with industrial carotenoids production // Journal of Water Process Engineering. – 2021. – Vol. 40. – Art. 101794. – https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101794
55. *Kao P.-H., Ng I-S.* CRISPRi mediated phosphoenolpyruvate carboxylase regulation to enhance the production of lipid in *Chlamydomonas reinhardtii* // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 245, pt. B. – P. 1527–1537. – https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.111
56. *Kathiresan S., Sarada R.* Towards genetic improvement of commercially important microalga *Haematococcus pluvialis* for biotech applications // Journal of Applied Phycology. – 2009. – Vol. 21, iss. 5. – P. 553–558. – https://doi.org/10.1007/s10811-009-9414-0

57. *Kato K., Marui T., Kasai S., Shinmyo A.* Artificial control of transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast using the lac regulation system from *Escherichia coli* // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2007. – Vol. 104, iss. 3. – P. 207–213. – https://doi.org/10.1263/jbb.104.207
58. *Kazamia E., Smith A. G.* Assessing the environmental sustainability of biofuels // Trends in Plant Science. – 2014. – Vol. 19, iss. 10. – P. 615–618. – https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.08.001
59. *Kholssi R., Lougraimzi H., Moreno-Garrido I.* Effects of global environmental change on microalgal photosynthesis, growth and their distribution // Marine Environmental Research. – 2023. – Vol. 184. – Art. 105877. – https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2023.105877
60. *Kilian O., Benemann C. S. E., Niyogi K. K., Vick B.* High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis* sp. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2011. – Vol. 108, no. 52. – P. 21265–21269. – https://doi.org/10.1073/pnas.1105861108
61. *Kim E.-J., Ma X., Cerutti H.* Gene silencing in microalgae: mechanisms and biological roles // Bioresource Technology. – 2015. – Vol. 184. – P. 23–32. – https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.119
62. *Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S.* Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 1996. – Vol. 93, no. 3. – P. 1156–1160. – https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156
63. *Kindle K. L., Schnell R. A., Fernandez E., Lefebvre P. A.* Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas* using the *Chlamydomonas* gene for nitrate reductase // Journal of Cell Biology. – 1989. – Vol. 109, iss. 6. – P. 2589–2601. – https://doi.org/10.1083/jcb.109.6.2589
64. *Klievik B. J., Tyrrell A. D., Chen C. T., Bazinet R. P.* Measuring brain docosahexaenoic acid turnover as a marker of metabolic consumption // Pharmacology & Therapeutics. – 2023. – Vol. 248. – Art. 108437. – https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108437
65. *Kong F., Yamaoka Y., Ohama T., Lee Y., Li-Beisson Y.* Molecular genetic tools and emerging synthetic biology strategies to increase cellular oil content in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant and Cell Physiology. – 2019. – Vol. 60, iss. 6. – P. 1184–1196. – https://doi.org/10.1093/pcp/pcz022
66. *Kroth P. G., Bones A. M., Daboussi F., Ferrante M. I., Jaubert M., Kolot M., Nymark M., Río Bártulos C., Ritter A., Russo M. T., Serif M., Winge P., Falciatore A.* Genome editing in diatoms: achievements and goals // Plant Cell Reports. – 2018. – Vol. 37, iss. 10. – P. 1401–1408. – https://doi.org/10.1007/s00299-018-2334-1
67. *Kumar A. U., Ling A. P. K.* Gene introduction approaches in chloroplast transformation and its applications // Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. – 2021. – Vol. 19, iss. 1. – Art. 148. – https://doi.org/10.1186/s43141-021-00255-7
68. *Kumar S. V., Misquitta R. W., Reddy V. S., Rao B. J., Rajam M. V.* Genetic transformation of the green alga — *Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Science. – 2004. – Vol. 166, iss. 3. – P. 731–738. – https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.11.012
69. *Kurita T., Moroi K., Iwai M., Okazaki K., Shimizu S., Nomura S., Saito F., Maeda S., Takami A., Sakamoto A., Ohta H., Sakuma T., Yamamoto T.* Efficient and multiplexable genome editing using Platinum TALENs in oleaginous microalga, *Nannochloropsis oceanica* NIES-2145 // Genes to Cells. – 2020. – Vol. 25, iss. 10. – P. 695–702. – https://doi.org/10.1111/gtc.12805
70. *León-Saiki G. M., Remmers I. M., Martens D. E., Lamers P. P., Wijffels R. H., van der Veen D.* The role of starch as transient energy buffer in synchronized microalgal growth in *Acutodesmus obliquus* // Algal research. – 2017. – Vol. 25. – P. 160–167. – https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.018

71. *Liang M.-H., Wang L., Wang Q., Zhu J., Jiang J.-G.* High-value bioproducts from microalgae: strategies and progress // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2019. – Vol. 59, iss. 15. – P. 2423–2441. – https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1455030
72. *Liang Z. C., Liang M. H., Jiang J. G.* Transgenic microalgae as bioreactors // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2020. – Vol. 60, iss. 19. – P. 3195–3213. – https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1680525
73. *Liu J., Gerken H., Huang J., Chen F.* Engineering of an endogenous phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker for *Chlamydomonas reinhardtii* transformation and enhanced biosynthesis of carotenoids // Process Biochemistry. – 2013. – Vol. 48, iss. 5/6. – P. 788–795. – https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.020
74. *Liu J., Sun Z., Gerken H., Huang J., Jiang Y., Chen F.* Genetic engineering of the green alga *Chlorella zofingiensis*: a modified norflurazon-resistant phytoene desaturase gene as a dominant selectable marker // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98, iss. 11. – P. 5069–5079. – https://doi.org/10.1007/s00253-014-5593-y
75. *Lumbreras V., Stevens D. R., Purton S.* Efficient foreign gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* mediated by an endogenous intron // Plant Journal. – 1998. – Vol. 14, iss. 4. – P. 441–447. – https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00145.x
76. *Manuell A. L., Beligni M. V., Elder J. H., Siefker D. T., Tran M., Weber A., McDonald T. L., Mayfield S. P.* Robust expression of a bioactive mammalian protein in *Chlamydomonas* chloroplast // Plant Biotechnology Journal. – 2007. – Vol. 5, iss. 3. – P. 402–412. – https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00249.x
77. *Mao X., Zhang Y., Wang X., Liu J.* Novel insights into salinity-induced lipogenesis and carotenogenesis in the oleaginous astaxanthin-producing alga *Chromochloris zofingiensis*: a multi-omics study // Biotechnology for Biofuels. – 2020. – Vol. 13. – Art. 73. – https://doi.org/10.1186/s13068-020-01714-y
78. *Mayfield S. P., Franklin S. E.* Expression of human antibodies in eukaryotic microalgae // Vaccine. – 2005. – Vol. 23, iss. 15. – P. 1828–1832. – https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.11.013
79. *Meister G.* Argonaute proteins: functional insights and emerging roles // Nature Reviews Genetics. – 2013. – Vol. 14, iss. 7. – P. 447–459. – https://doi.org/10.1038/nrg3462
80. *Mishra A., Medhi K., Malaviya P., Thakur I. S.* Omics approaches for microalgal applications: prospects and challenges // Bioresource Technology. – 2019. – Vol. 291. – Art. 121890. – https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121890
81. *Mitra M., Kirst H., Dewez D., Melis A.* Modulation of the light-harvesting chlorophyll antenna size in *Chlamydomonas reinhardtii* by TLA1 gene over-expression and RNA interference // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Ser. B, Biological sciences. – 2012. – Vol. 367, nr 1608. – P. 3430–3443. – https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0229
82. *Moses T., Mehrshahi P., Smith A. G., Goossens A.* Synthetic biology approaches for the production of plant metabolites in unicellular organisms // Journal of Experimental Botany. – 2017. – Vol. 68, no. 15. – P. 4057–4074. – https://doi.org/10.1093/jxb/erx119
83. *Muñoz C. F., Südfeld C., Naduthodi M. I. S., Weusthuis R. A., Barbosa M. J., Wijffels R. H., D'Adamo S.* Genetic engineering of microalgae for enhanced lipid production // Biotechnology Advances. – 2021. – Vol. 52. – Art. 107836. – https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107836
84. *Mussgnug J. H.* Genetic tools and techniques for *Chlamydomonas reinhardtii* // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – Vol. 99, iss. 13. – P. 5407–5418. – https://doi.org/10.1007/s00253-015-6698-7

85. *Ng S., Tan I., Kao H., Chang K., Chang S.* Recent developments on genetic engineering of microalgae for biofuels and bio-based chemicals // Biotechnology Journal. – 2017. – Vol. 12, iss. 10. – Art. 1600644. – https://doi.org/10.1002/biot.201600644
86. *Niu Y.-F., Yang Z.-K., Zhang M.-H., Zhu C.-C., Yang W.-D., Liu J.-S., Li H.-E.* Transformation of diatom *Phaeodactylum tricornutum* by electroporation and establishment of inducible selection marker // Biotechniques. – 2012. – Vol. 52, iss. 6. – P. 1–3. – https://doi.org/10.2144/000113881
87. *Nora L. C., Westmann C. A., Martins-Santana L., Alves L. D., Monteiro L. M. O., Guazzaroni M.-E., Silva-Rocha R.* The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools // Microbial Biotechnology. – 2019. – Vol. 12, iss. 1. – P. 125–147. – https://doi.org/10.1111/1751-7915.13318
88. *Novoveska L., Ross M. E., Stanley M. S., Pradelles R., Wasiolek V., Sassi J. F.* Microalgal carotenoids: a review of production, current markets, regulations, and future direction // Marine Drugs. – 2019. – Vol. 17, iss. 11. – Art. 640. – https://doi.org/10.3390/md17110640
89. *Nymark M., Sharma A. K., Sparstad T., Bones A. M., Winge P.* A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6. – Art. 24951. – https://doi.org/10.1038/srep24951
90. *Occhialini A., Pfotenhauer A. C., Frazier T. P., Li L., Harbison S. A., Lail A. J., Mebane Z., Piatek A. A., Rigoulot S. B., Daniell H., Stewart C. N., Lenaghan S. C.* Generation, analysis, and transformation of macro-chloroplast potato (*Solanum tuberosum*) lines for chloroplast biotechnology // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – Art. 21144. – https://doi.org/10.1038/s41598-020-78237-x
91. *Oey M., Ross I. L., Stephens E., Steinbeck J., Wolf J., Radzun K. A., Kügler J., Ringsmuth A. K., Kruse O., Hankamer B.* RNAi knock-down of LHCBM1, 2 and 3 increases photosynthetic H2 production efficiency of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, nr 4. – Art. e61375. – https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061375
92. *Ohnishi H., Saito Y.* Eicosapentaenoic acid (EPA) reduces cardiovascular events: relationship with the EPA/arachidonic acid ratio // Journal of Atherosclerosis and Thrombosis. – 2013. – Vol. 20, iss. 12. – P. 861–877. – https://doi.org/10.5551/jat.18002
93. *Patel A. K., Albarico F., Perumal P. K., Vadrale A. P., Nian C. T., Chau H. T. B., Anwar C., Wani H., Pal A., Saini R., Ha L. H., Senthilkumar B., Tsang Y.-S., Chen C.-W., Dong C.-D., Singhania R. R.* Algae as an emerging source of bioactive pigments // Bioresource Technology. – 2022. – Vol. 351. – Art. 126910. – https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126910
94. *Perrine Z., Negi S., Sayre R. T.* Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae // Algal Research. – 2012. – Vol. 1, iss. 2. – P. 134–142. – https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.07.002
95. *Peter A. P., Koyande A. K., Chew K. W., Ho S. H., Chen W. H., Chang J. S., Krishnamoorthy R., Banat F., Show P. L.* Continuous cultivation of microalgae in photobioreactors as a source of renewable energy: current status and future challenges // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2022. – Vol. 154. – Art. 111852. – https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111852
96. *Posewitz M. C., Smolinski S. L., Kanakagiri S., Melis A., Seibert M., Ghirardi M. L.* Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell. – 2004. – Vol. 16, iss. 8. – P. 2151–2163. – https://doi.org/10.1105/tpc.104.021972
97. *Ramazanov A., Ramazanov Z.* Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content // Phycological Research. – 2006. – Vol. 54, iss. 4. – P. 255–259. – https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2006.00416.x

98. *Ramesh V. M., Bingham S. E., Webber A. N.* A simple method for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii* // Photosynthesis Research Protocols / ed. by Carpentier R. – 2nd ed. – New York [et al.] : Humana Press, 2011. – P. 313–320. – (Methods in molecular biology ; 684). – https://doi.org/10.1007/978-1-60761-925-3_23
99. *Rasala B. A., Mayfield S. P.* The microalga *Chlamydomonas reinhardtii as* a platform for the production of human protein therapeutics // Bioengineered Bugs. – 2011. – Vol. 2, iss. 1. – P. 50–54. – https://doi.org/10.4161/bbug.2.1.13423
100. *Rathod J. P., Gade R. M., Rathod D. R., Dudhare M.* A review on molecular tools of microalgal genetic transformation and their application for overexpression of different genes // International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. – 2017. – Vol. 6, nr 12. – P. 3191–3207. – https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.373
101. *Ravindran B., Kurade M. B., Kabra A. N., Jeon B.-H., Gupta S. K.* Recent advances and future prospects of microalgal lipid biotechnology // Algal Biofuels : Recent Advances and Future Prospects / eds: S. Gupta [et al.]. – Cham, Switzerland : Springer, 2017. – P. 1–37. – https://doi.org/10.1007/978-3-319-51010-1
102. *Rohr J., Sarkar N., Balenger S., Jeong B. R., Cerutti H.* Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas* // Plant Journal. – 2004. – Vol. 40, iss. 4. – P. 611–621. – https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02227.x
103. *Rosales-Mendoza S., Paz-Maldonado L. M. T., Soria-Guerra R. E. Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives // Plant Cell Reports. – 2012. – Vol. 31, iss. 3. – P. 479–494. – https://doi.org/10.1007/s00299-011-1186-8
104. *Russo M. T., Rogato A., Jaubert M., Karas B. J., Falciatore A. Phaeodactylum tricornutum*: an established model species for diatom molecular research and an emerging chassis for algal synthetic biology // Journal of Phycology. – 2023. – Vol. 59, iss. 6. – P. 1114–1122. – https://doi.org/10.1111/jpy.13400
105. *Scaife M. A., Smith A. G.* Towards developing algal synthetic biology // Biochemical Society Transactions. – 2016. – Vol. 44, iss. 3. – P. 716–722. – https://doi.org/10.1042/BST20160061
106. *Scranton M. A., Ostrand J. T., Fields F. J., Mayfield S. P. Chlamydomonas* as a model for biofuels and bioproducts production // Plant Journal. – 2015. – Vol. 82, iss. 3. – P. 523–531. – https://doi.org/10.1111/tpj.12780
107. *Shalem O., Sanjana N. E., Zhang F.* High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9 // Nature Reviews Genetics. – 2015. – Vol. 16, iss. 5. – P. 299–311. – https://doi.org/10.1038/nrg3899
108. *Sharma A. K., Nymark M., Sparstad T., Bones A. M., Winge P.* Transgene-free genome editing in marine algae by bacterial conjugation — comparison with biolistic CRISPR/Cas9 transformation // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – Art. 14401. – https://doi.org/10.1038/s41598-018-32342-0
109. *Sharon-Gojman R., Maimon E., Leu S., Zarka A., Boussiba S.* Advanced methods for genetic engineering of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) // Algal Research. – 2015. – Vol. 10. – P. 8–15. – https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.022
110. *Shimogawara K., Fujiwara S., Grossman A., Usuda H.* High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation // Genetics. – 1998. – Vol. 148, iss. 4. – P. 1821–1828. – https://doi.org/10.1093/genetics/148.4.1821
111. *Siddiqui A., Wei Z., Boehm M., Ahmad N.* Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high-value industrial products // Biotechnology and Applied Biochemistry. – 2020. – Vol. 67, iss. 1. – P. 30–40. – https://doi.org/10.1002/bab.1823

112. *Simon D. P., Anila N., Gayathri K., Sarada R.* Heterologous expression of β-carotene hydroxylase in *Dunaliella salina* by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation // Algal Research. – 2016. – Vol. 18. – P. 257–265. – https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.06.017
113. *Sizova I., Greiner A., Awasthi M., Kateriya S., Hegemann P.* Nuclear gene targeting in *Chlamydomonas* using engineered zinc-finger nucleases // Plant Journal. – 2013. – Vol. 73, iss. 5. – P. 873–882. – https://doi.org/10.1111/tpj.12066
114. *Slattery S. S., Giguere D. J., Stuckless E. E., Shrestha A., Briere L.-A. K., Galbraith A., Reaume S., Boyko X., Say H. H., Browne T. S., Frederick M. I., Lant J. T., Heinemann I. U., O'Donoghue P., Dsouza L., Martin S., Howard P., Jedeszko C., Ali K., Styba J., Flatley M., Karas B. J., Gloor G. B., Edgell D. R.* Phosphate-regulated expression of the SARS-CoV-2 receptor-binding domain in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* for pandemic diagnostics // Scientific Reports. – 2022. – Vol. 12. – Art. 7010. – https://doi.org/10.1038/s41598-022-11053-7
115. *Slattery S. S., Wang H., Giguere D. J., Kocsis C., Urquhart B. L., Karas B. J., Edgell D. R.* Plasmid-based complementation of large deletions in *Phaeodactylum tricornutum* biosynthetic genes generated by Cas9 editing // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – Art. 13879. – https://doi.org/10.1038/s41598-020-70769-6
116. *Sobieh S. S., Abed El-Gammal R., Abu El-Kheir W. S., El-Sheimy A. A., Said A. A., El-Ayouty Y. M.* Heterologous expression of cyanobacterial cyanase gene (CYN) in microalga *Chlamydomonas reinhardtii* for bioremediation of cyanide pollution // Biology. – 2022. – Vol. 11, iss. 10. – P. 1420. – https://doi.org/10.3390/biology11101420
117. *Solovchenko A. E.* Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell // Photosynthesis Research. – 2015. – Vol. 125, iss. 3. – P. 437–449. – https://doi.org/10.1007/s11120-015-0156-3
118. *Somchai P., Jitrakorn S., Thitamadee S., Meetam M., Saksmerprome V.* Use of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for production of double-stranded RNA against shrimp virus // Aquaculture Reports. – 2016. – Vol. 3. – P. 178–183. – https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.03.003
119. *Sonani R. R., Patel S., Bhastana B., Jakharia K., Chaubey M. G., Singh N. K., Madamwar D.* Purification and antioxidant activity of phycocyanin from *Synechococcus* sp. R42DM isolated from industrially polluted site // Bioresource Technology. – 2017. – Vol. 245, pt. A. – P. 325–331. – https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.129
120. *Song Y., Wang F., Chen L., Zhang W.* Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae: recent progress and perspectives // Marine Drugs. – 2024. – Vol. 22, iss. 5. – Art. 216. – https://doi.org/10.3390/md22050216
121. *Steinbrenner J., Sandmann G.* Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, iss. 12. – P. 7477–7484. – https://doi.org/10.1128/AEM.01461-06
122. *Sun H., Wu T., Chen S. H. Y., Ren Y., Yang S., Huang J., Mou H., Chen F.* Powerful tools for productivity improvements in microalgal production // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2021. – Vol. 152. – Art. 111609. – https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111609
123. *Sun T., Li S., Song X., Diao J., Chen L., Zhang W.* Toolboxes for cyanobacteria: recent advances and future direction // Biotechnology Advances. – 2018. – Vol. 36, iss. 4. – P. 1293–1307. – https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.007
124. *Tabassum B., Yousaf I., Adeyinka O. S., Khalid R., Khan A. The* concept of chloroplast transformation; Its relevance towards food security // Advancements in Life Sciences. – 2024. – Vol. 11, no. 1. – P. 28–39. – URL: https://www.als-journal.com/1114-24. – Publ. date: 25.02.2024.

125. *Talebi A. F., Tohidfar M., Bagheri A., Lyon S. R., Salehi-Ashtiani K., Tabatabaei M.* Manipulation of carbon flux into fatty acid biosynthesis pathway in *Dunaliella salina* using AccD and ME genes to enhance lipid content and to improve produced biodiesel quality // Biofuel Research Journal. – 2014. – Vol. 1, iss. 3. – P. 91–97. – https://doi.org/10.18331/BRJ2015.1.3.6
126. *Tissot-Lecuelle G., Purton S., Dubald M., Goldschmidt-Clermont P.* Synthesis of recombinant products in the chloroplast // Plastid Biology / eds: S. M. Theg, F.-A. Wollman. – New York : Springer, 2014. – P. 517–558. – https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1136-3_18
127. *Tran N. T., Kaldenhoff R.* Achievements and challenges of genetic engineering of the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Algal Research. – 2020. – Vol. 50. – Art. 101986. – https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101986
128. *Tran P. T., Sharifi M. N., Poddar S., Dent R. M., Niyogi K. K.* Intragenic enhancers and suppressors of phytoene desaturase mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* // PLOS ONE. – 2012. – Vol. 7, nr 8. – Art. e42196. – https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042196
129. *Trentacoste E. M., Shrestha R. P., Smith S. R., Glé C., Hartmann A. C., Hildebrand M., Gerwick W. H.* Metabolic engineering of lipid catabolism increases microalgal lipid accumulation without compromising growth // Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. – 2013. – Vol. 110, no. 49. – P. 19748–19753. – https://doi.org/10.1073/pnas.1309299110
130. *Verma D., Daniell H.* Chloroplast vector systems for biotechnology applications // Plant Physiology. – 2007. – Vol. 145, iss. 4. – P. 1129–1143. – https://doi.org/10.1104/pp.107.106690
131. *Virolle C., Goldlust K., Djermoun S., Bigot S., Lesterlin C.* Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community level // Genes. – 2020. – Vol. 11, iss. 11. – Art. 1239. – https://doi.org/10.3390/genes11111239
132. *Wang B., Wang J., Zhang W., Meldrum D. R.* Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae // Frontiers in Microbiology. – 2012. – Vol. 3. – Art. 344. – https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00344
133. *Wang Q., Lu Y., Xin Y., Wei L., Huang S., Xu J.* Genome editing of model oleaginous microalgae *Nannochloropsis* spp. by CRISPR/Cas9 // Plant Journal. – 2016. – Vol. 88, iss. 6. – P. 1071–1081. – https://doi.org/10.1111/tpj.13307
134. *Wang S., Wu S., Yang G., Pan K., Wang L., Hu Z.* A review on the progress, challenges and prospects in commercializing microalgal fucoxanthin // Biotechnology Advances. – 2021. – Vol. 53. – Art. 107865. – https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107865
135. *Webster L. J., Villa-Gomez D., Brown R., Clarke W., Schenk P. M.* A synthetic biology approach for the treatment of pollutants with microalgae // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2024. – Vol. 12. – Art. 1379301. – https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1379301
136. *Wei L., Xin Y., Wang Q., Yang J., Hu H., Xu J.* RNAi-based targeted gene knockdown in the model oleaginous microalgae *Nannochloropsis oceanica* // Plant Journal. – 2017. – Vol. 89, iss. 6. – P. 1236–1250. – https://doi.org/10.1111/tpj.13411
137. *Worden A. Z., Follows M. J., Giovannoni S. J., Wilken S., Zimmerman A. E., Keeling P. J.* Rethinking the marine carbon cycle: factoring in the multifarious lifestyles of microbes // Science. – 2015. – Vol. 347, № 6223. – Art. 1257594. – https://doi.org/10.1126/science.1257594
138. *Xin Y., Wu S., Miao C., Xu T., Lu Y.* Towards lipid from microalgae: products, biosynthesis, and genetic engineering // Life. – 2024. – Vol. 14, iss. 4. – Art. 447. – https://doi.org/10.3390/life14040447
139. *Xu K., Zou W., Peng B., Guo C., Zou X.* Lipid droplets from plants and microalgae: characteristics, extractions, and applications // Biology. – 2023. – Vol. 12, iss. 4. – P. 594. – https://doi.org/10.3390/biology12040594

140. *Xu X., Gu X., Wang Zhon, Shatner W., Wang Zhen.* Progress, challenges and solutions of research on photosynthetic carbon sequestration efficiency of microalgae // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2019. – Vol. 110. – P. 65–82. – https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.050
141. *Xue J., Balamurugan S., Li D.-W., Liu Y.-H., Zeng H., Wang L., Yang W.-D., Liu J.-S., Li H.-Y.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase as a target for highly efficient fatty acid biosynthesis in microalgae by enhancing NADPH supply // Metabolic Engineering. – 2017. – Vol. 41. – P. 212–221. – https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.04.008
142. *Yuan G., Xu X., Zhang Wei, Zhang Wenlei, Cui Y., Qin S., Liu T.* Biolistic transformation of *Haematococcus pluvialis* with constructs based on the flanking sequences of its endogenous alpha tubulin gene // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – Art. 1749. – https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01749
143. *Zabawinski C., Van Den Koornhuyse N., D'Hulst C., Schlichting R., Giersch C., Delrue B., Lacroix J. M., Preiss J., Ball S.* Starchless mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* lack the small subunit of a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase // Journal of Bacteriology. – 2001. – Vol. 183, iss. 3. – P. 1069–1077. – https://doi.org/10.1128/JB.183.3.1069-1077.2001
144. *Zhang J., Hao Q., Bai L., Xu J., Yin W., Song L., Xu L., Guo X., Fan C., Chen Y., Ruan J., Hao S., Li Y., Wang R., Hu Z.* Overexpression of the soybean transcription factor GmDof4 significantly enhances the lipid content of *Chlorella ellipsoidea* // Biotechnology for Biofuels. – 2014. – Vol. 7, iss. 1. – Art. 128. – https://doi.org/10.1186/s13068-014-0128-4
145. *Zhang Y., Ye Y., Bai F., Liu J.* The oleaginous astaxanthin-producing alga *Chromochloris zofingiensis*: potential from production to an emerging model for studying lipid metabolism and carotenogenesis // Biotechnology for Biofuels. – 2021. – Vol. 14, iss. 1. – Art. 119. – https://doi.org/10.1186/s13068-021-01969-z
146. *Zulu N. N., Zienkiewicz K., Vollheyde K., Feussner I.* Current trends to comprehend lipid metabolism in diatoms // Progress in Lipid Research. – 2018. – Vol. 70. – P. 1–16. – https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.03.001

GENETIC ENGINEERING IN MICROALGAE BIOTECHNOLOGY: ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS

Chelebieva E. S.[1], Kladchenko E. S.[1], Dantsyuk N. V.[1], Borovkov A. B.[1], Vodiasova E. A.[1,2]

[1]A. O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol, Russian Federation,
[2]Nikitsky Botanical Garden — National Scientific Center of RAS, Yalta, Russian Federation,
e-mail: elina.chelebieva@gmail.com

Abstract: This review summarizes information on the application of genetic engineering methods for culturing diatoms and green microalgae. The basic methods, the results achieved and the prospects for the use of genetically modified microalgae strains in biotechnology are discussed. Successful examples of application of directed genome editing methods for modification of model species of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard, 1888 and *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin, 1897 are presented. It is shown that knockouts and overexpression of key genes allow to significantly increase lipid accumulation in algal biomass without significant effect on growth, demonstrating the promising potential of this approach in optimizing the biotechnological potential of strains.
Keywords: microalgae, genetic engineering, biotechnology, producers

Сведения об авторах

Челебиева Элина Сергеевна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии гидробионтов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, elina.chelebieva@gmail.com
Кладченко Екатерина Сергеевна	кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории экологической иммунологии гидробионтов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, kladchenko_ekaterina@bk.ru
Дацюк Наталья Викторовна	научный сотрудник лаборатории функциональной геномики ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, nterent@mail.ru
Боровков Андрей Борисович	кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель отдела биотехнологии и фиторесурсов, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация, spirit2000sev@yandex.ru
Водясова Екатерина Александровна	кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела экологической паразитологии, ФГБУН ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», просп. Нахимова 2, г. Севастополь, 299011, Российская Федерация; старший научный сотрудник лаборатории биоинженерии растений отдела геномных и постгеномных технологий в растениеводстве, ФГБУН «Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН», Никитский спуск, 52, г. Ялта, пгт Никита, 298648, Российская Федерация, eavodiasova@gmail.com

Поступила в редакцию 07.06.2024 г.
Принята к публикации 28.08.2024 г.