### МЕТОДЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ЛЁЖКОСТИ ПЛОДОВ ТОМАТА

### Кузьмина Ю.В.

Санкт-Петербургский Государственный Университет, 199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9-11; yulia kuzmina97@mail.ru

На сегодняшний день методы редактирования генома широко используются во многих научных исследованиях, направленных на изучение фундаментальных биологических процессов, в частности, для регулирования созревания и продления сроков хранения растительной сельскохозяйственной продукции. В данном обзоре кратко рассмотрены методы редактирования генома растений и примеры их успешного применения для увеличения лёжкости плодов томата, как одной из важнейших сельскохозяйственных культур. Редактирование генома знаменует собой одну из новых областей генной инженерии, которая имеет поистине революционное значение для биотехнологии. На протяжении последних десятилетий были разработаны различные системы редактирования генома: нуклеазы цинковых пальцев (ZFN), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN), и кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы, узнаваемые нуклеазой Cas9 (CRISPR/Cas9). Наиболее широко распространенным и используемым методом является система CRISPR/Cas9, которая характеризуется многими преимуществами по сравнению с другими существующими системами редактирования генома.

**Ключевые слова**: растения, созревание плодов, CRIPSR/Cas9, нуклеазы, трансформация, TALEN, ZFN.

### Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах./The author has no financial interest in the materials or methods presented.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы/The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

### Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны/Extended data is available for this paper at https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-1-o6

Мнение журнала нейтрально  $\kappa$  изложенным материалам, авторам и их месту paботы/The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись/All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует/There is no conflict of interests.

# METHODS OF GENOME EDITING FOR INCREASING THE SHELF LIFE OF TOMATO FRUIT

#### Kuzmina Y.V.

Saint Petersburg State University, 7-9-11, Universitetskaya Emb., St. Petersburg 199034, Russia; wulia kuzmina97@mail.ru

Genome editing methods are now widely used in research aimed at studying fundamental biological processes, in particular for regulating maturation and extending shelf life of plant agricultural products. This review briefly discusses plant genome editing methods and examples of their successful application for increasing the storage life of fruits of tomato as one of the most important crops. Genome editing is one of the new areas of genetic engineering that is truly revolutionary in biotechnology. Various genome editing systems have been developed over the past decades: zinc finger nucleases (ZFNs), transcriptional activator-like effector nucleases (TALENs), and clustered regularly located short palindromic repeats recognized by Cas9 nuclease (CRISPR/Cas9). The most common and widely used is the CRISPR/Cas9 system, which has many advantages over other existing genome editing systems.

**Key words:** plants, fruit ripening, CRISPR/Cas9, nuclease, transformation, TALEN, ZFN.

**Для цитирования:** Кузьмина Ю.В. Методы редактирования генома для увеличения лёжкости плодов томата. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):31-39. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-06

**For citation:** Kuzmina Y.V. Methods of genome editing for increasing the shelf life of tomato fruit. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):31-39. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o6

ORCID:

Kuzmina Y.V. https://orcid.org/0000-0001-5484-1073

УДК 635.64:631.523.13:631.524.7:575.113 Поступила в редакцию: 18.03.2020 Принята к публикации: 04.06.2020

### Введение

Созревание и хранение плодов имеет большое экономическое значение для сельского хозяйства. Одной из основных задач для производителей является хороший вкус и пищевая ценность продукта еще на стадии созревания, а также достаточный срок годности и поддержание качества до его потребления. Созревание плодов представляет собой сложный и необратимый процесс развития, который включает в себя многочисленные метаболические, биохимические, физиологические и органолептические изменения (Martín-Pizarro, 2018). Среди этих изменений созревание приводит к размягчению плодов, накоплению сахаров, летучих соединений и пигментов, уменьшению количества органических кислот и т.д. Это особенно актуально для климактерических плодов, очень чувствительных к этилену, и для неклимактерических плодов, таких как клубника, которые быстро становятся несъедобными. Модельным объектом для изучения климактерических плодов стал томат (Solanum lycopersicum L.). Роль этилена в процессе созревания его плодов хорошо изучена. Напротив, регуляторная сеть, вовлеченная в созревание неклимактерических плодов, изучена гораздо меньше. Тем не менее, известно, что для контроля созревания клубники, модельного объекта в случае неклимактерических плодов, необходима абсцизовая кислота, а не этилен. Таким образом, увеличение срока годности плодов и изменение процесса их созревания всегда интересовало исследователей, которые для этого использовали как классические методы селекции и генетическую модификацию, так и, как в последние годы, методы редактирования генома. Подходы, позволяющие точно редактировать интересующий ген, основаны на использовании нуклеаз, которые нацелены на определенную нуклеотидную последовательность, в которой они производят двухцепочечный разрыв (DSB). Для осуществления этой реакции до настоящего времени использовали четыре основных класса настраиваемых ДНК-связывающих белков: мегануклеазы, нуклеазы цинковых пальцев (zinc finger nucleases, ZFNs), эффекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (transcriptional activator-like effector nucleases, TALEN) и нуклеаза Cas9, узнающая CRISPR РНК (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats in RNA, crRNA) (Brooks, 2014; Kamburova, 2017).

### Методы редактирования генома

Первым поколением инструментов редактирования генома были ZFN (Shah, 2017) — белковые комплексы, содержащие в качестве направляющих структур определенный тип белковых доменов — «цинковые пальцы», которые содержат молекулу цинка и по форме напоминают палец (Рис. 1А.). Каждый из этих белковых доменов способен распознавать и специфически связывать определенную последователь-

ность молекулы ДНК из трех нуклеотидов. Создавая искусственные нуклеазы, для точечного воздействия на интересующие участки в составе генома, конструируется цепочка из «цинковых пальцев» так, что она узнаёт именно целевой участок ДНК. Данный метод не получил широкого распространения, так как распознавание повторов из трех нуклеотидов не является строгим, что может привести, в ряде случаев, к разрезанию молекулы ДНК в «нецелевых» участках. К тому же метод оказался трудоёмким и дорогостоящим, ввиду того, что для каждой интересующей последовательности ДНК необходимо создать определенную белковую структуру нуклеазы.

Более перспективным средством избирательного воздействия на ДНК оказались конструкции на основе химерных нуклеаз (Kamburova, 2017), называемых нуклеазами TALEN (Рис. 1Б.). Основой для их создания послужили эффекторные белки, подобные активатору транскрипции (TALE), которые идентифицируют и запускают определенные промоторы генов растений с помощью набора тандемных повторов. Искусственная нуклеаза TALEN состоит из двух функциональных доменов: ДНК-распознающего домена и неспецифического домена расщепления ДНК Fok I. Роль ДНК-распознающей структуры в них играют белковые домены (TALE), которые, в свою очередь, включают в себя центральный повторяющийся домен (CRD). Он обеспечивает связывание ДНК и состоит из тандемных повторов (содержит 34 аминокислотных остатка), каждый из которых «узнает» только один нуклеотид в нуклеотидной последовательности-мишени. Два аминокислотных остатка в повторе, расположенные в положениях 12 и 13 высоко вариабельны (повторяющаяся переменная направления — RVD) и ответственны за распознавание специфического нуклеотида с вырожденностью связывания нескольких нуклеотидов с дифференциальной эффективностью. Другой составляющей химерных нуклеаз является каталитический домен рестрикционной эндонуклеазы Fok I. В дальнейшем, стало возможным создание и использование искусственных нуклеаз с ДНК-связывающим доменом и различными RVD, которые могут нацеливаться на любую интересующую исследователя нуклеотидную последовательность (Malzahn, 2017).

В основе использования мегануклеаз, ZFN и TALEN лежит сложный дизайн и синтез белков с настраиваемой ДНК-связывающей специфичностью, что ограничивает их распространение и использование.

Одним из методов редактирования генома, появившихся не так давно, является использование кластерных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов (Ghogare, 2019). Наиболее известной системой является CRISPR/Cas9. Этот метод использует адаптивную иммунную систему бактерий и архей, механизм которой зависит от наличия специальных участков в геноме, называемых локусами CRISPR (Kamburova, 2017; Brooks, 2017). Эти локусы состоят из оперонов, кодирующих белок Cas9, и повторяющихся спейсерных последовательностей (Рис. 1В.). Спейсеры представляют собой короткие фрагменты, происходящие от чужеродной ДНК (вирусной или плазмидной) и интегрированные

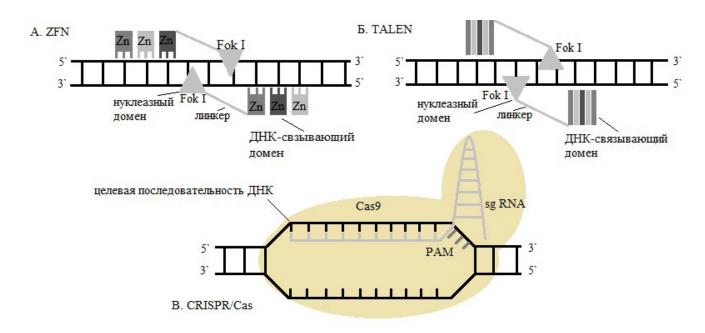


Рис. 1. Схематическое представление различных комплексов, используемых для редактирования генома. A – b ZNF, Б – TALEN, В – CRISPR/Cas9

Fig. 1. Schematic representation of various complexes used for genome editing. A – ZNF, B – TALEN, B – CRISPR/Cas9

в бактериальный геном посредством рекомбинации (Zhang, 2014). В отличие от химерных белков TALEN или ZFN, распознавание сайта-мишени системой CRISPR/Cas9 осуществляется путем взаимодействия, на основе комплементарности, между последовательностью направляющей (некодирующей) РНК и ДНК сайта-мишени, а комплекс белок-направляющая РНК и Cas обладает нуклеазной активностью для точного расщепления двухцепочечной ДНК с использованием эндонуклеазы Cas9 (Cong, 2013). На основе системы CRISPR/Cas типа II-A, имеющей в своем составе гены, кодирующие PHK CRISPR (crRNA), транс-активирующую crRNA (tracrRNA) и белок Cas9, были созданы универсальные генетические конструкции, кодирующие искусственные элементы «редактора генома» CRISPR/Cas (Doudna, 2014). Вместо некодирующих РНК — crRNA и tracrRNA, чаще используют единую химерную гидовую PHK — single guide RNA или сокращенно sgRNA (Nemudryi et al., 2014).

Активность CRISPR/Cas снижается при возникновении некоторых однонуклеотидных замен в 20-нуклеотидном спейсерном участке sgRNA, в особенности на 3`-конце, в то время как замены на 5'-конце практически не влияют на функционирование комплекса (Nemudryi et al., 2014).

Система CRISPR/Саѕ может быть использована для создания генетически модифицированных клеток, выращенных в культуре, и в живых организмах (Yang, 2017). В первом случае плазмиды или вирусные векторы, которые обеспечивают высокий и стабильный синтез элементов системы CRISPR/Саѕ9 вводят в клетки и поддерживают рост клеток

в культуре. Во втором случае плазмида, кодирующая элементы CRISPR/Cas, используется для получения генетически модифицированных растений (Shan, 2013). Плазмиду, как правило, вводят в *Agrobacterium*, природного «генного инженера», традиционно используемого для трансформации растений (Zhang, 2014). Использование системы CRISPR/Cas дает возможность осуществлять различные модификации генома: внесение точковых мутаций, замена или редактирование определенных фрагментов интересующих генов, встраивание в геном новых генов или удаление из него нуклеотидных последовательностей. К тому же, она обладает такими преимуществами, как простота сборки, низкая стоимость, высокая эффективность и специфичность.

При работе с системами TALEN и CRISPR/Cas9 необходимо проводить предварительный биоинформатический анализ, требуемый для подбора сайтов, в которые будут вноситься запланированные двухцепочечные разрывы. Такой анализ позволит избежать в большинстве случаев внесения нежелательных двухцепочечных разрывов, т.е. нецелевых эффектов. При выборе сайтов обращают внимание на то, чтобы последовательности не несли повторов и не характеризовались гомологией с другими участками генома.

Система CRISPR/Cas9 за короткое время уже нашла применение в различных областях фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии и генной инженерии, в том числе для контроля сроков созревания плодов. Остановимся на этом подробнее.

## Использование методов редактирования генома для изменения сроков созревания и хранения с/х продукции

Несмотря на большое количество исследований с использованием технологии редактирования генома для изучения функциональных генов растений и повышения урожайности культур, лишь небольшая часть из них была направлена на совершенствование или выявление ключевых регуляторов созревания плодов как важнейшего процесса развития (Martín-Pizarro, 2018).

### Изменение сроков созревания плодов томата

В случае двудольных культур томат стал идеальным кандидатом для редактирования генома благодаря нескольким преимуществам: диплоидный и высококачественно секвенированный геном, легкость трансформации, экономическое значение (четвертая по значимости коммерческая культура в мире) (Martín-Pizarro, 2018).

Процесс созревания плодов томата включает в себя 3 основных компонента — гормон этилен, факторы созревания (основные — NOR, CNR и RIN) и метилирование ДНК. В начале созревания характерны пики дыхания и производства этилена, которое, как и его восприятие, строго регулируется. Некоторые факторы транскрипции (ТФ), такие как NOR, CNR и RIN влияют на биосинтез и передачу сигнала этилена во время созревания. Также эти ТФ контролируют экспрессию генов-мишеней, участвующих в широком спектре связанных с созреванием событий. RIN связывается с деметилированными промоторными областями нескольких генов, таких как гены биосинтеза этилена

SIACS2, SIACS4, SIACO1, NR, и другие, продукты которых участвуют в размягчении плодов и регуляции транскрипции генов гидролаз клеточной стенки PG (полигалактуроназа), MAN4 (маннаназа 4) и других. RIN также положительно стимулирует экспрессию CNR. Во время созревания промотор CNR постепенно деметилируется, но у мутантов спг промотор остается гиперметилированным, предотвращая связывание с ним RIN. CNR вовлечен в позитивную регуляцию многих генов, связанных с созреванием, включая PG, PE (пектинэстераза), XET/XTH (ксилоглюканэндотрансгликозилаза), PSY1 (фитоен синтаза 1), LOX (липоксигеназа) и ACO1 (Quinet, 2019).

NOR кодирует транскрипционный фактор семейства NAC, который регулирует созревание плодов по неясному в настоящее время механизму, в то время как мутации в этом гене ингибируют множественные метаболические процессы и продлевают срок хранения плодов. Мутация по этому гену оказала более глобальное влияние на экспрессию генов, связанных с этиленом/созреванием, чем rin, что позволяет предположить, что NOR может даже действовать выше RIN в транскрипционной сети, лежащей в основе созревания плодов томата. В дополнение к NOR, известно, что три других гена семейства NAC: SINAC1, SINAC4 и NOR-like1, участвуют в регуляции созревания плодов томата (Quinet, 2019).

Эти и многие другие гены, вовлеченные в процесс созревания плодов, могут быть интересны для последующих исследований в направлении получения продукта с увеличенным сроком хранения.

Для части из вышеперечисленных генов, а также для некоторых других, уже были проведены эксперименты по редактированию и получению форм с измененным сроком годности. Список генов приведен в виде таблицы (таблица), ее описание следует в тексте.

### Таблица. Применение методов редактирования генома для изменения сроков созревания и хранения плодов томата

Table. Application of genome editing techniques to modify maturation and storage life of tomato fruit

Метод Method	Ген Gene	Функция Function	Ссылка Reference
TALEN	PROCERA (PRO)	Метаболизм гиббереллинов	Lor et al., 2014
ZFNs	LEAFY COTYLEDONI-LIKE4 (LIL4)	Плейотропные эффекты	Hilioti et al., 2016
CRISPR/Cas9	RIPENING-INHIBITOR (RIN)	Созревание плодов	Ito et al., 2015, 2017

Метод Method	Ген Gene	Функция Function	Ссылка Reference
CRISPR/Cas9	CNR (COLORLESS NON-RIPENING) и NOR (NON-RIPENING)	Созревание плодов	Gao et al., 2019
CRISPR/Cas9	LONG-NON CODING RNA (IncRNA1459)	Созревание плодов	Li et al., 2018
CRISPR/Cas9	ORGANELLE RECOGNITION MOTIF (SIORRM4)	Митохондриальная функция	Yang et al., 2017
CRISPR/Cas9	PECTATE LYASE (PL)	Сохранность плодов	Uluisik et al., 2016
CRISPR/Cas9	ALC	Сохранность плодов	Yu et al. 2017

Первые сообщения о редактировании генома у томатов появились в 2014 году (см. табл.). ТАLEN был впервые применен для генерации мутаций в цельных растениях, в частности в гене *PROCERA* (*PRO*). Ген уже был охарактеризован, что позволило провести функциональную проверку этих новых подходов. В частности, *PRO* кодирует белок DELLA, который действует как негативный регулятор передачи сигналов гиббереллина (GA). Было показано, что у таких *рго*-мутантов созревание плодов значительно задерживается. Таким образом, можно было бы ожидать, что созревание плодов также изменится в ТАLEN-индуцированных *рго*-мутантах, хотя авторами не был охарактеризован фенотип плодов (Lor, 2014).

Два года спустя, в 2016 году, впервые для редактирования генома томата были использованы нуклеазы «цинковых пальцев» ZFNs для изменения гена *LEAFY COTYLENDONI-LIKE4* (*LIL4*), который кодирует субъединицу гетеротримерного фактора транскрипции. Мутация в *LIL4* приводила к плейотропному эффекту, включая изменения размеров и формы плодов, уменьшение количества гнезд в плоде. Кроме того, были получены плоды с более бледным цветом и более медленным созреванием. Однако, до сих пор неизвестно, каким образом *LIL4* регулирует эти процессы (Hilioti, 2014).

Большое количество исследований было сосредоточено на роли различных ТФ, вовлеченных в процесс созревания. Поэтому, в 2015 году был использо-

ван метод CRISPR/Cas для получения мутации в гене RIPENING-INHIBITOR (RIN), продуктом которого является один из наиболее исследованных транскрипционных факторов, участвующих в созревании плодов. RIN экспрессируется на ранних стадиях созревания и регулирует этилен-зависимые и этилен-независимые пути, способствующие созреванию плодов. Ген RIN — представитель класса SEPALATA (SEP) семейства генов MADS-box, впервые был обнаружен полвека назад, когда была обнаружена мутация в этом локусе (rin), которая стала причиной неспособности созревания плодов у растений томата. Мутация rin в гетерозиготе (RIN/rin), что свойственно гибридным сортам, благотворно влияла на созревание плодов томата и приводила к увеличению сроков их хранения, что создавало условия для коммерческого использования гибридных сортов. Из-за важности и четкого фенотипа мутации *rin* исследователями (Ito et al., 2015) было проведено редактирование последовательности гена RIN методом CRISPR/Cas9 для проверки функциональности и наследования мутаций, индуцированных таким способом у томата.

Ito и соавт. (2015) разработали три конструкции CRISPR/Cas9 для введения мутаций в три разные области локуса RIN (Рис. 2.). Выбранные последовательности ДНК для sgRNAs были клонированы в вектор для системы CRISPR/Cas9 и, с помощью полученных векторов, был трансформирован сорт томата Ailsa Craig.

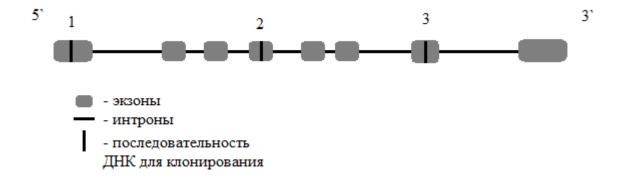


Рис. 2. Области локуса RIN, выбранные для клонирования в векторе. 1 – стартовый кодон RIN (ATG)

- 2 средняя часть кодирующей области, которая кодирует Kdomain, необходимый для взаимодействия белка с MADS box
   3 – средняя область C terminal домена, который необходим для
  - 3 средняя область C terminal домена, который необходим для формирования тетрамера и активирования транскрипции

Fig. 2. Regions of the RIN locus selected for cloning in a vector. 1 – start codon RIN (ATG)

2 - middle part of the coding region that encodes Kdomain, necessary for the interaction of the protein with the MADS box
3 - middle region of the C terminal domain, which is necessary for the tetramer formation and transcription activation

Как и ожидалось, плоды растений  $T_0$ , дефектных по белку RIN, характеризовались несозревающими плодами. Однако, в отличие от мутанта rin, эти мутанты, полученные с помощью системы CRISPR/Cas, частично инициировали процесс созревания, и это было истолковано как результат присутствия RIN дикого типа в поколении  $T_0$  (Ito et al., 2015).

Таким образом, ген RIN на тот момент рассматривался как важнейший регулятор созревания, и модели были основаны на том, что мутация по гену RIN приводила к потере функции гена дикого типа. Тем не менее, это заключение было опровергнуто той же командой ученых через 2 года (Ito et al., 2017). Их новый опыт показал, что в отличие от мутанта rin, гомозиготные мутанты rin rin (RIN-KO), полученные при использовании метода редактирования генома CRISPR/Cas9 достигали бледно-красного цвета, но не перестали созревать. Был сделан вывод, что созревание может начинаться вне зависимости от гена RIN. Кроме того, исследователи также предложили, что этот мутантный белок, возможно, приобрел новую функцию и стал блокировать инициацию созревания. Таким образом, в этом исследовании было сделано предположение, что мутантный белок rin нарушал ДНК-связывание и активацию других генов-регуляторов, связанных с созреванием, таких как NOR и CNR.

В 2019 году была опубликована статья (Gao et al., 2019) в которой авторы рассмотрели разнообразие и избыточность регуляторных сетей созревания плодов томата. Они использовали в своем исследовании растения томата с мутациями в двух ранее упомянутых генах NOR и CNR, полученными путем редактирования генома с использованием системы CRISPR/Cas9. Гидовую РНК (sgRNA) амплифицировали и клонировали в бинарном векторе, используя метод Golden Gate. Это метод молекулярного клонирования, который позволяет исследователю одновременно и направленно собирать несколько фрагментов ДНК в один фрагмент, используя рестриктазы и Т4 ДНК-лигазу. Полученными векторами были трансформированы растения томата сорта Ailsa Craig. Геномную ДНК выделяли из молодых листьев трансгенных линий и амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих сайты-мишени. Продукты ПЦР секвенировали для выявления мутаций. В итоге были получены растения томата с отредактированным геном CNR, плоды которых характеризовались только замедленным созреванием, тогда как для растений с измененным геном NOR было показано отсутствие созревания плодов, сходно с мутантами по гену RIN CRISPR/Cas9. Оба мутантных растения все же отличаются по фенотипу от природных мутантов с полностью

несозревающими плодами. И хотя *CNR* и *NOR* считаются основными генами, участвующими в регуляции созревания плодов у растений, они являются всего лишь небольшой частью регуляторной сети, в которой большую роль играют эпигенетические факторы, такие как метилирование ДНК, метилирование и деацетилирование гистонов, регулирующие экспрессию генов, участвующих в процессе созревания плодов.

Созревание плодов помимо уже рассмотренных факторов также регулируется на посттрансляционном уровне с участием некодирующих РНК. Для дальнейшего исследования этого факта в двух работах была использована система CRISPR/Cas9 для идентификации и характеристики посттранскрипционных регуляторов созревания плолов томата

У растений длинные некодирующие РНК (lncRNAs) являются важными регуляторами экспрессии генов, поскольку они взаимодействуют с ДНК, РНК и белками. Интересно, что для трех последовательностей lncRNAs, lncRNA1459 и lncRNA1840, была недавно обнаружена связь с созреванием плодов томата. Для дальнейшего изучения роли lncRNA1459 ген созревания плодов был устойчиво нокаутирован с использованием CRISPR/Cas9, а полученные мутантные линии CR-lncRNA1459 характеризовались задержкой созревания плодов. Молекулярный анализ этого мутанта показал, что у него подавляется работа ключевых генов, связанных с созреванием, и участвующих в контроле биосинтеза ликопина и этилена, а также в передаче сигнала. Соответственно, CR-lncRNA1459 мутантные плоды показали снижение накопления ликопина и ингибирование производства этилена. Однако механизм и целевые гены lncRNA1459, участвующие в регуляции созревания плодов, все еще нуждаются в уточнении (Li, 2018).

В процессе созревания также присутствует еще один вариант посттранскрипционной регуляции - редактирование РНК. У цветковых растений редактирование РНК путем превращения цитидина в уридин (С-U) является широко распространенным процессом, который происходит только в пластидных и митохондриальных транскриптах и играет важную роль в процессах развития растений, таких как биогенез органелл и адаптация к изменениям окружающей среды. В 2017 году группа исследователей (Yang, 2017) выявила факторы редактирования РНК, которые могут играть существенную роль в регуляции созревания плодов томата. Был проведен анализ вирус-индуцированного замолкания генов (VIGS) и обнаружено 11 генов, участвующих в редактировании РНК. Один из генов, в частности, кодирует белок SLORRM4, который находится в митохондриях. Соответственно, CRISPR/Cas9-опосредованные стабильные мутанты slorrm4 характеризовались задержкой созревания и уменьшением степени дыхания и продукции этилена по сравнению с диким типом. Дальнейшие молекулярные исследования показали, что мутация slorrm4 приводит к понижающей регуляции генов, связанных с циклом Кребса и функцией митохондрий, а также к снижению уровня продукции белков, необходимых для дыхательной цепи митохондрий, что подтверждает существенную роль митохондрий в регуляции созревания. Однако, специфические механизмы, связывающие редактирование РНК митохондрий с созреванием, требуют дальнейшего изучения.

Таким образом, применение вышеописанных методов редактирования генома к интересующим последовательностям генов, кодирующих различные ТФ, участвующие в процессах созревания плодов, позволит точно регулировать эти процессы в зависимости от задач исследователей.

### Изменение сроков хранения плодов томата

Длительный срок годности является критическим признаком качества мясистых плодов растений. Продление сроков хранения является одной из основных целей исследователей, поскольку это сказывается на экономической ценности плодов, как для фермеров, так и для потребителей. Существует несколько естественных мутаций, увеличивающих срок годности плодов, таких как Nr (Never ripe), alc (alcobaca), rin (ингибитор созревания), nor (не созревает) и cnr (бесцветный не созревает), и эти гены были клонированы и изучены на молекулярном уровне (Yu, 2017). Кроме того, мутации rin, nor и alc были использованы для программ селекции по получению форм с длительным сроком хранения. Однако, эти мутации негативно влияют на органолептические свойства плодов, хотя alc мутация оказывала наименьший эффект такого рода по сравнению с rin и nor при селекции сортов по признаку 'длительный срок хранения', иными словами наблюдали низкое отрицательное влияние этой мутации на качество плодов, особенно на цвет кожицы, ароматические свойства и устойчивость к бактериальным болезням. Молекулярной основой мутации alc является замена тимина на аденин в положении 317 кодирующей последовательности гена NOR. Эта мутация замены одной пары оснований приводит к несинонимичному изменению аминокислотного состава полипептида: замене валина (Val) на аспарагиновую кислоту (Asp). При помощи нуклеаз CRISPR/Cas9 аллель ALC была заменена на alc, что привело к увеличению сроков хранения плодов томата. Синтетическая плазмида была введена в гипокотили томата посредством стабильной трансформации, опосредованной Agrobacterium. Результаты исследований показали, что сочетание аллелей alc/alc может значительно улучшить показатели лёжкости плодов томата и продлить срок их хранения.

Гибридные растения, гетерозиготы RIN/rin, широко используются селекционерами томатов. Однако, неполное созревание этих гибридных плодов часто приводит к плохому вкусу и снижению их питательной ценности. Изменение характеристик текстуры плода для увели-

чения срока годности без снижения органолептических и питательных свойств томатов было проблемой для исследователей и селекционеров на протяжении многих лет.

Размягчение плодов томата включает в себя изменение структуры клеточных стенок, богатых полисахаридами, снижение межклеточной адгезии и изменение свойств кутикулы. Все эти изменения влияют на потерю воды. Точный механизм смягчения стенки плодов и важность каждого фактора были предметом десятилетних исследований, но оставались неясными. Секвенирование генома томата выявило более 50 структурных генов, кодирующих известные или предполагаемые белки, модифицирующие клеточную стенку, которые экспрессируются в развивающихся и созревающих плодах. Из них гены полигалактуроназ (PG), пектинметилэстераз, β-галактаназ и экспансинов экспрессируются в большом количестве во время процесса созревания, и все они были исследованы в качестве кандидатов для стимулирования изменений в текстуре плодов.

Нокаутирование гена, связанного с клеточной стенкой, пектатлиазы (PL), было успешно применено для изменения плотности плодов как у томата, так и у клубники. Подавление PL повышает плодовую стойкость без изменений цвета, размера, общего количества растворимых сухих веществ или метаболитов, влияющих на вкус и аромат, как клубники, так и томата (Uluisik, 2016). В частности, у томатов предварительный анализ CRISPR/Cas9-индуцированных pl-мутантов показал влияние на сохранность плодов без изменения цвета и содержания растворимых сухих веществ. Мутантные линии, полученные методом CRISPR/Cas9, сохраняют другие важные агрономические характеристики, такие как аромат, вкус, урожайность, цвет и устойчивость к патогенам, все необходимые признаки для успешного выхода на рынок.

Было обнаружено пять генов *PL*, которые экспрессируются в плодах томата Ailsa Craig, но только одна аллель (*Solyc03g111690*) экспрессировалась на высоком уровне во время созревания (Uluisik, 2016). Замолкание гена *PL* при помощи нуклеазы CRISPR/Cas9 привело к получению плодов, стенка которых была подвержена размягчению, но более медленному, чем у растений дикого типа, при этом не было обнаружено влияния на урожайность, массу, биосинтез этилена, цвет или общее количество растворимых твердых веществ по сравнению с контролем. Также не было обнаружено существенных изменений в метаболитах, которые бы влияли на цвет, вкус или аромат плода по сравнению с контролем, растениями дикого типа.

### Заключение

Редактирование генома на основе CRIPSR/Cas9 – это революционная технология для фундаментальных

и прикладных исследований животных и растений. Для изменения сроков созревания и хранения мягких плодов сельскохозяйственных растений в основном используют систему CRIPSR/Cas9. Быстрое развитие новых и улучшенных инструментов и систем доставки целевых последовательностей в геном хозяина, основанных на CRISPR/Cas9, может помочь решить многие мировые проблемы, связанные с обеспечением населения качественными продуктами питания. Однако, использование технологий редактирования генома ограничено из-за трудностей трансформации сложных и крупных геномов растений или отсутствия геномной информации, медленных циклов развития и роста растений. С другой стороны, инструменты редактирования генома имеют возможность удалять трансгены путем самоконтроля или обратного скрещивания, что является важным преимуществом по сравнению с традиционными подходами, связанными с генетической модификацией. Более того, предварительно собранные рибонуклеопротеины (RNP) белка - sgRNA Cas9 устраняют вероятность вставки рекомбинантной ДНК в геном хозяина. Использование техники редактирования генома позволит в будущем удовлетворить растущие продовольственные потребности в мире. Несмотря на то, что существует уже немало исследований в области изменения генов посредством редактирования различных геномных последовательностей, хранящих в себе информацию о факторах, лежащих в основе процессов созревания и хранения плодов, пройдет еще немало времени, прежде чем результаты этих исследований станут основой для коммерческого использования на мировом рынке сельского хозяйства генетически модифицированной продукции.

### Благодарности/Acknowledgements

Автор благодарит рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы, Матвееву Т.В. за вклад в данный обзор. Обзор подготовлен в рамках магистерской программы «Молекулярная биология и агробиотехнология растений» биологического факультета СПбГУ / The author thanks the reviewers for their contribution to the peer review of this work, and Matveeva T.V. for contributing to this review. The review was prepared as part of the Master Degree Program in Molecular Biology and Plant Agrobiotechnology of the Faculty of Biology of Saint Petersburg State University.

### References/Литература

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013;339(6121):819-823. DOI: 10.1126/science.1231143

Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z.B., Van Eck J. Efficient Gene Editing in Tomato in the First Generation Using the Clustered Reg-

- ularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-Associated9 System. *Plant Physiology*. 2014;166(3):1292-1297. DOI: 10.1104/pp.114.247577
- Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. DOI: 10.1126/science.1258096
- Gao Y., Zhu N., Zhu X., Wu M., Jiang C.-Z., Grierson D., Luo Y., Shen W., Zhong S., Fu Da-Qi, Qu G. Diversity and redundancy of the ripening regulatory networks revealed by the fruitENCODE and the new CRISPR/Cas9 CNR and NOR mutants. Horticulture Research. 2019;6:39. DOI: 10.1038/s41438-019-0122-x
- Ghogare R., Williamson-Benavides B., Ramírez-Torres F., Dhingra A. CRISPR-associated nucleases: the Dawn of a new age of efficient crop improvement. *Transgenic Research*. 2019;29(1):1-35. DOI: 10.1007/s11248-019-00181-y
  Hilioti Z., Ganopoulos I., Bossis I., Tsaftaris A. LEC1-LIKE paralog
- Hilioti Z., Ganopoulos I., Bossis I., Tsaftaris A. LECI-LIKE paralog transcription factor: how to survive extinction and fit in NF-Y protein complex. *Gene.* 2014;543(2):220-233. DOI: 10.1016/j. gene.2014.04.019
- Ito Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Mikami M., Toki S. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2015;467(1):76-82 DOI: 10.1016/j. bbrc.2015.09.117
- Ito Y., Nishizawa-Yokoi A., Endo M., Mikami M., Shima Y., Nakamura N., Kotake-Nara E., Kawasaki S., Toki S. Re-evaluation of the *rin* mutation and the role of RIN in the induction of tomato ripening. *Nature Plants*. 2017;3(11):866-874. DOI: 10.1038/s41477-017-0041-5
- Kamburova V.S., Nikitina E.V., Shermatov S.E., Buriev Z.T., Kumpatla S.P., Emani C., Abdurakhmonov I.Y. Genome Editing in Plants: An Overview of Tools and Applications. *International Journal of Agronomy*. 2017;UNSP 7315351. DOI: 10.1155/2017/7315351
- Li R., Fu D., Zhu B., Luo Y., Zhu H. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of lncRNA1459 alters tomato fruit ripening. *Plant Journal*. 2018;94(3):513-524. DOI: 10.1111/tpj.13872
- Lor V.S., Starker C.G., Voytas D.F., Weiss D., Olszewski N.E. Targeted Mutagenesis of the Tomato PROCERA Gene Using Transcription Activator-Like Effector Nucleases. Plant Physiology. 2014;166(3):1288-1291. DOI: 10.1104/pp.114.247593
- Malzahn A., Lowder L., Qi Y. Plant genome editing with TALEN

- and CRISPR. Cell Bioscience. 2017;7:21. DOI: 10.1186/s13578-017-0148-4
- Martín-Pizarro C., Posé D. Genome editing as a tool for fruit ripening manipulation. *Frontiers of Plant Sciences*. 2018;9:1415. DOI: 10.3389/fpls.2018.01415
- Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*. 2014;6(3):19-40. DOI: 10.32607/20758251-2014-6-3-19-40.
- Quinet M., Angosto T., Yuste-Lisbona F.J., Blanchard-Gros R., Bigot S., Martinez J.P., Lutts S. Tomato Fruit Development and Metabolism. *Frontiers of Plant Sciences*. 2019;10:1554. DOI: 10.3389/fpls.2019.01554
- Shah T., Andleeb T., Lateef S., Noor M.A. Genome editing in plants: Advancing crop transformation and overview of tools. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018;131(SI):12-21. DOI: 10.1016/j. plaphy.2018.05.009
- Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J.J., Qiu J.-L., Gao C. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8):686-688. DOI: 1038/nbt.2650
- Uluisik S., Chapman N.H., Smith R., Poole M., Adams G., Gillis R.B. et al. Genetic improvement of tomato by targeted control of fruit softening. *Natural Biotechnology*. 2016;34:950-952. DOI: 10.1038/nbt.3602
- Yang L., Huang W., Xiong F., Xian Z., Su D., Ren M., Li Z. Silencing of SIPL, which encodes a pectate lyase in tomato, confers enhanced fruit firmness, prolonged shelf-life and reduced susceptibility to grey mould. Plant Biotechnology Journal. 2017;15(12):1544-1555. DOI: 10.1111/pbi.12737
- Yang Y., Zhu G., Li R., Yan S., Fu D., Zhu B., Tian H., Luo Y., Zhu H. The RNA Editing Factor SlORRM4 Is Required for Normal Fruit Ripening in Tomato. *Plant Physiology*. 2017;175:1690-1702. DOI: 10.1104/pp.17.01265
- Yu Q.-H., Wang B., Li N., Tang Y., Yang S., Yang T., Xu J., Guo C., Yan P., Wang Q., Asmutola P. CRISPR/Cas9-induced Targeted Mutagenesis and Gene Replacement to Generate Long-shelf Life Tomato Lines. Scientific Reports. 2017;7:11874. DOI: 10.1038/ s41598-017-12262-1
- Zhang F., Wen Y., Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*. 2014;23(R1):R40-R46. DOI: 10.1093/hmg/ddu125