

ISSN: 2658-6266 (Print)

ISSN: 2658-6258 (Online)

# БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

3(1), 2020



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)



THE MINISTRY OF SCIENCE AND HIGHER  
EDUCATION OF THE RUSSIAN FEDERATION  
FEDERAL RESEARCH CENTER  
THE N.I. VAVILOV ALL-RUSSIAN INSTITUTE OF  
PLANT GENETIC RESOURCES (VIR)

НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

# БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2020, 3(1)

ОСНОВАН В 2018 ГОДУ  
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 4 РАЗА В ГОД

*Для биотехнологов, селекционеров, генетиков,  
преподавателей вузов биологического  
и сельскохозяйственного профиля.*

e-mail: [pbi@vir.nw.ru](mailto:pbi@vir.nw.ru)

190000 Россия, г. Санкт-Петербург,  
ул. Б. Морская, 42, 44

© Федеральный исследовательский центр  
Всероссийский институт генетических ресурсов  
растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)

DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1  
УДК: 573.6:631.527

ПИ № ФС 77–74475  
ISSN: 2658-6266 (Print)  
ISSN: 2658-6258 (Online)

SCIENTIFIC PEER REVIEWED JOURNAL

# PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2020, 3(1)

FOUNDED IN 2018  
PUBLISHED 4 TIMES ANNUALLY

*Addressed to biotechnologists, geneticists,  
plant breeders and lecturers of biological  
and agricultural universities and colleges.*

e-mail: [pbi@vir.nw.ru](mailto:pbi@vir.nw.ru)

42, 44 Bolshaya Morskaya Street,  
St. Petersburg 190000, Russia

© Federal Research Center  
the N.I. Vavilov All-Russian Institute  
of Plant Genetic Resources (VIR)

---

**Главный редактор:**

**Е. К. Хлесткина** – д.б.н., профессор РАН.

**Заместитель главного редактора:**

**Т. А. Гавриленко** – д.б.н.

**Ответственные секретари:**

**И. Н. Анисимова** – д.б.н.

**Л. Ю. Новикова** – д.с.-х.н.

**Редакционный совет:**

А. И. Абугалиева – д.б.н. (Казахстан)  
О. С. Афанасенко – д.б.н., академик РАН (Россия)  
Г. А. Баталова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)  
Р. К. Берсимбаев – д.б.н., академик НАН РК (Казахстан)  
Л. А. Беспалова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)  
А. И. Грабовец – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)  
С. И. Гриб – д.с.-х.н., академик НАНБ (Беларусь)  
Е. А. Егоров – д.э.н., академик РАН (Россия)  
В. Г. Еремин – д.с.-х.н., профессор РАН (Россия)  
Г. В. Еремин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)  
Г. И. Карлов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)  
А. В. Кильчевский – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)  
З. А. Козловская – д.с.-х.н. (Беларусь)  
Н. А. Колчанов – д.б.н., академик РАН (Россия)  
В. Н. Корзун – д-р (Германия)  
А. В. Кочетов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)  
Н. В. Кухарчик – д.с.-х.н. (Беларусь)  
В. М. Лукомец – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)  
Л. А. Лутова – д.б.н. (Россия)  
С. Мишева – д-р (Болгария)  
А. И. Моргунов – д-р (Турция)  
В. Ройчев – д.с.-х.н. (Болгария)  
А. А. Романенко – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)  
А. В. Рындин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)  
Е. Н. Седов – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)  
И. А. Тихонович – д.б.н., академик РАН (Россия)  
П. Н. Харченко – д.б.н., академик РАН (Россия)  
Л. В. Хотылева – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)  
В. К. Шумный – д.б.н., академик РАН (Россия)

**Редакционная коллегия:**

Е. Е. Андронов – к.б.н. (Россия)  
Д. А. Афонников – к.б.н. (Россия)  
А. Х. Баймиев – д.б.н. (Россия)  
И. А. Белан – к.с.-х.н. (Россия)  
А. Г. Беседин – к.с.-х.н. (Россия)  
М. А. Вишнякова – д.б.н. (Россия)  
В. А. Гаврилова – д.б.н. (Россия)  
С. В. Гаркуша – д.с.-х.н. (Россия)  
Т. А. Гасанова – к.с.-х.н. (Россия)  
С. В. Герасимова – к.б.н. (Россия)  
М. С. Гинс – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)  
С. В. Гончаров – д.б.н. (Россия)  
Р. О. Давоян – д.б.н. (Россия)  
Я. Н. Демулин – д.б.н. (Россия)  
М. Г. Дивашук – к.б.н. (Россия)  
С. Н. Еланский – д.б.н. (Россия)  
О. В. Еремина – д.с.-х.н. (Россия)  
А. П. Ермишин – д.б.н. (Беларусь)  
М. В. Ефимова – к.б.н. (Россия)  
Р. Ш. Заремук – д.с.-х.н. (Россия)  
С. В. Зеленцов – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)  
Е. Т. Ильницкая – к.б.н. (Россия)  
Р. Н. Календарь – к.б.н. (Казахстан)  
Н. Н. Карпун – к.б.н. (Россия)  
В. С. Ковалев – д.с.-х.н. (Россия)  
Н. Н. Коваленко – д.б.н. (Россия)  
Е. З. Кочиева – д.б.н. (Россия)  
Б. Р. Кулуев – д.б.н. (Россия)  
К. У. Куркиев – д.б.н. (Россия)  
С. В. Кушнаренко – к.б.н. (Казахстан)  
И. Н. Леонова – д.б.н. (Россия)  
И. Е. Лихенко – д.с.-х.н. (Россия)  
В. В. Лиховской – д.с.-х.н. (Россия)  
П. Н. Мальчиков – д.с.-х.н. (Россия)  
Т. В. Матвеева – д.б.н. (Россия)  
Н. В. Мироненко – д.б.н. (Россия)  
И. В. Митрофанова – д.б.н. (Россия)  
Е. И. Михайлова – д.б.н. (Россия)  
С. В. Осипова – д.б.н. (Россия)  
В. Н. Подорожный – к.с.-х.н. (Россия)  
Т. Г. Причко – д.с.-х.н. (Россия)  
Т. А. Рожмина – д.б.н. (Россия)  
А. В. Смыков – д.с.-х.н. (Россия)  
А. А. Соловьев – д.б.н., профессор РАН (Россия)  
И. И. Супрун – к.б.н. (Россия)  
Е. К. Турусбеков – к.б.н. (Казахстан)  
Е. В. Ульяновская – д.с.-х.н. (Россия)  
О. Ю. Урбанович – д.б.н. (Беларусь)  
Ю. В. Фотев – к.с.-х.н. (Россия)  
Э. Б. Хатефов – д.б.н. (Россия)  
Я. А. Цепилов – к.б.н. (Россия)  
М. Н. Шаптуренко – д.б.н. (Беларусь)  
О. Ю. Шоева – к.б.н. (Россия)  
Л. А. Эльконин – д.б.н. (Россия)  
Г. В. Якуба – к.б.н. (Россия)

**Editor-in-Chief:**

**E. K. Khlestkina** – Dr. Sci. in Biol., Professor.

**Deputy Editor-in-Chief:**

**T. A. Gavrilenko** – Dr. Sci. in Biol.

**Executive Secretaries:**

**I. N. Anisimova** – Dr. Sci. in Biol.

**L. Yu. Novikova** – Dr. Sci. in Agricul.

**Editorial council:**

A. I. Abugalieva – Dr. Sci. in Biol. (Kazakhstan)  
O. S. Afanasenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)  
G. A. Batalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)  
R. K. Bersimbaev – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS RK (Kazakhstan)  
L. A. Beshalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)  
E. A. Egorov – Dr. Sci. in Econ., Full Member of the RAS (Russia)  
G. V. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)  
V. G. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Professor (Russia)  
A. I. Grabovets – Dr. Sci. in Agricul., Corr. Member of the RAS (Russia)  
S. I. Grib – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)  
G. I. Karlov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)  
P. N. Kharchenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)  
L. V. Khotyleva – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)  
A. V. Kilchevsky – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NAS of Belarus (Belarus)  
A. V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)  
N. A. Kolchanov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)  
V. N. Korzun – Dr. (Germany)  
Z. A. Kozlovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)  
N. V. Kukharchik – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)  
V. M. Lukomets – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)  
L. A. Lutova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
S. Misheva – Dr. (Bulgaria)  
A. I. Morgunov – Dr. (Turkey)  
A. A. Romanenko – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)  
A. V. Ryndin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)  
V. Roychev – Dr. Sci. in Agricul. (Bulgaria)  
E. N. Sedov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)  
V. K. Shumny – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)  
I. A. Tikhonovich – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

**Editorial board:**

D. A. Afonnikov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
E. E. Andronov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
A. H. Bajmiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
I. A. Belan – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)  
A. G. Besedin – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)  
R. O. Davoyan – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
Ya. N. Demurin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
M. G. Divashuk – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
M. V. Efimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
S. N. Elansky – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
L. A. Elkonin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
O. V. Eremina – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
A. P. Ermishin – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)  
Yu. V. Fotev – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)  
S. V. Garkusha – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
T. A. Gasanova – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)  
V. A. Gavrilova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
S. V. Gerasimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
M. S. Gins – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)  
S. V. Goncharov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
E. T. Ilnitskaya – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
R. N. Kalendar – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)  
N. N. Karpun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
E. B. Khatefov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
E. Z. Kochieva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
N. N. Kovalenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
V. S. Kovalev – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
B. R. Kuluev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
K. U. Kurkiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
S. V. Kushnarenko – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)  
I. N. Leonova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
I. E. Lihenko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
V. V. Likhovskoi – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
P. N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
T. V. Matveeva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
N. V. Mironenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
I. V. Mitrofanova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
E. I. Mikhailova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
S. V. Osipova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
V. N. Podorozhnyi – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)  
T. G. Prichko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
T. A. Rozhmina – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
M. N. Shapturenko – Dr. Sci. Biology (Belarus)  
O. Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
A. V. Smykov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
A. A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)  
I. I. Suprun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
Ya. A. Tsepilov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
E. K. Turuspekov – Cand. Sci. in Biol.  
E. V. Ulyanovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
O. Yu. Urbanovich – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)  
M. A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)  
G. V. Yakuba – Cand. Sci. in Biol. (Russia)  
R. Sh. Zaremuk – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)  
S. V. Zelentsov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

# Содержание

## ОТ РЕДАКЦИИ

5

*Хлесткина Е. К., Гавриленко Т. А.*

## ВСТУПИТЕЛЬНАЯ СТАТЬЯ

### ОБЗОР (ОБЗОР ПРОБЛЕМЫ)

7

*Тихонович И. А., Лутова Л. А.,  
Матвеева Т. В.*

О ПОДГОТОВКЕ МАГИСТРОВ  
ПО НОВОЙ ПРОГРАММЕ  
«МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И  
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»  
В САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОМ  
ГОСУДАРСТВЕННОМ  
УНИВЕРСИТЕТЕ (СПбГУ)

### ОБЗОР

31

*Кузьмина Ю. В.*

МЕТОДЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ  
ГЕНОМА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ  
ЛЁЖКОСТИ ПЛОДОВ ТОМАТА

### ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

13

*Синюшин А. А., Анисимова Д. А.*

К ПРОБЛЕМЕ ДИНАМИКИ  
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА  
У СОРТОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.)  
ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

### ОБЗОР

40

*Санникова В. Ю.*

ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ  
КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ  
ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ  
С ИЗМЕНЁННОЙ ОКРАСКОЙ  
ЦВЕТКОВ

### ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

24

*Костина Н. Е., Спасельникова А. В.,  
Егорова А. А., Колосовская Е. В.,  
Домрачев Д. В., Романова А. В.,  
Туманян С. Р., Хамас С., Кумлен Й.,  
Дубовский И. М., Герасимова С. В.*

СОЗДАНИЕ ЛИНИИ  
ТАБАКА СО СНИЖЕННЫМИ  
АНТИФИДАНТНЫМИ  
СВОЙСТВАМИ ПО ОТНОШЕНИЮ  
К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ

### ОБЗОР

46

*Стрыгина К. В., Хлесткина Е. К.*

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ  
ПШЕНИЦЫ, ЯЧМЕНЯ И КУКУРУЗЫ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
СИСТЕМЫ CRISPR/CAS

# Contents

## FROM THE EDITORIAL BOARD 5

*Khlestkina E. K., Gavrilenko T. A.*

### INTRODUCTORY ARTICLE

## REVIEW (REVIEW OF THE PROBLEM) 7

*Tikhonovich I. A., Lutova L. A., Matveeva T. V.*

ON STUDENTS TRAINING IN  
A NEW MASTERS PROGRAM  
“MOLECULAR BIOLOGY AND PLANT  
AGROBIOTECHNOLOGY” AT SAINT  
PETERSBURG STATE UNIVERSITY  
(SPbSU)

## ORIGINAL ARTICLE 13

*Sinjushin A. A., Anisimova D. A.*

ON THE PROBLEM OF GENETIC  
POLYMORPHISM DYNAMICS IN  
RUSSIAN CULTIVARS OF GARDEN  
PEA (*Pisum sativum* L.)

## ORIGINAL ARTICLE 24

*Kostina N. E., Spaselnikova A. V., Egorova A. A.,  
Kolosovskaya E. V., Domrachev D. V.,  
Romanova A. V., Tumanyan S. R., Chamas S.,  
Kumlehn J., Dubovskiy I. M., Gerasimova S. V.*

CREATING A TOBACCO LINE WITH A  
WEAKER ANTIFEEDANT PROPERTY  
AGAINST COLORADO POTATO  
BEETLE

## REVIEW 31

*Kuzmina Y. V.*

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

## REVIEW 40

*Sannikova V. Yu.*

GENETIC ENGINEERING AS A WAY  
TO OBTAIN ORNAMENTAL PLANTS  
WITH A CHANGED FLOWER COLOR

## REVIEW 46

*Strygina K. V., Khlestkina E. K.*

WHEAT, BARLEY AND MAIZE  
GENES EDITING USING THE  
CRISPR/CAS SYSTEM

*Уважаемые читатели!*

Сегодня решающую роль в конкурентоспособном развитии отечественного агропромышленного комплекса (АПК) играет подготовка кадров по всем направлениям современной сельскохозяйственной науки, включая селекцию. С началом интенсивного внедрения методов молекулярной генетики и биотехнологии в селекционный процесс стали обновляться и дополняться учебные программы профильных аграрных вузов России. Вместе с тем потребность отрасли в специалистах нового поколения, владеющих современными методами селекции, нашла отклик и со стороны биологических факультетов классических университетов. Сегодня в этих вузах разделы курсов лекций, посвященные современной селекции, переросли в отдельные направления подготовки. В настоящем выпуске мы представляем читателю обзорную статью о подготовке магистрантов по новой программе «Молекулярная биология и агробиотехнология растений» в Санкт-Петербургском государственном университете. Организаторы программы делятся опытом по прошествии четырех лет с момента ее запуска и сообщают о востребованности этого нового направления со стороны магистрантов. На протяжении 10 лет обновленный курс «Теория селекции», в который оперативно включаются все новейшие направления и подходы, преподают студентам-биологам Новосибирского государственного университета. Отдельное внимание уделяется программам дополнительного образования. Так в МГУ действует программа «Современные методы генетики и селекции культурных растений», рассчитанная на дополнительное образование кадров для АПК, а в НГУ – курсы повышения квалификации научно-педагогических кадров по генетике с основами селекции, медицинской генетики и эволюции. Эти образовательные программы объединяет общая концепция – «знания из первых рук». Преподаватели курсов – ведущие ученые в области генетики, селекции и биотехнологии растений. Помимо образовательных программ вузов, профильными научными организациями проводятся регулярные школы, посвященные использованию методов генетики, геномики, биотехнологии и биоинформатики в современных селекционных программах – от регулярных специализированных школ по работе с генетическими ресурсами растений, проводимых в ВИР имени Н.И. Вавилова до школ по биоинформатике ИЦиГ СО РАН, в которых традиционно выделяются модули, обучающие работе с «большими данными» (big data) по направлению растениеводства. Такая

гибкая диверсифицированная подготовка кадров позволяет охватить широкую аудиторию – от бакалавров и педагогических работников и вплоть до опытных селекционеров, желающих получить новые актуальные знания из смежной области наук.

Понимая значимость этой работы в области подготовки кадров для развития конкурентоспособных направлений селекции растений в нашей стране, мы приглашаем научные и образовательные организации, имеющие многолетний опыт работы по подготовке кадров и проведению школ в области агробиотехнологии и современной селекции поделиться своими достижениями на страницах нашего журнала, представив аналитические обзоры, обобщающие содержательную часть программ, их длительность, данные о количестве и составе (в случае программ дополнительного образования) слушателей курсов, и другие сведения, которые позволят нам всем вместе воссоздать полную и актуальную картину подготовки кадров по этому направлению в нашей стране, и позволят сориентироваться нашим читателям, где искать подготовленных молодых специалистов и где можно приобрести дополнительные знания им самим.

Продолжают выпуск обзорные работы, подготовленные магистрантами программы «Молекулярная биология и агробиотехнология растений» СПбГУ, посвященные достижениям и перспективам применения генетических технологий в цветоводстве и в овощеводстве. В обзоре Санниковой В.Ю. представлены основные результаты использования методов геномной инженерии для модификации путей биосинтеза основных пигментов – флавоноидов, беталаинов, каротиноидов, отвечающих за окраску цветков растений, а также рассмотрены проблемы получения и культивирования коммерческих сортов трансгенных декоративных растений. В обзоре Кузьминой Ю.В. рассмотрены перспективы использования методов редактирования генома для продления сроков хранения растительной сельскохозяйственной продукции на примере исследований, направленных на увеличение лёжкости плодов томата.

Тему редактирования геномов сельскохозяйственных растений продолжает обзор специалистов ВИР имени Н.И. Вавилова, который посвящен достижениям применения новых генетических технологий на основе использования системы CRISPR/Cas для улучшения зерновых культур. Рассмотрены результаты редактирования генов мягкой пшеницы, ячменя и кукурузы, вовлеченных в контроль основных хозяйственно ценных признаков: пита-

тельной ценности зерна, продуктивности, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессорам, а также примеры редактирования генов, участвующих в контроле опыления растений - ядерных генов мужской стерильности и генов восстановителей фертильности, аллельный полиморфизм которых используется при развитии программ гибридной селекции различных культур.

В оригинальном исследовании сибирских авторов из Института цитологии и генетики СО РАН методы геномного редактирования использованы для создания экспериментальной генетической модели с целью последующего изучения молекулярно-генетических механизмов взаимодействия вредителей и растений семейства пасленовых на основе изменений в генетическом контроле процессов вторичного метаболизма. В этой работе были использованы растения табака *Nicotiana tabacum* L., которые не пригодны для потребления в пищу колорадским жуком, поскольку им свойственна высокая токсичность листьев. В результате направленного мутагенеза генов семейства *BBL* была получена модифицированная линия табака с кардинально измененными характеристиками кормовой привлекательности для колорадского жука.

В статьях данного номера обсуждаются преимущества новых генетических технологий и существующие на сегодняшний день проблемы в их практическом использовании в программах по улучшению сельскохозяйственных растений, а также проводится сравнение новых подходов с традиционными методами селекции.

Необходимо отметить, что целесообразность и успех любых селекционно-генетических программ связан, прежде всего, с потенциалом исходного генетического разнообразия культурных растений. Экспериментальная статья авторов из МГУ имени М.В. Ломоносова посвящена проблеме эрозии генетического разнообразия - исследо-

ванию динамики генетического полиморфизма у сортов гороха (*Pisum sativum* L.). В этой статье с использованием различных ДНК-маркеров исследован полиморфизм ряда локусов ядерной, митохондриальной и пластидной ДНК у сортов гороха отечественной и зарубежной селекции, созданных с конца XIX века по настоящее время; параллельно исследовалось и фенотипическое разнообразие этих сортов по ряду морфологических признаков. Полученные результаты указывают на то, что среди российских сортов гороха нет выраженного сокращения генетического разнообразия с течением времени.

Современная селекция приобретает все более выраженный характер междисциплинарности. Объединение усилий представителей классических университетов, селекционных вузов и научных учреждений России в вопросах подготовки кадров и в реализации научных программ уже сегодня делает это научное направление все более привлекательным для студентов и молодых специалистов, а благодаря внедрению в селекционный процесс современных технологий, перечень конкурентоспособных селекционных достижений начинает пополняться и отечественными сортами, созданными путем комбинирования методов традиционной селекции и новых генетических технологий.

Главный редактор,  
д.б.н., профессор РАН Хлесткина Е.К.

Заместитель главного редактора,  
д.б.н. Гавриленко Т.А.

# О ПОДГОТОВКЕ МАГИСТРОВ ПО НОВОЙ ПРОГРАММЕ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ» В САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОМ ГОСУДАРСТВЕННОМ УНИВЕРСИТЕТЕ (СПбГУ)

Тихонович И.А., Лутова Л.А.\*, Матвеева Т.В.

Санкт-Петербургский Государственный Университет,  
биологический факультет, кафедра генетики и биотехнологии,  
199034 Россия, г.Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9;  
✉ \*la.lutova@gmail.com

Развитие агропромышленного комплекса в современных условиях невозможно себе представить без развития агробιοтехнологий, для чего в свою очередь, требуются специалисты, обладающие глубокими знаниями биологии, химии и смежных наук. В этой связи необходима подготовка кадров, способных обеспечить активное внедрение современных технологий в сельскохозяйственные науки. Таких специалистов до недавнего времени вообще не готовили в классических университетах, к которым принадлежит СПбГУ. Для решения этой задачи в СПбГУ была разработана и реализуется магистерская программа «Молекулярная биология и агробιοтехнология растений». В создании и реализации программы задействованы преподаватели восьми кафедр биологического факультета СПбГУ. Представленная программа ориентирована на ознакомление учащихся с современными проблемами, достижениями, методологией агробιοтехнологии растений, возможностями применения знаний на практике. Особое внимание уделено формированию у слушателей представлений о возможности и необходимости вывести селекцию растений на уровень требований и возможностей «постгеномной эры» для создания высокопродуктивного и устойчивого сельскохозяйственного производства с минимальными экологическими рисками. В программе органично сочетаются теоретические курсы с практическими занятиями и выполнением исследовательских работ на базе СПбГУ и научно-исследовательских институтов Санкт-Петербурга. Большое внимание уделяется выработке у студентов навыков ведения научных дискуссий, умению представлять свои научные данные в разных форматах, в том числе на английском языке, что является очень важным в плане отслеживания современных научных тенденций и интеграции собственных исследований в мировую науку. Программа пользуется популярностью у студентов, а многие ее выпускники были трудоустроены в ведущие НИИ биологического и сельскохозяйственного профиля.

**Ключевые слова:** молекулярная биология растений, агробιοтехнология, подготовка магистров, СПбГУ.

## Прозрачность финансовой деятельности/ Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах/ The authors have no financial interest in the presented materials or methods

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-o4>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы/ 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/ No conflict of interest

## ON STUDENTS TRAINING IN A NEW MASTERS PROGRAM "MOLECULAR BIOLOGY AND PLANT AGROBIOTECHNOLOGY" AT St. PETERSBURG STATE UNIVERSITY (SPbSU)

Tikhonovich I.A., Lutova L.A.\*, Matveeva T.V.

Department of Genetics and Biotechnology, St. Petersburg State University,  
7/9, University Emb., St. Petersburg 199034, Russia;  
✉ \*la.lutova@gmail.com

The development of an agro-industrial complex under present-day conditions is impossible to imagine without the development of agro-biotechnology, which in turn requires specialists with profound knowledge of biology, chemistry and related sciences. In this regard, training of personnel is needed to ensure active implementation of modern technologies in agricultural sciences. Until recently, such specialists have not been trained at classical universities, to which St. Petersburg State University belongs. To deal with this challenge, a Masters Program «Molecular Biology and Agrobiotechnology of Plants» has been developed and is being implemented in SPbSU. Teaching staff from eight departments of the Biological Faculty of SPbSU is involved in the creation and implementation of the Program. The Program in question is focused on familiarizing students with the modern problems, achievements, methodology of agro-biotechnology of plants, as well as on practical application of the obtained knowledge. Special attention is paid to the formation of trainees' perceptions of the possibility and necessity of bringing plant breeding to the level of requirements and possibilities of the «post-genome era» to achieve high productivity and sustainability of agricultural production with minimal environmental risks. The Program seamlessly integrates practical exercises and students' research work in the SPbSU facilities, as well as that performed at St. Petersburg research institutes. Much attention is paid to the development of students' skills in conducting scientific discussions and in presenting their scientific data in different formats, for instance in English, which is very important for monitoring current scientific trends and integrating own research into world science. The Program is popular with students and many of its graduates have been employed by the leading biological and agricultural research institutes.

**Key words:** plant molecular biology, agrobiotechnology, masters training, St. Petersburg State University.

**Для цитирования:** Тихонович И.А., Лутова Л.А., Матвеева Т.В. О подготовке магистров по новой программе «Молекулярная биология и агробιοтехнология растений» в Санкт-Петербургском государственном университете (СПбГУ). *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):7-12. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o4

**For citation:** Tikhonovich I.A., Lutova L.A., Matveeva T.V. On Students Training in a New Masters Program "Molecular Biology and Plant Agrobiotechnology" at Saint-Petersburg State University (SPbSU). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):7-12. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o4

## ORCID:

Tikhonovich I.A. <https://orcid.org/0000-0001-8968-854X>

Lutova L.A. <https://orcid.org/0000-0001-6125-0757>

Matveeva T.V. <https://orcid.org/0000-0001-8569-6665>

УДК 371.314.

Поступила в редакцию: 21.05.2020

Принята к публикации: 02.06.2020

Подготовка специалистов в области современных биологических знаний является актуальной для развития исследований в области агропромышленного комплекса (АПК), который в настоящий момент интенсивно развивается в нашей стране и это является гарантом не только продовольственной безопасности, но и приумножения экспортного потенциала страны. В этой связи требуется обеспечить опережающее развитие научных исследований, а главное подготовку кадров, способных обеспечить активное внедрение современных технологий, основанных на комплексном использовании так называемых «омик» (геномика, протеомика, метаболомика и др.). Данный период характеризуется тем, что исследователи могут иметь всю информацию об особенностях структуры и функции генетического материала организмов: набор генов и их аллелей, транскриптома, протеома, метаболома и т. д. Выполнять работу на таком уровне способны специалисты, владеющие методологией генетического анализа с использованием современных молекулярных подходов. Именно совместные усилия специалистов - генетиков и молекулярных биологов необходимы для достижения целей, которые стоят перед сельским хозяйством – создание технологий селекции следующего поколения (next generation breeding, NGB). В связи с этим Правительство страны предпринимает энергичные усилия для развития генетических технологий на основе создаваемых новых подразделений генетического профиля. Однако, кадровая проблема остается не решенной и встает в «полный рост». К требованиям знания новых технологий и владения комплексом молекулярно-генетических методов добавляется и необходимость понимания и знания современных проблем земледелия в широком смысле, включающем почвоведение, агрохимию, экологию, физиологию и биохимию растений.

Таких специалистов до недавнего времени вообще не готовили в классических университетах, к которым принадлежит СПбГУ. Университет продолжает развивать известные в нашей страны школы в области генетики, микробиологии, физиологии и биохимии растений. Именно в СПбГУ 100 лет назад была организована первая кафедра генетики. Поэтому с полной ответственностью университетское образование предполагает получение студентами знаний по широкому кругу дисциплин, что обеспечивает возможность создания программ обучения нового типа – сочетающих современные молекулярно-биологические компетенции со знанием проблем биологии в целом. Последнее особенно важно, поскольку растения и животные, используемые в сельскохозяйственном производстве, редко становятся объектами молекулярно-биологических исследований. Все эти, а также многие другие проблемы должны быть учтены при организации подготовки специалистов, владеющих соответствующими знаниями и полным комплексом современных методов. Таких специалистов, по нашим подсчетам, только для Санкт-Петербургских НИИ требуется в год не менее 30 человек.

В связи с вышеизложенным, на биологическом факультете СПбГУ создана новая межкафедральная магистерская программа, которая может стать основой для подготовки специалистов, готовых работать в сфере научного обеспечения АПК на уровне современных требований. Ранее, в связи с юбилеем Новгородского Университета, проходила конференция, на которой было доложено о создании и функционировании магистерской программы. Результаты конференции опубликованы в сборнике, куда частично вошли сведения изложенные в данной статье (Тихонович, 2019).

Содержание программы и курсы, входящие в нее, можно условно разделить на несколько разделов.

### **1. Взаимодействия растений в сообществах, молекулярные механизмы формирования микробно-растительных генетических систем**

В этом разделе магистранты получают представление о генетических ресурсах планеты и механизмах их использования растениями. Блок включает современный курс «**Метагеномика**», который дает возможности для решения фундаментальных и прикладных проблем. Задачи курса: знакомство с методами анализа некультивированных, в основном почвенных микроорганизмов, сравнительное изучение генов и геномов, получение представлений о соотношениях генетической информации про- и эукариот.

Уникальный курс данного блока «**Симбиогенетика – формирование надорганизменных растительных систем**» знакомит обучающихся с молекулярно-генетическими механизмами, обеспечивающими длительное совместное существование неродственных организмов (Тихонович, Проворов, 2009; Проворов, Воробьев, 2012). В ходе симбиоза происходит расширение адаптаций эукариот за счет объединения генов партнеров в симбиогеном. В результате создается надорганизменная система, которая обладает такими свойствами или адаптациями, которыми не обладали партнеры по симбиозу до их объединения. Манипулирование генами микробов, полноценных участников цепей взаимодействия растения и микросимбионта, позволяет вовлечь в генетическое конструирование не отдельные гены, а их блоки. Слушатели получают представление также о «принципе дополнительности» взаимодействия про- и эукариот на основе их геномов в курсе «**Генетика органелл**», в котором магистранты изучают структурную и функциональную организацию генетических аппаратов органелл растений, митохондрий и хлоропластов, имеющих эндосимбиотическое происхождение в эукариотической клетке. К этому разделу относятся курсы «**Фитопатология**», «**Молекулярно-генетические механизмы устойчивости растений к биотическим факторам**», целью которых является знакомство студентов с современными молекулярно-генетическими представлениями о болезнях растений и путях защиты растений от болезней в агробиоценозах, с основ-

ными тенденциями развития фитопатологии как самостоятельной научной дисциплины (Багирова и др., 2012). В программе предусмотрен курс «**Фитогеография и растительность России**», в котором раскрывается современное состояние науки о растительных сообществах, особое внимание уделяется аспектам функциональной организации фитоценозов. Рассматриваются связи растений с прокариотами, грибами и животными, типы взаимоотношений между растениями, механизмы формирования состава и структуры растительных сообществ, вопросы популяционной биологии растений, продуктивности растительного покрова.

В целом этот раздел призван сформировать представление о генетических ресурсах планеты и возможности их вовлечения в полезное использование.

## **2. Растения в окружающей среде: агроценоз и фитоценоз**

В данный раздел включены курсы, характеризующие основы существования растений во взаимодействии с окружающей средой – «**Основы агрохимии и минерального питания растений**», «**Мембранный транспорт и ионный гомеостаз**», которые формируют у магистрантов комплексное представление об основах агрохимии и минерального питания растений, о доступности элементов и их роли в жизни растения (Битюцкий, 2014).

В курсе «**Почвоведение**» рассматриваются: перманентная мировая агротехническая революция (зеленая, трансгенная, информационная), альтернативные системы земледелия (биодинамическая, органическая и др.) как общественные формы протеста против интенсификации, последствия экстенсивного и интенсивного (техногенного) земледелия, смена парадигмы природопользования (sustainable development), экологический императив, законы природопользования и экологизация земледелия.

## **3. Растение как отдельное царство**

Данный раздел направлен на формирование у слушателей комплексных знаний о своеобразии растений среди живого на Земле. Курс «**Биология клетки**» создан на основе современных представлений об организации клетки и ее функционировании, о сходстве и различиях в организации эукариот и прокариот, животных и растительных клеток.

Курс «**Фитогормоны**» дает знания о метаболизме, физиологической роли и механизме действия основных гормональных веществ растений, включая химическую структуру, реакции синтеза и инактивации, транспорт фитогормонов растений, механизм рецепции и трансдукции гормональных сигналов, действие фитогормонов на геном и мембранный транспорт (Медведев, 2013; Медведев и др., 2013; Медведев, Шарова, 2011, 2014; Шишова и др., 2008).

В курсе «**Генетика развития растений**» студенты узнают о том, как осуществляется регуляция развития растений на различных уровнях, изучают основные методы, используемые при исследовании растений, и их применение для изучения различных программ развития (Лутова и др., 2010).

Курс «**Лекарственные растения**» формирует представление об основных группах физиологически активных соединений, синтезируемых лекарственными растениями, способах агрокультуры, биотехнологии и использования лекарственных растений, в первую очередь, как продуцентов веществ вторичного метаболизма в медицине.

Особенно важным в настоящее время является курс «**Семеноводство**», позволяющий сформировать у студентов целостное представление о биологии покоя и прорастания семян высших растений, а также об основах промышленного семеноводства сельскохозяйственных культур, которое необходимо вновь организовывать и налаживать в России.

Курс «**Основы протеомики**» с практикумом необходим для формирования представления об основных аналитических принципах и методических приемах протеомных исследований (Падкина и др., 2012). Курс сопровождается большим практикумом, который проводится на базе Ресурсного Центра СПбГУ.

Курс «**Эпигенетические процессы у растений**» с практикумом освещает особенности эпигенетических модификаций у растений, а практические занятия дают навыки работы с культурами растительных клеток. В курсе рассматриваются процессы метилирования ДНК, модификации гистонов и изменения структуры хроматина. Специальный раздел включает рассмотрение процессов, определяющих продуктивность растений.

## **4. Растение и человек – взаимное приспособление и генетическая инженерия**

Это основной и самый крупный раздел, который включает целый ряд основополагающих курсов в области современного АПК.

Курс «**Генетические основы domestikации растений**» направлен на знакомство студентов с основными концепциями происхождения культурных растений, генетическим контролем ключевых признаков у важнейших видов. Курс «**Метабономика растений**» завершает рассмотрение «омик» с точки зрения развития технологий в области высокоэффективных методов разделения и идентификации химических соединений. Данный учебный курс сформирует у студентов базовое представление о метаболомике растений, познакомит с комплексом основных подходов, используемых для изучения растительных метаболитов.

В данном разделе особое место занимает курс «**Транскриптомика и мир РНК**», в котором обобщаются современные представления о генетических процес-

сах и роли РНК в регуляции развития растений (Миронова и др., 2017).

Из предыдущих курсов вытекает необходимость направленного изменения генотипа растений как способа преодоления ограниченности генетического потенциала, оценки всего разнообразия аллелей и конструирования новых. Курс **«Генетическая инженерия в биотехнологии сельскохозяйственных растений»** включает лекции, семинары и большой практикум по генной инженерии, методы работы с компьютерными базами данных (Лутова, 2002; Лутова, Матвеева, 2016; Матвеева и др., 2012). Магистранты знакомятся с проблемами современной биотехнологии: редактирование генома растений, способы изучения взаимодействий макромолекул, стволовые клетки растений, соматический эмбриогенез, транскриптомный анализ у растений, методы селекции растений с использованием генной и клеточной инженерии, генная инженерия растений и фармацевтика, безопасность ГМО, и др. На семинарах студенты делают обзорные доклады по различным проблемам генной инженерии, опираясь на самые современные литературные данные. Недавно создан новый курс этого блока **«Новые технологии редактирования генома»**, в котором представлены все современные подходы для направленного редактирования генома растений.

Логичным продолжением является курс **«Основы селекции нового поколения»**, в котором излагаются обобщенные материалы исследований генетического контроля ключевых признаков, комплексный подход, сочетающий традиционные методы селекции с современными молекулярными и биоинформатическими подходами.

С 2020 года в рамках программы будет читаться новый курс «Генетика растений», в котором особое место будет уделено обсуждению роли генетических коллекций.

Представленный материал, естественно, не отражает всего содержания новой программы и всех читаемых курсов, тем более, что курсы постоянно совершенствуются и дополняются, в том числе и за счет материала, получаемого преподавателями, действующими активными учеными, по мере получения новых знаний. Также и сама двухуровневая система образования, ныне внедренная повсеместно, требует совершенствования. В частности, непредсказуемый состав слушателей и уровень их подготовки заставляют адаптировать содержание программы под слушателей. Наш четырехлетний опыт показал, что программа востребована магистрами, которые за время учебы адаптируются к будущему месту работы в НИИ биологического профиля, выполняют там квалификационную работу под руководством куратора из числа сотрудников учреждения-работодателя, а также руководителя, назначаемого из сотрудников Университета. Это дает возможность органично соединить требования преподавания и выполнения научно-исследовательских работ.

## Практикумы, как важная составляющая программы

Отличительной особенностью программы является большое количество лабораторных практикумов, в ходе которых студенты получают практические навыки работы с растениями в культуре *in vitro*, учатся выделять ДНК из самых разных биоматериалов, проводить на ней разнообразные ферментативные реакции, в том числе и создавая рекомбинантные ДНК как элемент генной инженерии. Студенты знакомятся с биохимическими методами, включая методы протеомики и метаболомики, а также с биоинформатическими методами, позволяющими анализировать большие массивы биологических данных. Практикум в рамках курса **«Генетическая инженерия в биотехнологии сельскохозяйственных растений»** отличается тем, что дает возможность последовательного освоения методов в рамках единого продолжительного генно-инженерного эксперимента (Лутова, 2002; Лутова, Матвеева, 2016; Матвеева и др., 2012). Этот подход позволяет не только познакомить студентов с методами, но и наглядно проиллюстрировать возможности каждого метода в рамках целого исследования.

## Биологические дисциплины на английском языке

Работая на современном уровне, необходимо постоянно повышать свою квалификацию, совершенствовать свои навыки и следить за мировыми тенденциями в научной литературе. Это невозможно без владения английским языком. Поэтому в рамках магистерской программы существуют две учебные дисциплины, преподаваемые на английском языке. В рамках курса **«Геномика растений и базы данных»** студенты, слушая лекции на английском языке, знакомятся с новыми возможностями, которые дает геномика для решения фундаментальных и прикладных задач изучения растительных объектов. Вторая часть курса подразумевает выполнение практической задачи с использованием баз данных нуклеотидных и белковых последовательностей и программного обеспечения для анализа геномов.

Курс **«Современные проблемы агробиотехнологии растений»** организован в виде спецсеминара. В начале курса студенты учатся представлять на английском языке данные своих научных исследований. Во второй части курса под руководством кураторов (преподавателей кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ) студенты готовят обзорные доклады на различные темы из областей биотехнологии, генетики развития растений, симбиогенетики, фитопатологии и др. Слушая доклады однокурсников, студенты учатся обсуждать научные вопросы на английском языке, вести дискуссию.

## После окончания магистратуры студенты получают следующие компетенции:

- свободное владение современными методами проведения разнообразных полевых и лабораторных исследований в области молекулярной биологии и агробиотехнологии растений, навыки культивирования клеток растений и микроорганизмов, умение грамотно использовать современную приборную базу.
- умение профессионально использовать современные компьютерные технологии для сбора, хранения, обработки, анализа и передачи научной информации, в том числе для работы с базами данных.
- владение английским языком на уровне, позволяющем свободно ориентироваться в научной информации по молекулярной биологии и агробиотехнологии растений и способность решать

коммуникативные задачи при работе в иноязычной среде.

- способность анализировать полученные результаты научно-исследовательских работ, нести ответственность за качество выполняемых работ и достоверность научных результатов.
- профессионализм в представлении результатов научно-исследовательских работ в виде докладов, научных публикаций, отчетов.

Программа «Молекулярная биология и агробиотехнология растений» пользуется популярностью у студентов. Фактически все читаемые в рамках программы курсы – авторские, разработанные преподавателями СПбГУ, для них лекторами написаны учебники, которые используют и другие вузы страны.

Магистры, прошедшие обучение по данной программе легко находят работу в ведущих НИИ биологического и сельскохозяйственного профиля.

## References / Литература

- Bagirova S.F., Javakhia V.G., Dyakov Yu.T., Ozeretskovskaya O.L., Provorov N.A., Tikhonovich I.A., Shcherbakova L.A. Fundamental phytopathology (Fundamentalnaya fitopatologiya). Yu.T. Dyakov (ed.). Moscow: URSS : Krasand; 2012. [In Russian] (Багирова С.Ф., Джавахия В.Г., Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Проворов Н.А., Тихонович И.А., Щербакова Л.А. *Фундаментальная фитопатология* / под редакцией Ю.Т. Дьякова. Москва: URSS : Красанд; 2012).
- Bityutsky N.P. Mineral nutrition of plants: Textbook (Mineralnoye pitaniye rasteniy: uchebnik). St. Petersburg: Publishing House of St. Petersburg State University; 2014. [In Russian] (Битюцкий Н.П. Минеральное питание растений: учебник. Санкт-Петербург: Издательский дом Санкт-Петербургского государственного университета; 2014).
- Lutova L.A. Biotechnology of higher plants: Textbook (Biotehnologiya vysshih rastenij: uchebnik). St. Petersburg: St. Petersburg University Press; 2003. [In Russian] (Лутова Л.А. Биотехнология высших растений: учебник. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского университета; 2003).
- Lutova L.A., Ezhova T.A., Dodueva I.E., Osipova M.A. Plant developmental genetics: Tutorial for students of higher educational institutions (Genetika razvitiya rastenij: uchebnoye posobie dlya studentov vysshih uchebnyh zavedenij). S.G. Inge-Vechtomov (ed.). St. Petersburg: N-L Publishing House; 2010. [In Russian] (Лутова Л.А., Ежова Т.А., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений: учебное пособие для студентов высших учебных заведений / под редакцией С.Г. Инге-Вечтомова. Санкт-Петербург: Н-Л; 2010).
- Lutova L.A., Matveeva T.V. Genetic and cellular engineering in biotechnology of higher plants: Textbook (Gennaya i kletchnaya inzheneriya v biotehnologii vysshih rastenij: uchebnik). I.A. Tikhonovich (ed.). St. Petersburg: Eco-Vector; 2016. [In Russian] (Лутова Л.А., Матвеева Т.В. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений: учебник / под редакцией И.А. Тихоновича. Санкт-Петербург: Эко-Вектор; 2016).
- Matveeva T.V., Bogomaz D.I., Lutova L.A. Small workshop on genetic engineering: Tutorial (Maly praktikum po gennoy inzhenerii: uchebnoye posobie). St. Petersburg: Renome; 2011 [In Russian] (Матвеева Т.В., Богомаз Д.И., Лутова Л.А. Малый практикум по генной инженерии: учебное пособие. Санкт-Петербург: Реноме; 2011).
- Medvedev S.S., Sharova E.I. Plant Developmental Biology. Vol. 1. Basics of plant development biology. Phytohormones (Biologiya razvitiya rastenii. Tom 1: Nachala biologii razvitiya rastenii. Fitogormony). St. Petersburg: Publishing House of St. Petersburg State University; 2011 [In Russian] (Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Том 1. Начало биологии развития растений. Фитогормоны. Санкт-Петербург: Издательский дом Санкт-Петербургского государственного университета; 2011).
- Medvedev S.S., Sharova E.I. Plant Developmental Biology. Vol. 2. Growth and morphogenesis (Biologiya razvitiya rastenii. Tom 2: Rost i morfogenez). Nizhnevartovsk: Publishing House of Nizhnevartovsk State University; 2014 [In Russian] (Медведев С.С., Шарова Е.И. Биология развития растений. Том 2. Рост и морфогенез. Нижневартовск: Изд-во Нижневартовского государственного университета; 2014).
- Medvedev S.S., Shishova M.F., Emelyanov V.V., Bilova T.E., Tarakhovskaya E.R. Workshop on plant physiology and biochemistry: Tutorial (Praktikum po fiziologii i biokhimii rastenij: uchebnoye posobie). St. Petersburg: Publishing House of St. Petersburg State University; 2013. [In Russian] (Медведев С.С., Шишова М.Ф., Емельянов В.В., Билова Т.Е., Тараховская Е.Р. Практикум по физиологии и биохимии растений: учебное пособие. Санкт-Петербург: Издательский дом Санкт-Петербургского государственного университета; 2013).
- Medvedev S.S. Plant physiology: [Textbook] (Fiziologiya rastenij: [uchebnik]). St. Petersburg: BHV-Petersburg; 2013. [In Russian] (Медведев С.С. Физиология растений: [учебник]. Санкт-Петербург: БХВ-Петербург; 2013).
- Mironova L.N., Padkina M.V., Sambuk E.V. RNA: Synthesis and functions: Tutorial (Sintez i funktsii: uchebnoye posobie). St. Petersburg: Eco-Vector Publishing; 2017. [In Russian] (Миронова Л.Н., Падкина М.В., Самбук Е.В. РНК: синтез и функции: учебное пособие. Санкт-Петербург: Эко-Вектор; 2017).
- Padkina M.V., Zalutskaya Zh.M., Lapina T.V., Sambuk E.V., Ermilova E.V. Proteomics of microorganisms and plants. Principles, technologies and practical use (Proteomika mikroorganizmov i rastenij. Printsipy, tekhnologii i prakticheskoye ispolzovaniye). E.V. Ermilova (ed.). St. Petersburg: TESSA; 2012. [In Russian] (Падкина М.В., Залуцкая Ж.М., Лапина Т.В., Самбук Е.В., Ермилова Е.В. *Протеомика микроорганизмов и растений. Принципы, технологии и практическое использование* / под редакцией Е.В. Ермиловой. Санкт-Петербург: ТЕССА; 2012).
- Provorov N.A., Vorobev N.I. Genetic basis of the evolution of plant-microbial symbiosis (Geneticheskie osnovy evolyucii rastitel'no-mikrobnogo simbioza) I.A. Tikhonovich (ed.). St. Petersburg: Inform-Navigator; 2012. [In Russian] (Проворов Н.А.,

Воробьев Н.И. Генетические основы эволюции растительно-микробного симбиоза / под. редакцией И.А. Тихоновича. Санкт-Петербург: Информ-Навигатор; 2012).

Tikhonovich I.A., Provovrov N.A. Symbioses of plants and microorganisms: molecular genetics of the future agricultural systems (Simbiozy rastenij i mikroorganizmov: molekulyarnaya genetika agrosistem budushchego). St. Petersburg: St. Petersburg University Press; 2009. [In Russian] (Тихонович И.А., Проворов Н.А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского университета; 2009).

Tikhonovich I.A. Masters Training Program "Molecular Biology and Agrobiotechnology of Plants" at Saint Petersburg State University (Programma podgotovki magistrov «Molekulyarnaya biologiya i agrobiotekhnologiya rasteniy» v Sankt-Peterburgskom gosudarstvennom universitete). In: *Materials of All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation*

*"Modern Trends in the Scientific and Personnel Support of the Agro-Industrial Complex"; 2019 November 28-29; Veliky Novgorod, Russia; Veliky Novgorod; 2019. [In Russian] (Тихонович И.А. Программа подготовки магистров «Молекулярная биология и агrobiотехнология растений» в Санкт-Петербургском государственном университете. В кн.: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные тенденции в научном и кадровом обеспечении АПК»; 28-29 ноября 2019 г.; Великий Новгород, Россия; Великий Новгород; 2019).*

Shishova M.F., Tankelyun O.V., Emelyanov V.V., Polevoy V.V. Reception and transduction of signals in plants (Receptiya i transdukcija signalov u rastenij). St. Petersburg: St. Petersburg University Press; 2008. [In Russian] (Шишова М.Ф., Танкелюн О.В., Емельянов В.В., Полевой В.В. Рецепция и трансдукция сигналов у растений. Санкт-Петербург: Изд-во Санкт-Петербургского университета; 2008).

## АВТОРЫ СТАТЬИ «МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И АГРОБИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ» В СПБГУ



**ИГОРЬ АНАТОЛЬЕВИЧ  
ТИХОНОВИЧ**

**Ученая степень:**

Доктор биологических наук

**Ученое звание:**

Профессор,  
Академик РАН

**Должность:**

Профессор, декан  
биологического факультета



**ЛЮДМИЛА АЛЕКСЕЕВНА  
ЛУТОВА**

**Ученая степень:**

Доктор биологических наук

**Ученое звание:**

Профессор,  
почетный работник  
высшего образования России

**Должность:**

Профессор, заведующая лабораторией генной и клеточной инженерии растений



**ТАТЬЯНА ВАЛЕРЬЕВНА  
МАТВЕЕВА**

**Ученая степень:**

Доктор биологических наук

**Должность:**

Доцент

## К ПРОБЛЕМЕ ДИНАМИКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА У СОРТОВ ГОРОХА (*Pisum sativum* L.) ОТЕЧЕСТВЕННОЙ СЕЛЕКЦИИ

Синюшин А.А.<sup>1\*</sup>, Анисимова Д.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра генетики, 119234 Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; [\\*asinjushin@mail.ru](mailto:*asinjushin@mail.ru)

<sup>2</sup> ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123 Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3а.

**Актуальность.** В ходе селекции различных сельскохозяйственных культур существует риск утраты (эрозии) генетического разнообразия, связанный в первую очередь с использованием ограниченной части генофонда для выведения новых сортов. Отечественные сорта гороха посевного (*Pisum sativum* L.) имеют высокий уровень фенотипического разнообразия, однако динамика полиморфизма на уровне ДНК не изучена. Подобное исследование актуально с точки зрения перспектив дальнейшей селекции культуры и планирования мер по сохранению разнообразия в коллекциях генетических ресурсов. **Материалы и методы.** В анализ включены: 18 отечественных сортов гороха, созданных до 1991 г.; 22 сорта, созданных в более поздние годы; 40 зарубежных сортов; 7 образцов, представляющих маркерные линии и неокультурные формы гороха. Этот материал был описан по ряду морфологических признаков, а также генотипирован с использованием различных ДНК-маркеров (14 CAPS на основе генов ядерной ДНК, 8 ядерных микросателлитных маркеров, а также два неядерных маркера). Уровень разнообразия оценивали как среднее значение коэффициента Жаккара от попарного сравнения сортов внутри группы. Дополнительно провели сравнение опубликованных характеристик сортов, включенных в Госреестр в 1994–2019 гг. **Результаты.** На фенотипическом уровне отмечено повышение уровня разнообразия у зерновых сортов и снижение – у овощных. При оценке полиморфизма ДНК выявлена сходная, но гораздо менее выраженная тенденция. Отмечен низкий уровень внутрисортного рестрикционного полиморфизма CAPS-маркеров и разнообразия аллелей SSR-маркеров. Уровень разнообразия среди зарубежных сортов в основном не превышал значений, установленных для отечественных сортов. Исключение составил уровень фенотипического полиморфизма овощных сортов, который у зарубежных сортов оказался выше, чем у отечественных. Характеристики продуктивности у включенных в Госреестр сортов раннего (1995–2000) и позднего (2016–2019) периодов селекции не различаются значимо. **Выводы.** Среди российских сортов гороха нет выраженного сокращения генетического разнообразия. Достоверной динамики увеличения значений основных хозяйственно-ценных признаков не выявлено.

**Ключевые слова:** коллекция генетических ресурсов, молекулярные маркеры, разнообразие, эрозия.

**Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency**  
Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах./The authors have no financial interest in the presented materials or methods.  
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-o3>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы./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/No conflict of interest

## ON THE PROBLEM OF GENETIC POLYMORPHISM DYNAMICS IN RUSSIAN CULTIVARS OF GARDEN PEA (*Pisum sativum* L.)

Sinjushin A.A.<sup>1\*</sup>, Anisimova D.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Genetics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow 119234, Russia; [\\*asinjushin@mail.ru](mailto:*asinjushin@mail.ru)

<sup>2</sup> Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service on Customers Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 3a, Novogirievskaya St., Moscow 111123, Russia.

**Background.** Breeding new crops is associated with a risk of decrease (erosion) in genetic polymorphism. It is associated mainly with the fact that only a limited range of pre-existing cultivars and forms are used for breeding new cultivars. The Russian cultivars of garden pea (*Pisum sativum* L.) are characterized by a high level of phenotypic variability, while dynamics of polymorphism at DNA level is poorly investigated. Such an investigation is relevant from the point of view of the prospects for further breeding of the crop, and for planning strategies of polymorphism conservation in germplasm collections. **Materials and methods.** The material used in the study included 18 Russian cultivars bred before 1991, 22 Russian cultivars created later, 40 foreign cultivars, as well as 7 marker lines and wild-growing accessions. These lines were phenotyped and genotyped using DNA markers (14 CAPS, 8 SSR, one mitochondrial and one chloroplast). Variability level was measured as an average Jaccard coefficient resulting from pairwise comparison within each group. Additionally, we analyzed the published characteristics of cultivars included in the State Register in 1994–2019. **Results.** At the phenotypic level, the variability of grain cultivars increased, while a decrease was recorded for vegetable cultivars. A comparison with foreign cultivars has shown that their polymorphism was similar to those of Russian cultivars, except for the vegetable cultivars which are phenotypically less polymorphic than foreign ones. The DNA polymorphism demonstrated a similar tendency, although to a lesser extent. A low level of within-cultivar polymorphism was found. Productivity characteristics of cultivars included into the State Register in the early period (1995–2000) and those included later (2016–2019) do not differ significantly. **Conclusions.** There is no clear indication of genetic erosion in Russian cultivars of pea. We also found no reliable increase in the basic agriculturally important characters within the two decades.

**Key words:** germplasm collection, molecular markers, variability, erosion.

**Для цитирования:** Синюшин А.А., Анисимова Д.А. К проблеме динамики генетического полиморфизма у сортов гороха (*Pisum sativum* L.) отечественной селекции. Биотехнология и селекция растений. 2020;3(1):13–23. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o3

**For citation:** Sinjushin A.A., Anisimova D.A. On the problem of genetic polymorphism dynamics in Russian cultivars of garden pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):13–23. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o3

ORCID:  
Sinjushin A.A. <https://orcid.org/0000-0003-4008-9460>

УДК 575.174:575.22:631.527.1  
Поступила в редакцию: 15.03.2020  
Принята к публикации: 24.04.2020

## Введение

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – важная сельскохозяйственная культура, одна из древнейших и до настоящего времени наиболее значимая в умеренных широтах. Целенаправленная селекция гороха ведется не менее двух веков по всему миру. Помимо хозяйственной ценности, горох представляет собой интересную модель с точки зрения эволюционного процесса, когда искусственный отбор привел к формированию огромного числа различных внутривидовых форм.

Одним из возможных последствий селекции является сокращение (эрозия) генетического разнообразия, уже продемонстрированное для ряда культур (Altukhov, 2004). В качестве факторов, определяющих уровень полиморфизма в генофондах сельскохозяйственных растений, можно назвать следующие:

1. Сокращение уровня генетического разнообразия исходного материала при создании новых сортов. Большинство новых сортов создается на основе уже существующих. Мутации генов хозяйственно ценных признаков возникают *de novo* в генотипе ранее созданных сортов (Altukhov, 2004).
2. Повышение уровня разнообразия за счет скрещивания генетически несходных форм.
3. Генетический дрейф, связанный с репродукцией в коллекции небольшого числа индивидов (Leino et al., 2013; Sinjushin, 2015).
4. Возникновение спонтанных мутаций при хранении и размножении семян (Cieslarová et al., 2011a).

Исследования динамики генетического разнообразия гороха были выполнены в нескольких странах. В Чехии за 20-40 лет репродукции у одних образцов внутрисортное аллельное разнообразие микросателлитных маркеров уменьшилось вплоть до фиксации единственного аллеля, у других, напротив, увеличилось (Cieslarová et al., 2011b). На протяжении длительного времени селекции существенной генетической эрозии не было выявлено (Cieslarová et al., 2012). На примере 40 шведских сортов полевого гороха (*P. sativum* subsp. *sativum* var. *arvense* Poir.) показано, что более чем за 100 лет возделывания различия по микросателлитным маркерам у современных сортов стали более существенными, чем в XIX в., но разнообразие аллелей уменьшилось (Leino et al., 2013). На снижение уровня полиморфизма в ходе селекции указывают и Baranger et al. (2004), изучившие генотипы 148 сортов гороха по ДНК-маркерам и изоферментным локусам.

В России процесс создания новых сортов гороха идет очень активно; в Государственный реестр селекционных достижений на 2019 г. внесено более 170 сортов, преимущественно созданных после 1990 г. (State Register, 2019). В их родословных зачастую встречаются одни и те же

исходные формы, что, безусловно, сопряжено с риском снижения генетического полиморфизма. В то же время фенотипически новые сорта довольно разнообразны. В частности, при их выведении активно используются новые листовые морфотипы (Zelenov et al., 2018).

Целью настоящей работы стал анализ динамики генетического разнообразия у сортов гороха, созданных в России.

## Материалы и методы

Материалом исследования послужили 80 сортов гороха отечественной и зарубежной селекции, а также 3 маркерные линии и 4 образца, представляющие неокультурные формы гороха (таблица 1). Образцы были в разное время получены из коллекции кафедры генетики МГУ, ФИЦ ВИГРР (ВИР), ФГБНУ ФНЦО, ФГБНУ ФНЦЗБК, ГНУ ВНИИСХМ, ФГБНУ ФИЦ «Немчиновка», Института ботаники НАН Республики Армения, РУП НПЦ НАН Беларуси по земледелию, Institut za Ratarstvo i Povrtarstvo (Сербия), Institute of Forage Crops (Болгария), John Innes Centre (Великобритания).

Для датировки сорта использовали год создания или внесения в Государственный реестр селекционных достижений. «Старыми» условно называли сорта отечественной селекции, созданные до 1991 г., «новыми» – после 1991 г. Сорта зарубежной селекции, включенные в сравнение, представляли достаточно протяженный период времени (с конца XIX в. по настоящее время).

Фенотипические описания выполняли в однорядном посеве на опытном участке (Звенигородская биостанция МГУ, Московская область) в соответствии с дескриптором (The International COMECON..., 1981), адаптированным для данной работы (приложение 1/Supplement 1)<sup>1</sup>. Основное внимание было уделено морфологическим признакам, физиологические характеристики и устойчивость к патогенам не учитывали. Также были добавлены некоторые характеристики, не вошедшие в упомянутый дескриптор. Массу семян определяли с помощью электронных весов ER-60A (A&D Company Ltd.).

Для выделения ДНК материал собирали в полевых условиях или проращивали семена в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге. ДНК выделяли модифицированным СТАВ-методом (Torres et al., 1993) с незначительными модификациями. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Концентрацию ДНК в растворе доводили до 20 нг/мкл. Препараты ДНК хранили при –20°C.

Для выявления полиморфизма использовали CAPS- и SSR-маркеры на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Были выбраны локусы III и V групп сцепления, наиболее богатых удобными для генотипирования маркерами. Хотя выбранные ядерные CAPS-маркеры связаны с последовательностями генов, кодирующих бел-

<sup>1</sup> Supplementary materials 1 and 2 are available in the online version of the paper: <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-1-03>

ки (Kononov et al., 2005), эти гены не ассоциированы с известными хозяйственно ценными признаками и, следовательно, нейтральны с точки зрения искусственного отбора.

**Таблица 1. Растительный материал, использованный в работе**  
**Table 1. Plant material used in the study**

| Направление использования<br>End-use                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Овощные<br>Vegetable                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Зерновые<br>Grain                                                                                                                                                                                                                                                                                               | Прочие<br>Others                                                                                                                              |
| Старые (до 1991 г.)<br>Before 1991                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |
| Адагумский, Акация, Альфа, Борец, Виола, Жегалова 112, Изумруд, Первенец (ФГБНУ ФНЦО), Позднеспелый мозговой улучшенный, Ранний грибовский 11, Совершенство 65-3                                                                                                                                                                                   | Аист, Немчиновский 766, Рамонский 77, Татьяна, Фитотрон 1, Флагман                                                                                                                                                                                                                                              | Малиновка                                                                                                                                     |
| Новые (с 1991 г.)<br>After 1991                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |
| Амброзия, Великан, Викинг, Исток, Каира, Крейсер, Первенец (Ленинградская обл.), Сенатор, Совинтер 1, Фрагмент, Чика                                                                                                                                                                                                                               | Батрак, Демон, Мультик, Немчиновский 50, Немчиновский 100, Норд, Орел, Орлан, Софья, Спартак                                                                                                                                                                                                                    | Флора 2                                                                                                                                       |
| Зарубежные<br>Foreign                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |
| Hurst Green Shaft, Kelvedon Wonder, Puget (Великобритания); Premium (Чехия); Янтар (Украина); Cao Yan, Lu Zhun, Pin Wan (Китай); Sparkle, Ранний зеленый (США); Juwel (Германия); Rondo (Голландия); Anwend                                                                                                                                        | Крепыш, Топаз, Труженик (Украина); Белорусский неосыпающийся, Белус, Миллениум, Зилга (Беларусь); Konto, Madonna, Rosakrone (Германия); Alaska, Filby, Iceberg (Великобритания); Eiffel, Frisson, Roi des Gourmands (Франция); Finale (Голландия); Smaragd (Чехия); Kaliski (Польша); Torsdag (Швеция); Капитал | Зазерский усатый, Игуменский кормовой, Кореличский кормовой, Червенский 235 (Беларусь); Wasata fioletowa (Польша); Mummy pea (Великобритания) |
| Маркерные линии и дикорастущие формы<br>Marker lines and wild-growing forms                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |
| WL1238, SGE, Slow, <i>P. sativum</i> subsp. <i>elatus</i> (M.Bieb.) Asch. & Graebn. (J164), <i>P. sativum</i> subsp. <i>elatus</i> (Сербия: Ćupina et al., 2011), <i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvense</i> (Армения), <i>P. sativum</i> subsp. <i>sativum</i> var. <i>arvense</i> (J12423), <i>P. fulvum</i> Sibth. & Sm. (J12) |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                               |

Были использованы следующие CAPS-маркеры (приведены название маркера/эндоуклеаза рестрикции и источник последовательностей праймеров): *Adh1/HaeIII*, *Adh1/TaqI*, *CipPor/Ksp22I*, *CipPor/RsaI*, *Pepc/RsaI*, *Rnp33/HpaII*, *Rnp33/RsaI*, *Sodmt/Ksp22I*, *TubA1/TaqI*, *TubA1/HinfI* (подробные характеристики генов, их продуктов и аллелей

CAPS-маркеров см. в работах: Kononov et al., 2005, Kononov, 2006), *Fbpp/HpaII*, *PsFAS1/TaqI* (Sinjushin et al., 2008). Две комбинации праймеров были подобраны в ходе настоящей работы: *Uni* (5'-tctctactgcaccatctc, 5'-ctacattccctcccgcccat), *PsCLV3* (5'-ctgttctttctgtgtgtcttattag, 5'-caacattttctacasaacaacaacca). Полиморфизм рестрикционных

фрагментов *Uni* и *PsCLV3* выявляли с помощью эндонуклеаз *Bst4CI* и *AluI* соответственно. Для поиска полиморфизма митохондриальной и пластидной ДНК использовали соответственно CAPS-маркеры *cox1/PsiI* и *rbcL/AspLEI* (Kosterin, Bogdanova, 2008). У нескольких сортов для ядерных маркеров в 2-3 повторностях (в том числе и с разными образцами ДНК) не удалось добиться устойчивой амплификации фрагмента ожидаемой длины; генотипы данных линий по этим локусам не были учтены в дальнейшем анализе.

Помимо CAPS, использовали микросателлитные (SSR) маркеры III и V групп сцепления AA355, AA374, AA399, AA491, AB92, AB146, AB83 и AD79 (Loridon et al., 2005).

Амплификацию проводили в приборе MC2+ (ДНК-Технология). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 5 мкл раствора ДНК (20 нг/мкл), 5 мкл готовой смеси для амплификации ScreenMix (Evrogen), прямой и обратный праймеры в концентрации 0,2-0,5 мкмоль/л и воду высокой очистки (Milli-Q) до 25 мкл. Программа амплификации имела следующий вид: начальная денатурация (94°C, 2,5'), 5 циклов начальной элонгации (24°C, 0,5'; T<sub>m</sub> +2°C, 0,5'; 70°C, 1,5'), 35 циклов элонгации (93°C, 20"; T<sub>m</sub>, 0,5'; 71,5°C, 1'), конечная элонгация (72°C, 3'). Температуру отжига (T<sub>m</sub>) подбирали и оптимизировали для каждой пары праймеров.

Для выявления полиморфизма CAPS-маркеров амплификат обрабатывали эндонуклеазами рестрикции (СибЭнзим) в соответствии с протоколом производителя.

Фракционирование продуктов рестрикции проводили путем горизонтального электрофореза в 1,5–3% агарозном геле (Amresco) с окрашиванием бромистым этидием. Результат амплификации SSR-маркеров определяли с помощью системы капиллярного гель-электрофореза QIAxcel (QIAGEN).

Для оценки динамики хозяйственно-ценных признаков у сортов гороха использовали данные из ежегодного издания «Характеристики сортов растений, впервые включенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» (1994-2019).

Полученные данные обрабатывали с помощью MS Office Excel (Microsoft) и Statistica 12 (Statsoft).

## Результаты и обсуждение

Результаты работы характеризуют выбранную для исследования коллекцию сортов, которая, как мы считаем, является репрезентативной. Есть основания полагать, что полученные данные отражают тенденции, характерные для отечественных сортов гороха в целом.

### Динамика фенотипического разнообразия

В качестве меры попарного сходства между образцами использовали коэффициент Жаккара (K<sub>j</sub>), равный отноше-

нию числа различающихся проявлений признака (кодов дескриптора или аллелей) к числу общих у двух образцов проявлений. Отмечено более низкое значение K<sub>j</sub> у новых сортов по сравнению со старыми (см. табл. 2), т.е. фенотипически новые сорта более разнообразны. У овощных сортов ситуация противоположная (см. табл. 2).

Различные типы детерминантного роста побега – «самарский» (*deh*; здесь и далее приведено обозначение мутации) и «московский» (*det*) – встречаются только у отечественных сортов (приложение 2/Supplement 2). Ни у одного зарубежного сорта не отмечено срастания семяножки с семенной кожурой (*def*). Для 5 признаков из 16 изученных у российских сортов отмечены морфологические мутации, не встречающиеся ни у советских, ни у зарубежных образцов. Для ряда российских сортообразцов характерны необычные листовые морфотипы – «хамелеон» (*af uni<sup>lac</sup>*), «акациевидный» (*tl*).

По сравнению со старыми зарубежными (Mummy pea, Rosakrone) и старыми отечественными (не вошедший в выборку Штамбовый 2) сортами, у современных сортов не встречается фасциация побега (*fa*). Сочетание этой аномалии с «московским» типом детерминантного роста (*det*) – морфотип «люпиноид» – рассматривают как перспективное для селекции (Zelenov, 2015), хотя районированных сортов этого морфотипа по нашим данным еще нет.

Можно констатировать увеличение разнообразия фенотипов современных российских сортов гороха по сравнению с советскими. Некоторые сорта несут значительное количество рецессивных морфологических мутаций, что нехарактерно для зарубежных сортов. Например, зерновой сорт Батрак (ФГБНУ ФНИЦ ЗБК) гомозиготен по пяти мутациям, затрагивающим гены морфологических признаков, и характеризуется белыми цветками (*a*), безлисточковостью (*af*), неосыпающимися семенами (*def*), «самарским» типом детерминантного роста побега (*deh*) и укороченными междоузлиями (*le*).

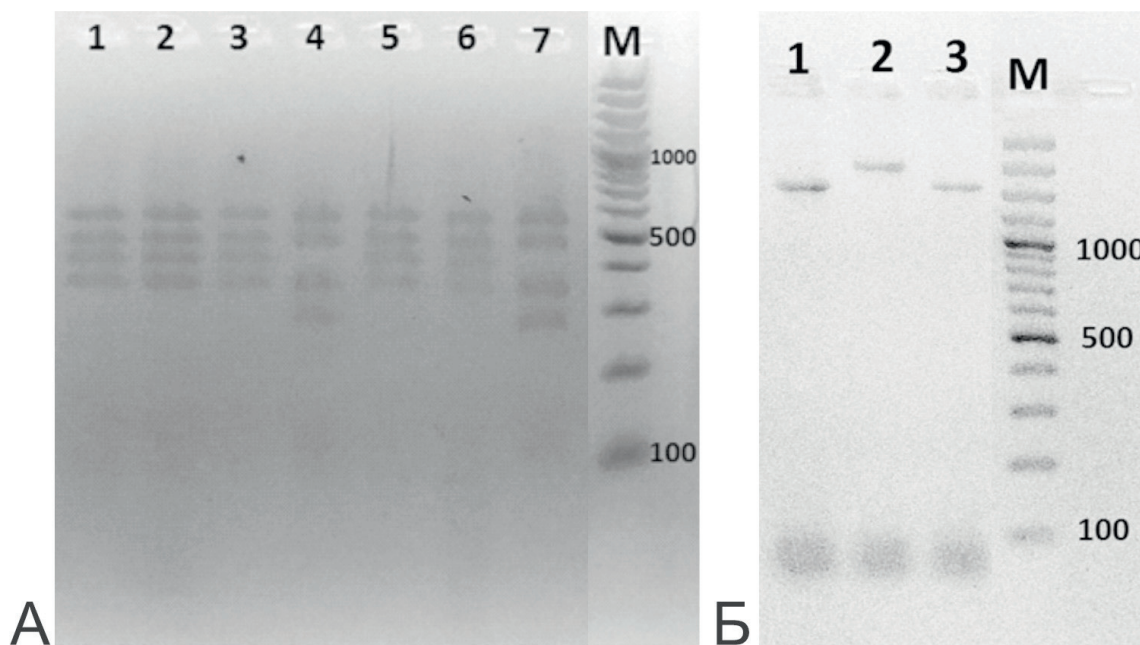
Фенотипическое разнообразие новых отечественных зерновых сортов, выраженное через K<sub>j</sub>, сопоставимо с уровнем, установленным для зарубежных сортов (см. табл. 2). Как старые, так и, еще в большей степени, новые овощные сорта фенотипически менее разнообразны, чем зарубежные (см. табл. 2).

### Динамика генетического разнообразия, выявляемая с помощью CAPS-маркеров ядерной ДНК

Все 14 ядерных CAPS-маркеров обнаружили полиморфизм: в пределах изученной коллекции было найдено в среднем 2,4 аллеля на локус (рис. 1, приложение 2/Supplement 2). Такой уровень полиморфизма ниже обнаруженного ранее для тех же маркеров (Konovalov et al., 2005). Это, вероятно, объясняется тем, что в процитированной статье была описана коллекция меньшего размера, но включающая 5 маркерных линий.

Значения  $K_j$  приведены в таблице 2. Результаты анализа сходны с тем, что было получено для морфологических признаков, т.е. разнообразие зерновых сортов увеличилось, а овощных – уменьшилось. Однако тенденция

выражена гораздо более умеренно, а средние значения  $K_j$  внутри групп «все старые сорта» и «все новые сорта» близки (соответственно 0,41 и 0,42).



**Рис. 1. Примеры полиморфизма CAPS-маркеров (результаты электрофореза в 2%-ном агарозном геле). А – *Pepec/RsaI*: 1-3, 5, 6 – аллель «1»; 4, 7 – аллель «2» (сорта Мультик, Аист, Софья, Батрак, Premium, Демон, Орлан соответственно). Б – *Sodmt/Ksp22I*: 1, 3 – аллель «1»; 2 – аллель «2» (сорта Флагман, Filby и Викинг). М – маркер молекулярной массы (указаны длины фрагментов, пн).**

**Fig. 1. Examples of CAPS polymorphism (electrophoresis in 2% agarose gel). A – *Pepec/RsaI*: 1-3, 5, 6 – allele «1»; 4, 7 – allele «2» (cvs. Multik, Aist, Sofya, Batrak, Premium, Demon, Orlan, respectively). Б – *Sodmt/Ksp22I*: 1, 3 – allele «1»; 2 – allele «2» (cvs. Flagman, Filby, Viking). М – molecular weight marker (fragment lengths are denoted in bp).**

Корреляция между значениями  $K_j$  при сравнении одних и тех же сортов по морфологическим и молекулярным маркерам оказалась положительной, но слабой. Для 100 попарных сравнений в группе старых сортов коэффициент корреляции Спирмена  $R$  между морфологическими и молекулярными маркерами составил 0,151 ( $p > 0,05$ ), для 100 сравнений в группе новых сортов  $R = 0,218$  ( $p < 0,05$ ).

Можно заключить, что среди новых сортов отечественной селекции (с 1991г.) показатель генетического сходства остался практически на том же уровне,

что и у старых сортов. Зерновые сорта оказались более гетерогенными, чем овощные, что согласуется с их большим фенотипическим разнообразием и ранее полученными данными для SSR-маркеров (Dribnokhodova, Gostimsky, 2009). Уровень CAPS-полиморфизма зарубежных сортов, выраженный через  $K_j$ , ненамного отличается от значений, установленных для отечественных сортов (см. табл. 2). Интересно, что и среди зарубежных сортов полиморфизм среди овощных оказался менее выраженным, чем в группе зерновых (см. табл. 2).

**Таблица 2. Значения коэффициента Жаккара при попарном сравнении сортов.**

**Table 2. Jaccard coefficients for pairwise comparison of cultivars.**

| Для морфологических признаков<br>Based on morphological traits |                    |                      |
|----------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|
|                                                                | Зерновые<br>Grain  | Овощные<br>Vegetable |
| Зерновые                                                       | 0,33 – 0,64 – 0,87 | 0,27 – 0,47 – 0,75   |
|                                                                | 0,27 – 0,48 – 0,75 | 0,17 – 0,33 – 0,56   |
|                                                                | 0,23 – 0,49 – 0,88 | 0,28 – 0,47 – 0,68   |
| Овощные                                                        |                    | 0,47 – 0,64 – 0,87   |
|                                                                |                    | 0,47 – 0,67 – 0,87   |
|                                                                |                    | 0,23 – 0,56 – 1,00   |
| Для CAPS-маркеров<br>Based on CAPS-markers                     |                    |                      |
|                                                                | Зерновые           | Овощные              |
| Зерновые                                                       | 0,17 – 0,40 – 0,63 | 0,17 – 0,41 – 0,75   |
|                                                                | 0,22 – 0,39 – 0,73 | 0,17 – 0,40 – 0,75   |
|                                                                | 0,12 – 0,42 – 0,75 | 0,12 – 0,41 – 0,87   |
| Овощные                                                        |                    | 0,17 – 0,44 – 0,86   |
|                                                                |                    | 0,24 – 0,48 – 0,86   |
|                                                                |                    | 0,22 – 0,47 – 0,87   |

**Примечание:** Данные представлены в виде минимальное – среднее – максимальное. Верхняя строка ячейки относится к старым отечественным сортам, средняя к новым, нижняя к зарубежным.

**Note:** Data are given as minimum – average – maximum  $K_j$ . In each cell, the upper set of values corresponds to the old national cultivars, the middle to the new ones, and the lower to foreign cultivars.

### Уровень внутрилинейного полиморфизма

Для использования образцов из коллекции генетических ресурсов необходимо знать степень генетической однородности материала. В ходе работы мы провели оценку внутрилинейного полиморфизма у двух сортов – Виола (14 растений) и Викинг (12) – и трех неокультуренных образцов: *P. sativum* var. *arvense* из Армении (12), *P. sativum* subsp. *elatius* из Сербии (8) и *P. sativum* subsp. *elatius* Л64 (9). Были использованы два CAPS-маркера (*Pepc/RsaI* и *Sodmt/Ksp22I*). Результаты представлены в таблице 3.

Ранее в нашей лаборатории также была проведена

оценка внутрилинейного полиморфизма в наборе образцов гороха с использованием SSR-маркеров (Dribnokhodova, 2009; Sinjushin, 2015). Полученные результаты также продемонстрировали низкий уровень внутрилинейного полиморфизма у всех образцов (в среднем доля полиморфных маркеров равна 4,84%) (Dribnokhodova, 2009). В целом SSR-маркеры являются значительно более вариабельными, чем CAPS. Наблюдаемая в случае микросателлитных локусов внутрилинейная гетерогенность может быть связана не только с сохранением изначальной неоднородности сорта, но и с мутациями *de novo* (Cieslarová et al., 2011a). Возможность сокращения изначальной генетической гетерогенности образца за время его поддержания в коллекции уже была показана для гороха (Cieslarová et al., 2011b; Sinjushin, 2015).

**Таблица 3. Частоты аллелей двух CAPS-маркеров у различных образцов гороха. Нумерация аллелей присвоена условно.**

**Table 3. Allele frequencies of two CAPS markers in different pea accessions. Alleles are numbered arbitrarily.**

| Маркер/<br>Рестриктаза<br>Marker/<br>Endonuclease | Аллель<br>Allele | Образец<br>Accession |        |                                                             |                                                                                  |                                                                                    |
|---------------------------------------------------|------------------|----------------------|--------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                   |                  | Виола                | Викинг | <i>P. sativum</i> var.<br><i>arvense</i> Poir.<br>(Армения) | <i>P. sativum</i> subsp.<br><i>elatus</i> (M.Bieb.)<br>Asch. & Graebn.<br>(J164) | <i>P. sativum</i> subsp.<br><i>elatus</i> (M.Bieb.)<br>Asch. & Graebn.<br>(Сербия) |
| <i>Pepc/RsaI</i>                                  | 1                | 92,86%               | 100%   | 100%                                                        | 100%                                                                             | 0%                                                                                 |
|                                                   | 2                | 7,14%                | 0%     | 0%                                                          | 0%                                                                               | 100%                                                                               |
| <i>Sodmt/Ksp22I</i>                               | 1                | 100%                 | 100%   | 91,67%                                                      | 88,89%                                                                           | 0%                                                                                 |
|                                                   | 2                | 0%                   | 0%     | 0%                                                          | 0%                                                                               | 100%                                                                               |
|                                                   | 3                | 0%                   | 0%     | 8,33%                                                       | 11,11%                                                                           | 0%                                                                                 |

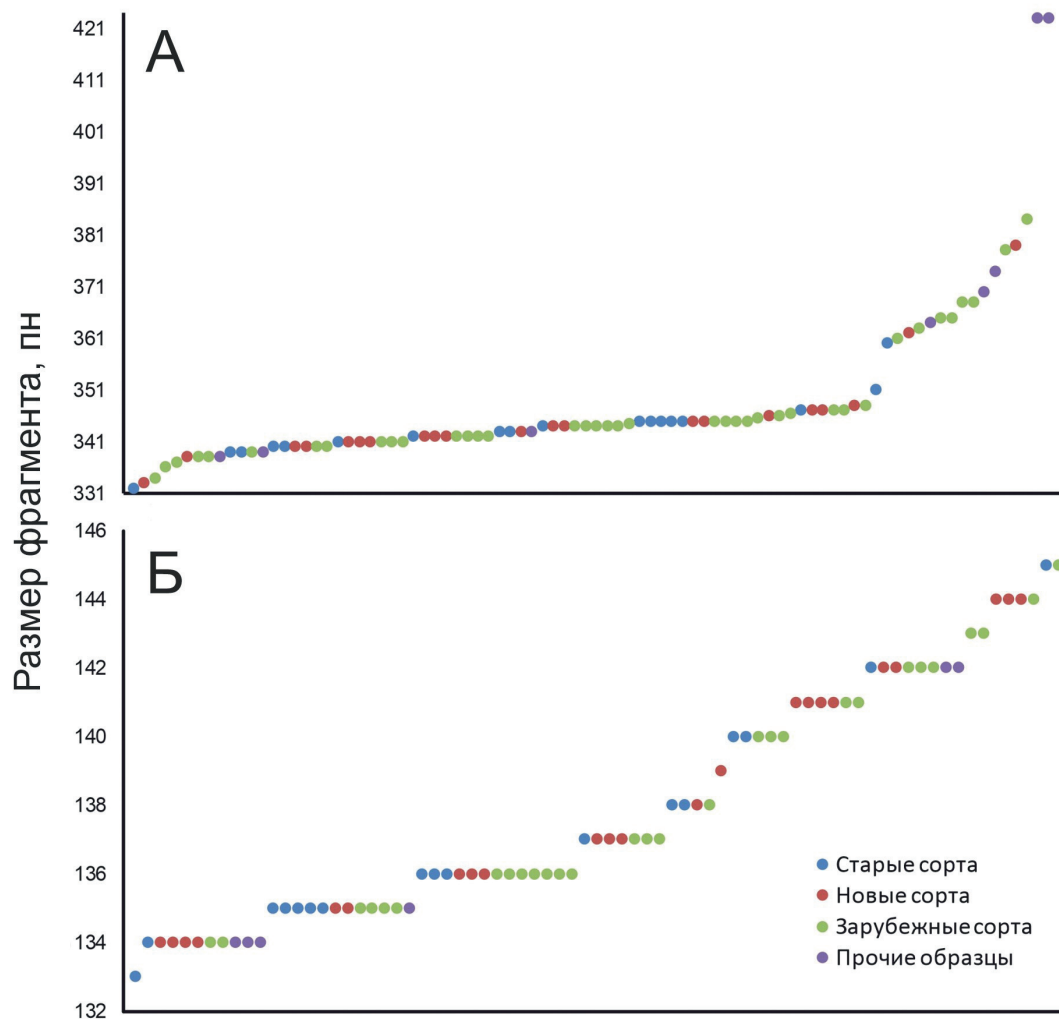
### Проблема интерпретации результатов фрагментного анализа и динамика разнообразия SSR-маркеров

Для анализа микросателлитных маркеров был применен фрагментный анализ, дающий оценку длины фрагментов в парах нуклеотидов. Однако при проведении нескольких ПЦР с одной и той же комбинацией праймеров и одним и тем же образцом ДНК неоднократно имела место неполная воспроизводимость результатов. Установленная с помощью системы QIAxcel длина фрагментов различалась на несколько нуклеотидов между повторностями.

Подобное явление уже было отмечено в литературе. Так, капиллярный электрофорез был признан неудовлетворительным для точного генотипирования малярийных комаров по микросателлитным маркерам (Manrique et al., 2015). Различия в 3–4 пн могут быть связаны как с погрешностями метода, так и с внутрисортным аллельным полиморфизмом. Чтобы исключить второе, мы провели несколько повторных тестов с одними и теми же образцами ДНК, и в ряде случаев различия сохранялись. Это делает невозможным подсчет  $K_r$ , как это было сделано

для CAPS-маркеров.

Так как основная цель работы заключалась в сравнении встречаемости аллелей SSR-маркеров в двух группах сортов, а не точном различении аллелей, мы построили вариационные ряды по длине фрагмента, установленной с помощью системы QIAxcel (рис. 2). В тех случаях, когда для одного и того же образца было получено несколько различных значений, использовали среднюю оценку. Для двух маркеров (AA374 и AA399) полученный ряд оказался непрерывным и, вероятно, соответствующим единственному аллелю (рис. 2, Б). Для прочих локусов распределение длин амплифицированных фрагментов указывает на несколько аллелей (рис. 2, А). Некоторые редкие аллели встречаются только у некультурных форм или маркерных линий – например, «легкий» (около 318 пн) аллель маркера AB83 или «тяжелый» (423 пн) аллель маркера AB146 (рис. 2). В остальных случаях можно констатировать, что все возможные значения длин фрагментов отмечены и у советских (до 1991 г.), и у российских (с 1991 г.), и у зарубежных сортов. Таким образом, аллельное разнообразие проанализированных микросателлитных локусов на протяжении времени сохраняется неизменным у отечественных сортов и сопоставимо с разнообразием зарубежных сортов.



**Рис. 2. Вариационные ряды для длин фрагментов (пн), установленных для SSR-маркеров AB146 (А) и AA374 (Б) с помощью системы QIAxcel. Образцы гороха расположены по оси абсцисс в порядке возрастания размера амплифицируемого фрагмента.**

**Fig. 2. The order statistics for fragment length (bp) estimated for AB146 (A) and AA374 (B) SSR markers using the QIAxcel system. Pea accessions are distributed along the x-axis in order of the increasing amplified fragment size.**

#### **Единообразие исследованных образцов по хлоропластному и митохондриальному маркерам**

У большинства образцов, включая *P. sativum* subsp. *elatius* из Сербии, сайты рестрикции в неядерных маркерах отсутствовали. Два образца, имевшие отличающиеся от прочих аллели митохондриального (*cox1/PsiI*) и пластидного (*rbcL/AspLEI*) маркеров, Л64 и Л12, относятся соответственно к другому подвиду (*P. sativum*

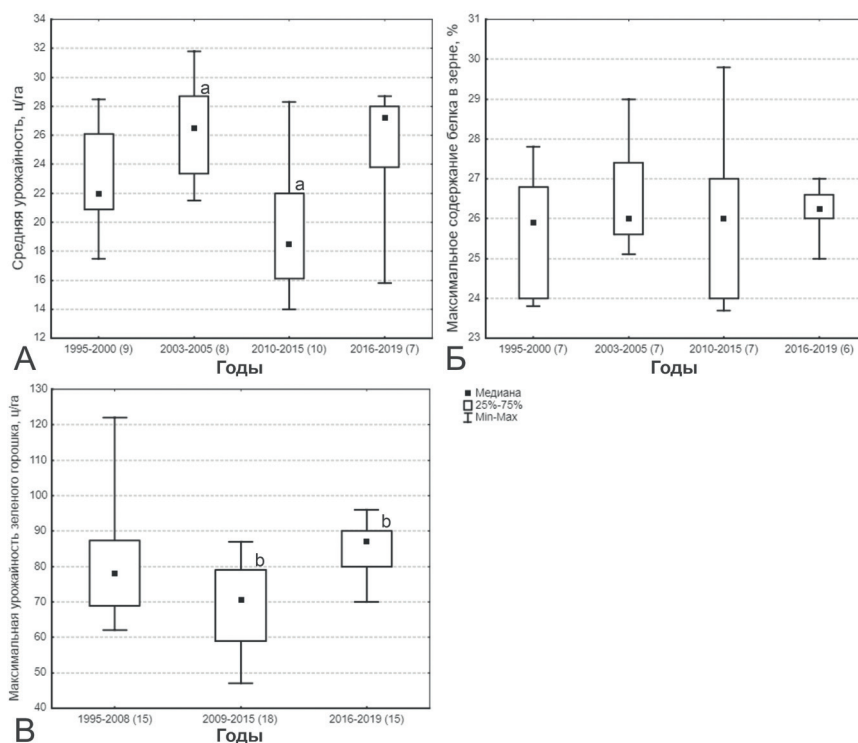
subsp. *elatius*) и другому виду (*P. fulvum*). Эти результаты хорошо согласуются с выводом работы (Kosterin, Bogdanova, 2008) о том, что для окультуренных форм гороха характерно отсутствие сайтов рестрикции в неядерных маркерах *cox1/PsiI* и *rbcL/AspLEI*. То обстоятельство, что образец *P. sativum* subsp. *elatius* из Сербии обладает тем же генотипом, что и окультуренные формы, также не противоречит современным представлениям о парафилетическом характере этого подвида (Kosterin, Bogdanova, 2008).

## Динамика хозяйственно-ценных признаков у отечественных сортов

Наибольший практический интерес связан с изменением продуктивности и иных хозяйственно значимых признаков в ходе селекции. Сведения, приведенные в ежегодном издании «Характеристики сортов растений, впервые включенных в Государственный реестр...», неоднородны в разные годы и для сортов различных направлений использования. Так, для зерновых сортов обычно приведены средняя и максимальная продуктивность, в то время как у овощных сортов во многих случаях продуктивность приведена как интервал от наименьшего до наибольшего значения. В таких случаях был проанализирован максимальный показатель. Кроме того, нецелесообразно обобщать результаты испытания для сортов разных регионов допуска. Наибольшее число сортов рекомендованы для Северо-Кавказского округа,

поэтому они были включены в сравнение. Распределение сортов по годам создания также неоднородно, поэтому для сравнения групп сопоставимого размера были охвачены периоды неравной длительности (рис. 3).

С учетом вышеизложенной специфики данных можно заключить, что для средней урожайности зерновых сортов, содержания белка в зерне и максимальной урожайности зеленого горошка овощных сортов нет достоверных различий между сортами раннего (преимущественно 1995-2000 гг.) и позднего (2016-2019) периодов. Аналогичные результаты получены для Центрально-Черноземного региона (не представлено). Таким образом, более чем за 20 лет отечественной селекции новейшего времени нет выраженного тренда на повышение урожайности или содержания белка в зерне. Вероятно, традиционная, не привлекающая методов направленной модификации генома селекция привела к тому, что значения основных показателей продуктивности гороха вышли на плато.



**Рис. 3.** Динамика средней урожайности (А), максимального содержания белка в зерне (Б) у зерновых сортов и максимальной урожайности зеленого горошка у овощных сортов (В). По оси абсцисс – годы включения в Госреестр, в скобках число сортов каждой группы; все сорта рекомендованы для возделывания в Северо-Кавказском регионе. Одинаковыми латинскими буквами обозначены достоверно различающиеся группы сортов (критерий Красскела-Уоллиса: а,  $p < 0,05$ ; б,  $p < 0,01$ ).

**Fig. 3.** Dynamics of the average yield (A), maximum protein content in grain (Б) of grain cultivars, and maximum green pea yield in vegetable cultivars (В). X-axis: year of inclusion into the State Register, the number of cultivars in each group is given in parentheses. All cultivars were recommended for cultivation in the North Caucasus region. The same Latin letters are used to mark significant differences (Kruskal-Wallis test: а,  $p < 0,05$ ; б,  $p < 0,01$ ).

В более ранний период селекции, с 1920-х по 1980-е гг., было показано значительное повышение урожайности отечественных сортов зернового гороха (Novikova et al., 1989). Интересен механизм этой динамики: общая биологическая продуктивность растений осталась практически неизменной, но урожайность увеличилась за счет повышения уборочного индекса и уменьшения биомассы вегетативных органов. Проведенная нами оценка сведений из «Характеристики сортов растений...» за 1994-2019 гг. указывает на отсутствие динамики урожайности. Возможно, дальнейшее перераспределение ассимилятов между вегетативной частью и семенами находится за пределами биологических возможностей вида.

### Заключение

Подводя итог данной работе, можно сделать следующие выводы.

1. Среди отечественных зерновых сортов гороха с течением времени происходит повышение уровня фенотипического разнообразия, среди овощных – снижение.
2. Для большинства CAPS- и SSR-маркеров III и V групп сцепления число аллелей на локус остается неизменным с течением времени и практически совпадает с уровнем разнообразия, отмеченным у зарубежных сортов. Случаи, когда число аллелей со временем уменьшилось или увеличилось, редки. Выраженной эрозии генетического разнообразия у зерновых сортов не происходит; среди овощных сортов разнообразие снижается.
3. Проанализированные маркеры хлоропластной и митохондриальной ДНК не позволяют судить об изменении уровня генетического разнообразия сортов гороха, но дифференцируют различные подвиды гороха.
4. Редкие аллели ДНК-маркеров в основном присущи неокультурным формам, которые логично рассматривать в качестве перспективных доноров изменчивости в селекции гороха.
5. За период селекции гороха 1994-2019 гг. не обнаружено достоверного увеличения средней урожайности и максимального содержания белка в семенах у зерновых сортов, а также увеличения максимальной урожайности зеленого горошка у овощных сортов, включенных в Государственный реестр РФ.

### Благодарности/Acknowledgements

Авторы выражают глубокую благодарность всем коллегам, в разное время предоставившим материал для исследований: д.б.н. Ж.А. Акопян, д.б.н. М.А. Вишняковой, д.с.-х.н. Г.А. Дебелому, д.с.-х.н. А.Н. Зеленову, к.б.н. В.А. Жукову, к.б.н. И.П. Котляр, к.б.н. П.А. Пашкевичу, Dr. Aleksandar Mikić, Dr. Mike Ambrose, Dr. Valentin Kosev. Авторы благодарят к.б.н. Е.В. Семенову за ценные консультации, к.б.н. И.В. Артюшина за предоставленную возмож-

ность фрагментного анализа, М.М. Маркову за помощь со статистической обработкой и представлением данных.

*The authors express deep gratitude to all colleagues who at different times provided material for research: Dr. Biol. Sci. J.A. Akopian, Dr. Biol. Sci. M.A. Vishnyakova, Dr. Agri. Sci. G.A. Debely, Dr. Agri. Sci. A.N. Zelenov, Ph.D. V.A. Zhukov, Ph.D. I.P. Kotlyar, Ph.D. P.A. Pashkevich, Dr. Aleksandar Mikić, Dr. Mike Ambrose, and Dr. Valentin Kosev. The authors are grateful to Ph.D. E.V. Semenova for valuable advice, Ph.D. I.V. Artyushin for the provided opportunity of fragment analysis, and to M.M. Markova for her help with the statistical processing and data presentation.*

### References/Литература

- Altukhov Yu.P. (ed.). Dynamics of population gene pools under anthropogenic pressures (Dinamika populyatsionnykh genofondov pri antropogennykh vozdeistviyakh). Moscow: Nauka; 2004. [In Russian] (Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / под ред. Ю.П. Алтухова. Москва: Наука; 2004).
- Baranger A., Aubert G., Arnau G., Lainé A.L., Deniot G., Potier J., Weinachter C., Lejeune-Hénaut I., Lallemand J., Burstin J. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108:1309-1321. DOI: 10.1007/s00122-003-1540-5
- Cieslarová J., Hanáček P., Fialová E., Hýbl M., Smýkal P. Estimation of pea (*Pisum sativum* L.) microsatellite mutation rate based on pedigree and single-seed descent analyses. *Journal of Applied Genetics*. 2011a;52:391-401. DOI: 10.1007/s13353-011-0058-9
- Cieslarová J., Smýkal P., Dočkalova Z., Hanáček P., Procházka S., Hýbl M., Griga M. Molecular evidence of genetic diversity changes in pea (*Pisum sativum* L.) germplasm after long-term maintenance. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2011b;58:439-451. DOI: 10.1007/s10722-010-9591-3
- Cieslarová J., Hýbl M., Griga M., Smýkal P. Molecular analysis of temporal genetic structuring in pea (*Pisum sativum* L.) cultivars bred in the Czech Republic and in former Czechoslovakia since the mid-20th century. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2012;48:61-73. DOI: 10.17221/127/2011-CJGPB
- Čupina B., Zlatković B., Smýkal P., Mikić A., Jajić I., Zeremski-Skorić T., Medović A. *In situ* evaluation of a *Pisum sativum* subsp. *elatius* population from the valley of the river Pćinja in southeastern Serbia. *Pisum Genetics*. 2011;43:20-24.
- Dribnokhodova O.P. Analysis of DNA polymorphism of a garden pea (*Pisum sativum* L.) (Анализ ДНК-полиморфизма горошка посевного [*Pisum sativum* L.]) (Ph.D. dissertation). Moscow: MSU; 2009. [in Russian] (Дрибноходова О.П. Анализ ДНК-полиморфизма гороха посевного (*Pisum sativum* L.): (дис. канд. биол. наук). Москва: МГУ; 2009).
- Dribnokhodova O.P., Gostimsky S.A. Allele polymorphism of microsatellite loci in pea *Pisum sativum* L. lines, varieties, and mutants. *Russian Journal of Genetics*. 2009;45(7):788-793 [in Russian] (Дрибноходова О.П., Гостимский С.А. Исследование аллельного полиморфизма микросателлитных локусов у разных линий, сортов и мутантов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) *Генетика*. 2009; 45(7):900-906). DOI: 10.1134/S1022795409070047
- The International COMECON List of Descriptors for the genus *Pisum* L. (Международный классификатор SEV рода *Pisum* L.). Leningrad; 1981. [In Russian] (Международный классификатор СЭВ рода *Pisum* L. Ленинград; 1981).
- Kononov F.A. Mapping and molecular genetic analysis of genes in pea (*Pisum sativum* L.) (Картирование и молекулярно-генетический анализ генов горошка (*Pisum sativum* L.)) (Ph.D. dissertation). Moscow: IOGen; 2006. [in Russian] (Коновалов Ф.А. Картирование и молекулярно-генетический анализ генов гороха (*Pisum sativum* L.): (дис. канд. биол. наук). Москва: ИОГен; 2006).

- Kononov F., Toshchakova E., Gostimsky S. A CAPS marker set for mapping in linkage group III of pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2005;10:163-171.
- Kosterin O.E., Bogdanova V.S. Relationship of wild and cultivated forms of *Pisum* L. as inferred from an analysis of three markers, of the plastid, mitochondrial and nuclear genomes. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2008;55:735-755. DOI: 10.1007/s10722-007-9281-y
- Leino M.W., Boström E., Hagenblad J. Twentieth-century changes in the genetic composition of Swedish field pea metapopulations. *Heredity*. 2013;110:338-346. DOI: 10.1038/hdy.2012.93
- Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M.L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Hénaut I., Burstin J. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 2005;111:1022-1031. DOI: 10.1007/s00122-005-0014-3
- Manrique P., Hoshi M., Fasabi M., Nolasco O., Yori P., Calderón M., Gilman R.H., Kosek M.N., Vinetz J.M., Gamboa D. Assessment of an automated capillary system for *Plasmodium vivax* microsatellite genotyping. *Malaria Journal*. 2015;14:326. DOI: 10.1186/s12936-015-0842-9
- Novikova N.E., Lakhanov A.P., Amelin A.V. Physiological changes in pea plants during long-term breeding for higher seed productivity (Fiziologicheskiye izmeneniya v rasteniyakh gorokha v processe dlitel'noi selektsii na semennuyu produktivnost'). *Doklady VASKhNIL* 1989;(9):16-19 [In Russian] (Новикова Н.Е., Лаханов А.П., Амелин А.В. Физиологические изменения в растениях гороха в процессе длительной селекции на семенную продуктивность. *Доклады ВАСХНИЛ*. 1989;(9):16-19).
- Sinjushin A.A. Plant breeding in scope of the factorial concept of heredity (Selektsiya rastenii v epokhu faktorialnoi kontseptsii nasledstvennosti). *Zernobobovye i krupyanye kultury = Legumes and Groat Crops*. 2015;(4):27-36 [In Russian] (Синюшин А.А. Селекция растений в эпоху факториальной концепции наследственности. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2015;(4):27-36).
- Sinjushin A.A., Kononov F.A., Gostimskii S.A. *Sym28*, a gene controlling stem architecture and nodule number, is localized on linkage group V. *Pisum Genetics*. 2008;40:15-18.
- State register for selection achievements admitted for usage (national list). V. 1. "Plant varieties" (official publication). Moscow: FGBNU "Rosinformagrotekh"; 2019. [In Russian] (Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. «Сорта растений» (официальное издание) М.: ФГБНУ «Росинформагротех»; 2019).
- Torres A.M., Weeden N.F., Martin A. Linkage among isozyme, RFLP and RAPD markers in *Vicia faba*. *Theoretical and Applied Genetics*. 1993;85:937-945. DOI: 10.1007/BF00215032
- Zelenov A.N. Comment to the article of A. A. Sinjushin "Plant breeding in scope of the factorial concept of heredity" (Kommentarii k statye A.A. Sinyushina "Selektsiya rastenii v epokhu faktorialnoi kontseptsii nasledstvennosti"). *Zernobobovye i krupyanye kultury = Legumes and Groat Crops*. 2015;(4):37-41 [In Russian] (Зеленов А.Н. Комментарий к статье А.А. Синюшина «Селекция растений в эпоху факториальной концепции наследственности». *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2015;(4):37-41).
- Zelenov A.N., Zadorin A.M., Zelenov A.A. The first results of breeding pea varieties of the chameleon morphotype (Pervye rezultaty sozdaniya sortov gorokha morfotipa hameleon). *Zernobobovye i krupyanye kultury = Legumes and Groat Crops*. 2018;(2):10-17 [In Russian] (Зеленов А.Н., Задорин А.М., Зеленов А.А. Первые результаты создания сортов гороха морфотипа хамелеон. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2018;(2):10-17).

# СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ТАБАКА СО СНИЖЕННЫМИ АНТИФИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ ПО ОТНОШЕНИЮ К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ

Костина Н.Е.<sup>1</sup>, Спасельникова А.В.<sup>1</sup>, Егорова А.А.<sup>1</sup>,  
Колосовская Е.В.<sup>1</sup>, Домрачев Д.В.<sup>2</sup>, Романова А.В.<sup>1</sup>,  
Туманян С.Р.<sup>3</sup>, Хамас С.<sup>4</sup>, Кумлен Й.<sup>4</sup>,  
Дубовский И.М.<sup>3,5</sup>, Герасимова С.В.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН,  
630090 Россия, г.Новосибирск;  
✉ \*gerson@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Институт органической химии СО РАН,  
630090 Россия, г.Новосибирск;

<sup>3</sup>Новосибирский государственный аграрный университет,  
630039 Россия, г.Новосибирск;

<sup>4</sup>Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK),  
06466 Germany, Gatersleben;

<sup>5</sup>Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН,  
630501 Россия, Новосибирская область, р.п. Краснообск.

**Актуальность.** Модификация растений с целью повышения их устойчивости к вредителям – перспективное направление в современной биотехнологии. Создание искусственных защитных систем на основе РНК-интерференции или индукция метаболических изменений в растениях могут существенно снизить привлекательность для вредителя и, как следствие, степень повреждения растений. Однако, разработкой стратегий подобных модификаций затруднена отсутствием биотехнологических методов, разработанных для каждой культуры, и адекватных моделей для проведения таких исследований. Табак *Nicotiana tabacum* L. как растение семейства пасленовых потенциально может быть моделью для исследования возможных стратегий повышения устойчивости к вредителям для таких родственных культур как картофель, тоmat, сладкий перец и т.д. Препятствием к проведению подобных работ на табаке является высокая токсичность листьев, которая защищает табак от большинства вредителей. Недавно опубликованы исследования, доказывающие, что мутагенез генов семейства *Berberine Bridge-Like* (*BBL*) в табаке приводит к существенным изменениям в количественном и качественном составе алкалоидов в листьях. В настоящей работе данный подход был применен с целью получения растений табака, пригодных для потребления в пищу колорадским жуком (*Leptinotarsa decemlineata* Say), который является наиболее распространенным и опасным вредителем картофеля. **Результаты.** С целью модификации генома табака, были подобраны две направляющие РНК (нРНК), нацеленные на шесть генов семейства *BBL*. Каждая из них была встроена в вектор, содержащий ген нуклеазы Cas9 и каркас нРНК. Полученные конструкции вместе с плазмидой pBI121, содержащей ген устойчивости к канамицину *nptII* и репортерный ген бета-глюкуронидазы *Escherichia coli* Migula, были использованы для трансформации листовых эксплантов табака методом биобаллистики. Из трансформированных клеток путем селекции на канамицине были получены каллусы и далее трансгенные растения-регенеранты поколения T0. Неожиданным результатом стало появление широкого плейотропного эффекта модификации в виде многочисленных серьезных аномалий развития среди полученных популяций регенерантов. Самые тяжелые аномалии проявлялись в виде быстрой гибели растений, относительно жизнеспособные растения отличались угнетением роста и укоренения, увеличением числа междоузлий, изменением формы листьев, ускоренным цветением, аномалиями развития цветка и стерильностью. Только одна из семи полученных популяций клонов обладала достаточной жизнеспособностью

## CREATING A TOBACCO LINE WITH A WEAKER ANTIFEEDANT PROPERTY AGAINST COLORADO POTATO BEETLE

Kostina N.E.<sup>1</sup>, Spaselnikova A.V.<sup>1</sup>, Egorova A.A.<sup>1</sup>,  
Kolosovskaya E.V.<sup>1</sup>, Domrachev D.V.<sup>2</sup>, Romanova A.V.<sup>1</sup>,  
Tumanyan S.R.<sup>3</sup>, Chamas S.<sup>4</sup>, Kumlehn J.<sup>4</sup>,  
Dubovskiy I.M.<sup>3,5</sup>, Gerasimova S.V.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630090, Russia;  
✉ \*gerson@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>3</sup>Novosibirsk State Agrarian University,  
Novosibirsk 630039, Russia;

<sup>4</sup>Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK),  
Gatersleben 06466, Germany;

<sup>5</sup>Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences,  
Krasnoobsk Sett., Novosibirsk Province 630501, Russia.

**Background.** Genetic modification of plants is one of the promising strategies to increase their resistance to insect pests. The development of metabolic or RNA interference systems for plant protection requires appropriate models of host-insect interactions. *Nicotiana tabacum* L. is a classical model plant used in molecular and metabolic engineering. We consider tobacco as a model for developing protective strategies against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say, CPB). Normally, tobacco is toxic for CPB due to high content of nicotine and related alkaloids in leaves. Modification of the tobacco genome could provide tobacco genotypes with altered metabolism suitable for CPB feeding. It is known that different mutations in *Berberine Bridge-Like* (*BBL*) genes cause different alterations in tobacco leaf alkaloid levels. In the current study, the Cas9/gRNA system targeting members of the *BBL* gene family of tobacco was used to create a line which can serve as a diet for CPB. **Results.** In order to obtain tobacco with modified alkaloid content, two gRNAs matching target sequences in six *BBL* genes were selected. Each gRNA was cloned into a gRNA/Cas9 generic vector. The created constructs were mixed and used for biolistic transformation of tobacco leaf explants together with the pBI121 plasmid harboring the kanamycin resistance gene *nptII* and the reporter *E.coli* beta-glucuronidase (GUS) gene. Regenerants were selected on 100 mg/l of kanamycin and checked for transgene presence by histochemical GUS-assay. Unexpectedly, the regenerated plants displayed a variety of adverse phenotypic effects including different degree of growth and rooting inhibition, early flowering, increased number of internodes, changes in leaf shape, fusion of flowers, longostyly, and partial sterility. Only one from seven obtained calli produced a population of regenerated plants without severe phenotypic abnormalities. The NtaBBL5-14 line of clonally propagated plants was selected from this population and used for

для выращивания в гидропонном комплексе и существенно не отличалась от исходного сорта по жизнеспособности *in vitro*. Из этой популяции была выделена линия табака NtaBBL5-14, поддерживаемая *in vitro*. Данная линия была протестирована на кормовую пригодность для колорадского жука. Показано, что личинки колорадского жука эффективно потребляют листья табака полученной линии, и практически не потребляют листья контрольных растений (процент потребления  $97 \pm 0.5\%$  для модифицированных и  $9 \pm 3\%$  для контрольных растений). **Заключение.** Методом модификации генома получена линия табака, пригодная для питания личинок колорадского жука. В дальнейшем эта линия может быть использована как модель для исследования взаимодействия колорадского жука и растений. Результаты работы демонстрируют возможность менять спектр кормовых предпочтений вредителей и открывают перспективы развития данного направления. В частности, перспективным может быть осуществление модификаций с меньшим плейотропным эффектом, и, возможно, этого можно добиться, производя нокаут других генов, участвующих в регуляции синтеза никотина.

**Ключевые слова:** никотин, *Nicotiana tabacum*, *Leptinotarsa decemlineata*, токсичность, семейство генов *BBL*, Cas9, нРНК

#### 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-o5>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы./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.

a CPB feeding experiment. It was shown that CPB larvae consume the leaves of NtaBBL5-14 line ten times more efficiently than the leaves of control plants ( $97 \pm 0.5\%$  vs.  $9 \pm 3\%$  in 24 h respectively). **Conclusion.** The NtaBBL5-14 tobacco line is suitable for CPB feeding and can be further used as a model for studies in plant-pest interaction. The modification of other genes regulating nicotine metabolism can be a promising strategy to obtain tobacco plants edible for CPB with less pleiotropic effects.

**Key words:** nicotine, *Nicotiana tabacum*, *Leptinotarsa decemlineata*, toxicity, *BBL* gene family, Cas9, gRNA

**Для цитирования:** Костина Н.Е., Спасельникова А.В., Егорова А.А., Колосовская Е.В., Домрачев Д.В., Романова А.В., Туманян С.Р., Хамас С., Кумлен Й., Дубовский И.М., Герасимова С.В. Создание линии табака со сниженными антифидантными свойствами по отношению к колорадскому жуку. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):24-30. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o5

**For citation:** Kostina N.E., Spaselnikova A.V., Egorova A.A., Kolosovskaya E.V., Domrachev D.V., Romanova A.V., Tumanyan S.R., Chamas S., Kumlehn J., Dubovskiy I.M. Gerasimova S.V. Creating a tobacco line with a weaker antifeedant property against colorado potato beetle. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):24-30. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o5

#### ORCID:

Gerasimova S.V. <https://orcid.org/0000-0001-8626-1831>

УДК 57.016.5

Поступила в редакцию: 05.06.2020

Принята к публикации: 11.06.2020

## Введение

Табак *Nicotiana tabacum* L. является первым растением, на котором были разработаны методы трансгенеза, и активно используется для создания различных молекулярно-генетических моделей в генетике растений наряду с *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Sierro et al., 2014). Табак является перспективным модельным объектом для исследования генетики и физиологии растений семейства пасленовых, к которому принадлежит ряд ценных сельскохозяйственных культур, например, картофель *Solanum tuberosum* L. – одна из важнейших продовольственных культур во всем мире. Среди вредителей картофеля следует выделить колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say), как самого опасного на территории Северной Америки, Евразии и Африки. Колорадский жук (КЖ) может быстро акклиматизироваться и размножаться в различных средах обитания по всему миру благодаря активной миграционной способности, высокой пластичности и широкому спектру внутривидового полиморфизма (Weber, 2003). Колорадский жук наносит существенный вред посадкам картофеля, а для контроля этого вредителя в основном используют химические инсектициды. Однако КЖ быстро формирует резистентность к химическим инсектицидам, и нормы расхода препаратов многократно завышаются, что наносит значительный вред окружающей среде (Alyokhin et al., 2008). Моделирование молекулярных механизмов устойчивости растений к КЖ и создание модифицированных растений с повышенным уровнем устойчивости к КЖ является перспективным подходом для поиска средств борьбы с данным вредителем. Однако, отработка различных молекулярных подходов на картофеле – сложная задача, поскольку биотехнологические методы на этой культуре требуют длительной оптимизации для каждого генотипа, генетическая трансформация занимает много времени и требует привлечения опытных специалистов. Перспективной является идея отработки подхода на более простой родственной модели, которую затем, уже в «готовом виде», можно перенести на картофель.

Мы в данной работе рассматриваем табак как модель для исследования механизмов взаимодействия растений с колорадским жуком и как «плацдарм» для разработки молекулярных методов борьбы с данным вредителем. Препятствием к исследованию механизмов взаимодействия с КЖ является то, что табак не входит в число его кормовых растений. Однако, модификация генома табака с целью сделать листья съедобными для КЖ, могла бы создать линии табака, которые поедаются насекомыми с эффективностью, сравнимой с картофелем. В этом случае полученные линии растений можно было бы использовать в дальнейших исследованиях в условиях лаборатории. По нашему изначальному предположению, основным антифидантным компонентом в листьях табака является никотин. Несмотря на то, что КЖ доста-

точно адаптирован к питанию биомассой, содержащей алкалоиды (включая стероидные алкалоиды ботвы картофеля), никотин отсутствует в картофеле, и его наличие в листьях табака снижает привлекательность их для жука в качестве пищи (Hsiao, Fraenkel, 1968). Недавно было показано, что направленный мутагенез генов семейства *Berberine Bridge-Like* (*BBL*) в табаке приводит к различным качественным и количественным изменениям в содержании алкалоидов в листьях (Schachtsiek, Stehle, 2019; Lewis et al., 2020). Фермент BBL представляет собой флавинобисоптерин-4-оксидазу, наиболее вероятно участвующую в заключительной стадии окисления в биохимическом пути синтеза никотина (Kajikawa et al., 2011). В настоящей работе подобный подход был применен для получения растений табака, которые обладали бы повышенной кормовой привлекательностью для колорадского жука. Генетические конструкции, несущие гены нуклеазы Cas9 и направляющую (guide) РНК (нРНК, gRNA), нацеленные на семейство генов *BBL*, были использованы для получения модифицированных растений табака, которые затем скормливали личинкам КЖ. Показано, что личинки КЖ способны питаться листьями модифицированных растений табака. Полученная линия табака может быть использована как модель для экспериментального исследования молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений к вредителям.

## Материалы и методы

В качестве исходного материала использовались растения табака *N. tabacum* L. линии SR1. Растения культивировали *in vitro* на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением сахарозы (20 г/л).

Для мутагенеза семейства генов *BBL* были выбраны две нРНК, гомологичные участкам одновременно шести генов (*BBLa*, *BBLb*, *BBLd.1*, *BBLd.2*, *BBLc*) (Schachtsiek, Stehle, 2019). Два выбранных целевых сайта практически идентичны, один расположен со сдвигом в 3 нуклеотида относительно второго (таблица 1).

Для создания вектора, экспрессирующего ген Cas9 и содержащего нРНК, для начала в вектор pAB-M (DNA Cloning Service, Hamburg, Germany) был встроены фрагмент плазмиды pEN-Chimera (Fauser et al., 2014), ограниченный сайтами рестрикции *NcoI* и *SpeI*, содержащий промотор U6-26 *A. thaliana* и химерную нРНК, с образованием вектора pSI55. Параллельно был создан вектор, содержащий промотор гена *UBIQUITIN4-2* петрушки *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss, последовательность гена Cas9 (с кодоновым составом, оптимизированным для *A. thaliana*) и терминальную последовательность гена реа3А гороха *Pisum sativum* L. Для этого, промотор и первая часть гена Cas9 были амплифицированы, используя пару праймеров PromCas F/PromCas R и плазмиду pDe-Cas9 (Fauser et al., 2014) в качестве матрицы, вторая

часть гена Cas9 вместе с терминатором была амплифицирована с использованием праймеров CasTerm F/CasTerm R (таблица 2). Вектор pAB-M был гидролизован при помощи нуклеазы *SpeI*, и далее была произведена сборка по Гибсону (Gibson Assembly, New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA) в соответствии с инструкцией производителя, используя два амплифицированных фрагмента, описанных выше, с образова-

нием плазмиды pSI56. Далее, фрагмент, содержащий последовательность каркаса нРНК, ограниченный сайтами рестрикции *NotI* и *SpeI*, был вырезан из pSI55 и интегрирован в pSI56, в результате чего был получен вектор pSI57 – финальная конструкция, содержащая систему нРНК/Cas9, в которую можно встраивать специфическую часть нРНК в виде двухцепочечного олигонуклеотида с липкими концами по сайтам рестрикции *BbsI*.

**Таблица 1. Последовательности целевых сайтов и нРНК для внесения мутаций в гены семейства *BBL***

**Table 1. The sequences of target sites and gRNAs for mutagenesis of *BBL* gene family members**

| Обозначение нРНК/<br>gRNA | Структура целевого сайта (подчеркнут PAM) /Target site structure (PAM* is underlined) | Структура нРНК /<br>gRNA structure |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| <i>BBL1</i>               | 5'-tatgaaatcagagtaaggtg <u>cg</u> g-3'                                                | 5'-tatgaaatcagagtaaggtg-3'         |
| <i>BBL2</i>               | 5'-gaaatcagagtaaggtg <u>cg</u> gag-3'                                                 | 5'-gaaatcagagtaaggtg-3'            |

\* – PAM (protospacer adjacent motif) – мотив, связанный с протоспейсером

**Таблица 2. Список праймеров и олигонуклеотидов**

**Table 2. List of primers and oligonucleotides**

| Обозначение/<br>Designation | Последовательность 5'-3'/Sequence 5'-3'               |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|
| PromCas F                   | tagagggcccttaaggccttaAAAAATTACGGATATGAATATAGGCATATCCG |
| PromCas R                   | cgttttctcGTTATCCAAGAAATCCTTATCCTTAATGATCTTG           |
| CasTerm F                   | cttgataacGAGGAAAACGAGGATATCTTGGAG                     |
| CasTerm R                   | cctgcagccggggggaactagtAAGCCTATACTGTACTTAACTTGATTGC    |
| BBL1_Fwd                    | attgtatgaaatcagagtaaggtg                              |
| BBL1_Rev                    | aaaccaccttactctgattcata                               |
| BBL2_Fwd                    | attggaaatcagagtaaggtg                                 |
| BBL2_Rev                    | aaaccgcaccttactctgattc                                |

Каждую из подобранных нРНК интегрировали в вектор pSI57 путем встройки олигонуклеотида, содержащего ее последовательность, по сайту рестрикции *BbsI*. Двухцепочечный олигонуклеотид с липкими концами получали отжигом друг на друга пар одноцепочечных олигонуклеотидов: BBL1\_Fwd/BBL1\_Rev и BBL2\_Fwd/BBL2\_Rev (см. табл. 2) для нРНК, обозначенных BBL1 и BBL2 соответственно.

Стабильную трансформацию табака *N. tabacum* SR1 проводили методом биобаллистики. Готовили смесь из трех генетических векторов, несущих систему нРНК/Cas9, нацеленную на семейство генов *BBL*, и вектор pBII21, несущий ген устойчивости к антибиотику канамицину и ген-репортер бета-глюкуронидазы (*GUS*) *E. coli* (Chen et al., 2003). Смесь ДНК наносили на золотые частицы и доставляли в клетки листовых эксплантов табака при помощи генной пушки (Bio-Rad PDS-

1000 He, размер золотых частиц 1 мкм, разрывной диск 1100 пси ( $7,6 \times 10^6$  Pa), расстояние 6 см, вакуум при выстреле 27 мм рт. ст. ( $3,6 \times 10^3$  Pa)). Трансформированные экспланты помещали в чашки Петри на селективную каллусообразующую среду T1: стандартная среда MC с добавлением 20 г/л сахарозы, 1 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,1 мг/л нафталенуксусной кислоты и 100 мг/л канамицина. Полученные каллусы перемещали на среду T2: стандартная среда MC с добавлением 20 г/л сахарозы, 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина без канамицина для органогеиза, затем получали первичные растения-регенеранты. Трансгенность полученных каллусов и регенерантов проверяли методом гистохимического окрашивания с реактивом X-Gluc для выявления активности гена  $\beta$ -глюкуронидазы. Жизнеспособные растения высаживали в гидропонный комплекс для анализа морфологических характеристик и фертильности. Листья расте-

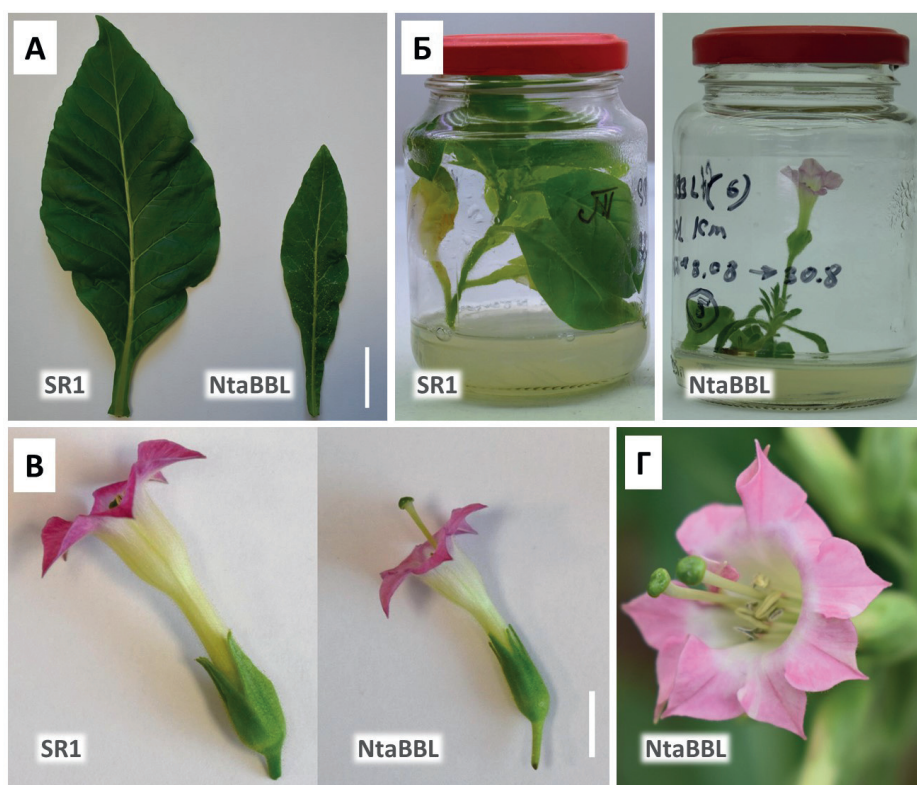
ний из гидропонного комплекса лиофильно высушивали и использовали для анализа содержания никотина. Содержание алкалоидов определяли ранее отработанным методом (Domrachev et al., 2018), позволяющим определить суммарное содержание никотина и норникотина.

Для исследования кормовой привлекательности полученных растений для колорадского жука были использованы листья из культуры *in vitro*. Было использовано три повторности по 15 личинок на каждый вариант. Личинки колорадского жука были отобраны из природно-лабораторной популяции насекомых, содержащихся на растениях картофеля в лаборатории биологической защиты растений и биотехнологий НГАУ. Срезанные листья табака помещали в пластиковую пробирку с водой объемом 1,5 мл, в которой фиксировали их ватой и пленкой Parafilm. Насекомых и листья помещали в чашки Петри. Через 24 часа учитывали смертность насекомых и площадь съеденной листовой пластинки. Площадь повреждения листа насекомыми рассчитывали в процентах от общей площади листа по фотографиям с помощью

программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Сравнение активности питания насекомых листьями табака проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (Ordinary one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) в программе GraphPad Prism 8.

## Результаты

С использованием нРНК, которая, по литературным данным, показывает высокую эффективность при мутагенезе генов семейства *BBL* (Schachtsiek, Stehle, 2019), была проведена генетическая трансформация табака и получено 7 каллусов. Из четырех каллусов не удалось получить жизнеспособные растения, из трех оставшихся были получены три популяции регенерантов (NtaBBL), общим числом 72 растения поколения T0. Популяции клонов поддерживали черенкованием *in vitro*. Данные популяции отличались друг от друга по фенотипу и демонстрировали различные аномалии развития (рис. 1).



**Рис. 1. Фенотипы растений-регенерантов (NtaBBL) поколения T0 после модификации с использованием системы Cas9/нРНК, нацеленной на гены семейства *BBL*.**

А: зрелые листья, масштабная линейка соответствует 5 см; Б: пример раннего цветения *in vitro*; В: цветок с удлинённым пестиком, масштабная линейка соответствует 1 см; Г: цветок, образовавшийся в результате слияния двух цветков. SR1 – соответствующий фенотип исходной линии.

**Fig. 1. Phenotypes of regenerated plants (NtaBBL) after modification using the Cas9/gRNA system for mutagenesis of *BBL* gene family members.**

A: mature leaves, scale bar corresponds to 5 cm; B: early flowering *in vitro*; C: flower with longostily, scale bar corresponds to 1 cm; D: flower fusion. SR1 – wild type phenotype.

**Таблица 3. Сравнительный анализ морфологических характеристик полученной линии NtaBBL5-14 и исходной линии SR1**

**Table 3. Comparison of morphological traits in BBL5-14 line and control (SR1)**

| Признак/trait                                      | BBL(5)14 | SR1     |
|----------------------------------------------------|----------|---------|
| Высота стебля, см/Stem height, cm                  | 70-125   | 100-130 |
| Количество побегов/Number of shoots                | 2-4      | 1-2     |
| Количество узлов/Number of nodes                   | 16-22    | 9-11    |
| Длина листовой пластины, см/Leaf blade length, cm  | 230-260  | 320-340 |
| Ширина листовой пластины, см/ Leaf blade width, cm | 80-91    | 100-185 |

Среди наблюдаемых отклонений отмечалось угнетение роста и укоренения, увеличение числа междоузлий, раннее цветение, аномалии развития цветка (увеличение количества элементов цветка, лонгостилия) и отсутствие семян. Растения, полученные только из одного из семи исходных каллусов, оказались достаточно жизнеспособными для стабильного поддержания *in vitro* и для роста в условиях гидропонного комплекса. Из данной популяции была выделена линия растений NtaBBL5-14, которая была охарактеризована при выращивании в гидропонном комплексе. В таблице 3 указаны диапазоны наблюдаемых морфологических параметров полученной линии. Растения этой линии, содержащиеся в культуре *in vitro*, были использованы для оценки степени потребления личинками колорадского жука. В качестве контроля были использованы исходные растения линии SR1.

Показано, что личинки колорадского жука питались

листьями табака линии NtaBBL5-14 в десять раз активнее, чем листьями табака контрольного варианта (SR1) ( $p < 0.001$ ). В частности, через 24 часа после начала эксперимента процент съеденной площади листьев табака личинками колорадского жука младших возрастов (2-3 возраста) составил  $9 \pm 3\%$  в контроле (SR1) и  $97 \pm 0.5\%$  в варианте с модификациями (NtaBBL5-14). Гибели насекомых не отмечалось в обоих вариантах. Эксперимент продемонстрировал, что листья растений T0 линии NtaBBL5-14, полученные в результате трансформации конструкциями для мутагенеза генов семейства *BBL*, пригодны для питания личинок колорадского жука и полностью съедаются в отличие от листьев исходных растений (рис. 2). При выращивании в гидропонном комплексе растения этой линии достоверно не отличались по суммарному содержанию алкалоидов от исходной линии SR1.



**Рис. 2. Потребление листьев табака личинками колорадского жука второго-третьего возраста через 24 часа после начала кормления**

А: Процент потребления листьев ( $***p < 0.001$  по сравнению с SR1). Б: Вид листьев табака через 24 часа после начала эксперимента. NtaBBL5-14 – полученная в результате модификации линия табака, SR1 – исходный генотип.

**Fig. 2. Consumption of tobacco leaves by Colorado potato beetle larvae within a 24 h period**

А: Percentage of consumed leaf area ( $***p < 0.001$ ); B: Leaves after 24 hrs of feeding experiment. NtaBBL5-14 – modified tobacco line, SR1 – wild type.

В данной работе была получена линия растений табака, пригодная для питания личинок колорадского жука. Несмотря на то, что не удалось зафиксировать достоверного снижения суммарного содержания алкалоидов в листьях полученной линии, модифицированные растения активно поедаются колорадским жуком и потенциально могут быть использованы в дальнейшем как источник корма для этих насекомых. Данный эксперимент показал возможность использования табака для создания модели взаимодействия колорадского жука и растения. Полученная линия модифицированных растений табака NtaBBL5-14 воспроизводится *in vitro* черенкованием и жизнеспособна при пересадке в сосуды с грунтом или в тепличный комплекс, однако неспособна размножаться семенами. В данной работе была использована нРНК, идентичная ранее опубликованной (Schachtsiek, Stehle, 2019), однако, полученные в результате модификации растения-регенеранты отличались сниженной жизнеспособностью и аномалиями развития, чего не было показано ранее. Единственная жизнеспособная линия растений поколения T0 не отличалась от контроля по содержанию суммы алкалоидов при выращивании в гидропонном комплексе, однако демонстрировала выраженные морфологические отличия. Таким образом, результаты, полученные в данной работе, не согласуются с ранее опубликованными, где подобная модификация влияла на содержание алкалоидов в листьях, но не на морфологические признаки растений. Можно предположить, что проводимая модификация имеет сложную природу и приводит к комплексным изменениям метаболизма и регуляции развития. Дальнейшая биохимическая и молекулярная характеристика полученных модифицированных растений табака, в том числе линии NtaBBL5-14, может дать возможность собрать новые данные как о роли отдельных копий генов семейства *BBL* в развитии растений табака, так и о биохимических особенностях растений, пригодных для питания КЖ. Поскольку данный эксперимент не позволил получить линии табака, стабильно размножающиеся семенами, авторы рассматривают возможность мутагенеза других генов метаболизма никотина у табака для создания более устойчивой модели с меньшим плейотропным эффектом. В качестве потенциальных мишеней можно рассматривать гены, кодирующие ключевые ферменты более ранних стадий биосинтеза никотина, например путресцин-N-метилтрансферазы (PMT) и хиолинатфосфорибозилтрансферазы (QPT) (Ivanova et al., 2018). Нетрансгенная, способная к воспроизводству и сохранению фенотипа линия табака, которая может служить кормом для колорадского жука, стала бы идеальной моделью для дальнейших исследований молекулярных механизмов устойчивости растений к вредителю.

*Получение модифицированных линий табака проводили при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-416-543004), исследование на колорадском жуке выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-16-00019) / Generation of modified tobacco lines was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 18-416-543004), and the Colorado potato beetle research was supported by a grant from the Russian Science Foundation (Project No. 19-16-00019).*

## References/Литература

- Alyokhin A., Baker M., Mota-Sanchez D., Dively G., Grafius E. Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *American Journal of Potato Research*. 2008;85:395-413. DOI: 10.1007/s12230-008-9052-0.
- Chen P.-Y., Wang C.-K., Soong S.-C., To K.-Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding*. 2003;11:287-293. DOI: 10.1023/A:1023475710642
- Domrachev D.V., Egorova A.A., Koloshina K.A., Gerasimova S.V. High-performance liquid chromatography method for the evaluation of alkaloids in *Solanaceae*. (Postanovka metodiki analiza soderzhaniya alkaloidov v tkanyakh nekotorykh vidov semeystva paslenovykh metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii.). In: Joint scientific event "Field Day" within the framework of the FANO of Russia "Development of Potato Breeding and Seed Production" and the scientific conference "Theoretical Foundations and Applied Research in Potato Breeding and Seed Production" (Ob'yedinennoye nauchnoye meropriyatiye "Den' polya" v ramkakh FANO Rossii "Razvitiye selektsii i semenovodstva kartofelya" i nauchnaya konferentsiya "Teoreticheskiye osnovy i prikladnyye issledovaniya v selektsii i semenovodstve kartofelya"): abstracts; 2018 August 1-5; Novosibirsk, Russia. Novosibirsk; 2018. p.15 [In Russian] (Домрачев, Д.В., Егорова, А.А., Колошина, К.А., Герасимова, С.В. Постановка методики анализа содержания алкалоидов в тканях некоторых видов семейства пасленовых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В кн.: Объединенное научное мероприятие "День поля" в рамках ФАНО России "Развитие селекции и семеноводства картофеля" и научная конференция "Теоретические основы и прикладные исследования в селекции и семеноводстве картофеля": тезисы докладов, г. Новосибирск, Россия, 1-5 августа 2018 г. Новосибирск; 2018. С.15). DOI: 10.18699/Potato-2018-11
- Fausser F., Schiml S., Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 2014;79:348-359. DOI: 10.1111/tpj.12554
- Hsiao T.H., Fraenkel G. The Role of Secondary Plant Substances in the Food Specificity of the Colorado Potato Beetle. *Annals of the Entomological Society of America*. 1968;61(2):485-493. DOI: 10.1093/aesa/61.2.485
- Ivanova K.A., Spaselikova A.V., Shumny V.K., Gerasimova S.V. The target genes for *Solanaceae* secondary metabolism engineering: evolution and genome organization. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):34-42. [In Russian] (Иванова К.А., Спаселикова А.В., Шумный В.К., Герасимова С.В. Гены-мишени для метаболической инженерии представителей семейства *Solanaceae*: эволюция и структурная организация. *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):34-42.). DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-34-42
- Kajikawa M., Shoji T., Kato A., Hashimoto T. Vacuole-Localized Berberine Bridge Enzyme-Like Proteins Are Required for a Late Step of Nicotine Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiology*. 2011;155:2010-2022. DOI: 10.1104/pp.110.170878
- Lewis R.S., Drake-Stowe K.E., Heim C., Steede T., Smith W., Dewey R.E. Genetic and Agronomic Analysis of Tobacco Genotypes Exhibiting Reduced Nicotine Accumulation Due to Induced Mutations in Berberine Bridge Like (BBL) Genes. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11. DOI: 10.3389/fpls.2020.00368
- Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Schachtsiek J., Stehle F. Nicotine-free, nontransgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) edited by CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17:2228-2230. DOI: 10.1111/pbi.13193
- Sierro N., Battey J.N.D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications*. 2014;5:3833. DOI: 10.1038/ncomms4833
- Weber D. Colorado beetle: pest on the move. *Pesticide Outlook*. 2003;14(6):256-259. DOI: 10.1039/b314847p

# 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, CRISPR/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 к изложенным материалам, авторам и их месту работы/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;  
✉ yulia\_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-o6

**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 PHK (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats in RNA, crRNA) (Brooks, 2014; Kamburova, 2017).

## Методы редактирования генома

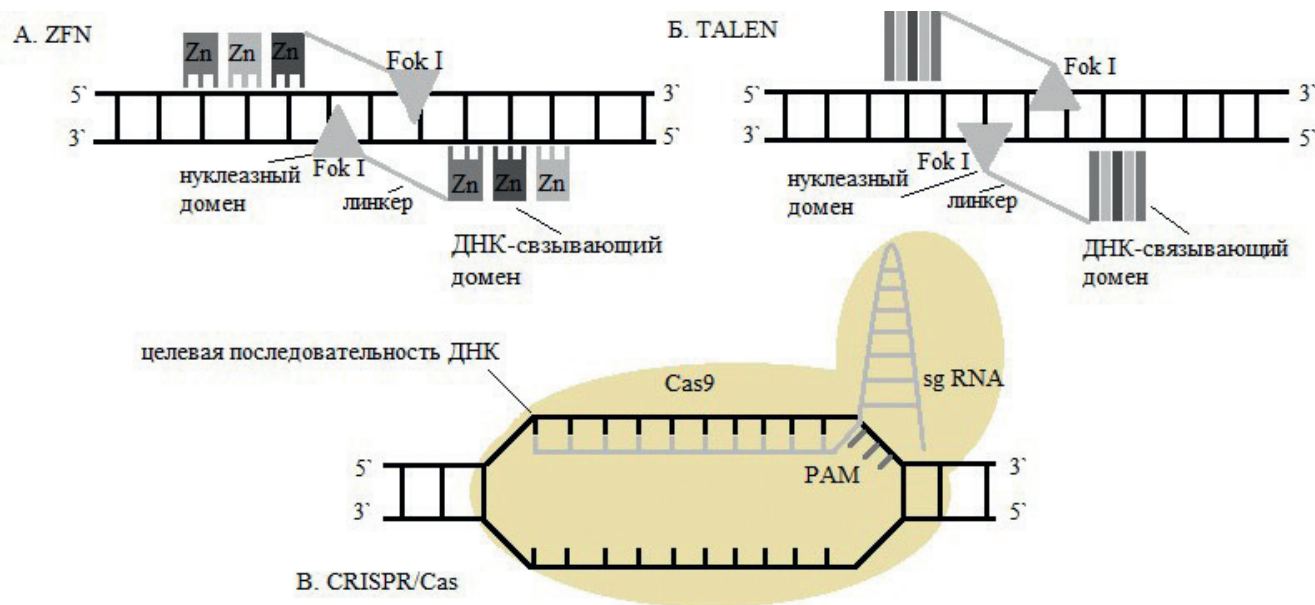
Первым поколением инструментов редактирования генома были ZFN (Shah, 2017) — белковые комплексы, содержащие в качестве направляющих структур определенный тип белковых доменов — «цинковые пальцы», которые содержат молекулу цинка и по форме напоминают палец (Рис. 1А.). Каждый из этих белковых доменов способен 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 tandemных 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 tandemных 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.**  
 А – ZFN, Б – TALEN, В – CRISPR/Cas9

**Fig. 1. Schematic representation of various complexes used for genome editing.**  
 А – ZFN, Б – TALEN, В – 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 РНК 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 РНК — 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/Cas 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/Cas9 вводят в клетки и поддерживают рост клеток

в культуре. Во втором случае плаزمида, 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 *snr* промотор остается гиперметилированным, предотвращая связывание с ним RIN. CNR вовлечен в позитивную регуляцию многих генов, связанных с созреванием, включая PG, PE (пектинэстераза), XET/XTH (ксилоглюканэндо-трансгликозилаза), PSY1 (фитоеин 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<br>Method | Ген<br>Gene                                   | Функция<br>Function      | Ссылка<br>Reference    |
|-----------------|-----------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| TALEN           | <i>PROCERA</i><br>( <i>PRO</i> )              | Метаболизм гиббереллинов | Lor et al., 2014       |
| ZFNs            | <i>LEAFY COTYLEDON1-LIKE4</i> ( <i>LIL4</i> ) | Плейотропные эффекты     | Hilioti et al., 2016   |
| CRISPR/Cas9     | <i>RIPENING-INHIBITOR</i><br>( <i>RIN</i> )   | Созревание плодов        | Ito et al., 2015, 2017 |

| Метод<br>Method | Ген<br>Gene                                                        | Функция<br>Function      | Ссылка<br>Reference |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------------------|
| CRISPR/Cas9     | <i>CNR (COLORLESS NON-RIPENING)</i><br>и <i>NOR (NON-RIPENING)</i> | Созревание плодов        | Gao et al., 2019    |
| CRISPR/Cas9     | <i>LONG-NON CODING RNA</i><br>( <i>lncRNA1459</i> )                | Созревание плодов        | Li et al., 2018     |
| CRISPR/Cas9     | <i>ORGANELLE RECOGNITION</i><br><i>MOTIF (SIORRM4)</i>             | Митохондриальная функция | Yang et al., 2017   |
| CRISPR/Cas9     | <i>PECTATE LYASE</i><br>( <i>PL</i> )                              | Сохранность плодов       | Ulusik et al., 2016 |
| CRISPR/Cas9     | <i>ALC</i>                                                         | Сохранность плодов       | Yu et al. 2017      |

Первые сообщения о редактировании генома у томатов появились в 2014 году (см. табл.). TALEN 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 *pro*-мутантов созревание плодов значительно задерживается. Таким образом, можно было бы ожидать, что созревание плодов также изменится в TALEN-индуцированных *pro*-мутантах, хотя авторами не был охарактеризован фенотип плодов (Log, 2014).

Два года спустя, в 2016 году, впервые для редактирования генома томата были использованы нуклеазы «цинковых пальцев» ZFNs для изменения гена *LEAFY COTYLEDON-LIKE4 (LIL4)*, который кодирует субъединицу гетеротримерного фактора транскрипции. Мутация в *LIL4* приводила к плеiotропному 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 (Hiloti, 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 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 популяции  $T_0$  (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 бинарный вектор, 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 плодов 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 (C-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 полигалактуроназы (PG), пектинметилэстеразы,  $\beta$ -галактаназы и экспансины 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, пекатлазы (*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 (Uluisek, 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 (*Soly03g111690*) экспрессировалась на высоком уровне во время созревания (Uluisek, 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 CRISPR/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 CRISPR/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 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: 10.1038/nbt.2650
- Uluşık 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 *SlPL*, 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/ddul25

# ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ С ИЗМЕНЁННОЙ ОКРАСКОЙ ЦВЕТКОВ

Санникова В.Ю.

Санкт-Петербургский государственный университет,  
Биологический факультет,  
199034 Россия, г. Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7–9;  
✉ st049681@student.spbu.ru

Важным направлением в цветоводстве является получение новых сортов декоративных растений, среди которых наибольшим спросом пользуются растения с необычной окраской цветков. Ранее для их получения успешно применялись традиционные программы по разведению и селекции. Однако в настоящий момент генная инженерия способна предложить альтернативный путь создания новых форм и сортов. Антоцианы, относящиеся к флавоноидам, беталаины и каротиноиды являются основными типами пигментов, которые синтезируются в растениях и отвечают за окраску лепестков цветка. Модификация путей биосинтеза пигментов с помощью методов генной инженерии позволяет добиться результатов, которые не могут быть получены при помощи традиционной селекции. В данном обзоре литературы представлены основные достижения применения методов генной инженерии в цветоводстве путём модификации окраски цветков. Существует несколько основных направлений в работе с генами биосинтеза пигментов. Среди них чаще всего используется стратегия по подавлению экспрессии генов для предотвращения синтеза пигмента или, наоборот, для устранения факторов, препятствующих развитию окраски. Нередко используется метод введения в геном растений дополнительных гетерологичных генов, недостающих в пути биосинтеза пигментов. Также для модификации окраски прибегают к геномному редактированию посредством технологии CRISPR/Cas, но данный метод в отношении декоративных растений стал использоваться относительно недавно. Несмотря на быстрое развитие биотехнологий, существуют препятствия для распространения генномодифицированных растений на мировом рынке. Преодоление ряда проблем сможет сделать производство трансгенных декоративных растений экономически более выгодным и привлекательным, чем выведение новых сортов исключительно с помощью традиционных методов селекции.

**Ключевые слова:** декоративные растения, генная инженерия, окраска цветка, агробактериальная трансформация, CRISPR/Cas, геномное редактирование.

## Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах./The authors have no financial interest in the presented materials or methods.

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/10.30901/2658-6266-2020-1-01>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы./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./No conflict of interest

## GENETIC ENGINEERING AS A WAY TO OBTAIN ORNAMENTAL PLANTS WITH A CHANGED FLOWER COLOR

Sannikova V. Yu.

St. Petersburg State University, Faculty of Biology,  
7/9, University Emb., St. Petersburg 199034, Russia;  
✉ st049681@student.spbu.ru

An important trend in the field of floriculture is the creation of new varieties of ornamental plants, among which varieties with unusual color are most in demand. To this end, traditional breeding and selection programs have been successfully applied for many years. However, currently genetic engineering is able to offer an alternative way to obtain new forms and varieties. Anthocyanins belonging to flavonoids, betalains and carotenoids are the main types of pigments that are synthesized in the plant and are responsible for the color of flower petals. The modification of pigment biosynthesis pathways using genetic engineering techniques can produce results that cannot be obtained by traditional breeding. This review presents the main advances in the application of genetic engineering techniques in floriculture using the example of flower color modification. There are several main areas of work with the genes of pigment biosynthesis. Among them, the strategy of suppressing gene expression is used most often. Expression of certain genes is suppressed to prevent pigment synthesis, or vice versa, to eliminate factors that hinder color development. The method of additional heterologous genes insertion to plants lacking them in the pathway of pigment biosynthesis is often used. Genomic editing, in particular by using the CRISPR/Cas system, is also used for color modification, but the application of this method to ornamental plants is a relatively recent innovation. Despite the rapid development of biotechnology, there are obstacles to the distribution of genetically modified plants on the world market. By addressing a number of problems, the production of transgenic ornamental plants may become economically more cost-effective and attractive than the development of new varieties exclusively through traditional breeding methods.

**Keywords:** ornamental plants, genetic engineering, flower color, Agrobacterium-mediated transformation, CRISPR/Cas, genome editing.

**Для цитирования:** Санникова В.Ю. Генная инженерия как способ получения декоративных растений с изменённой окраской цветков. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):40–45. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-01

**For citation:** Sannikova V. Yu. Genetic engineering as a way to obtain ornamental plants with a changed flower color. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):40–45. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-01

## ORCID:

Sannikova V. Yu. <https://orcid.org/0000-0003-4861-4805>

УДК 577

Поступила в редакцию: 13.01.2020

Принята к публикации: 28.03.2020

## Введение

В настоящее время декоративные растения, обладающие определённым набором признаков, широко используются для удовлетворения эстетических потребностей человека. Декоративные растения используются в озеленении, оформлении садов, парков, скверов и различных территорий, в том числе для украшения зданий и помещений. Их также используют для составления букетов, корзин и декоративных композиций. Растения с не свойственными сорту признаками пользуются большим спросом среди населения. В связи с этим растёт потребность в создании новых форм декоративных растений (Chandler, Tanaka, 2007).

Некоторые сорта разрабатываются традиционными методами с помощью гибридизации и мутагенеза. Однако данные методы могут быть применены к ограниченному числу растений. Скрещивания и отбор мутантов не подходят для стерильных сортов растений, например, орхидей (Chandler, Sanchez, 2012). Кроме того, получение новых форм некоторых растений путём традиционных методов является слишком трудным и длительным процессом (Chandler, Sanchez, 2012). Поэтому в последнее время активно развиваются методы генной инженерии, которые позволяют в относительно короткие сроки придать растению новые признаки, которые не могут быть получены при помощи селекции. В настоящее время трансформировано уже более 50 родов декоративных растений (Shibata, 2008; Boutigny et al., 2020). Чаще всего культурные растения трансформируют путём прямой регенерации побегов или соматического эмбриогенеза с использованием агробактериальной трансформации или биобаллистики (Brand, 2006).

В основном у растений стремятся изменить признаки внешнего вида, такие как форма, размер, окраска цветков, листьев, высота и диаметр стебля. Кроме внешних признаков изменяются и физиологические характеристики декоративных растений: устойчивость к абиотическим факторам среды, время цветения, аромат и многие другие (Kuligowska, Lütken, Müller, 2016). Во флористике наибольший экономический эффект дают растения с необычной окраской лепестков венчика, поэтому изменение окраски цветка является самым популярным направлением создания новых форм декоративных растений. В данном обзоре всё внимание уделяется применению технологии генетической модификации в отношении окраски лепестков венчика декоративных растений.

## Окраска цветков

Окраска цветка определяется сочетанием различных факторов: типом пигментов, копигментами, ионами металлов и вакуолярным pH. Окраска лепестков венчика в основном обусловлена тремя типами пигментов: беталаинов, каротиноидов и флавоноидов (Tanaka, Brug-

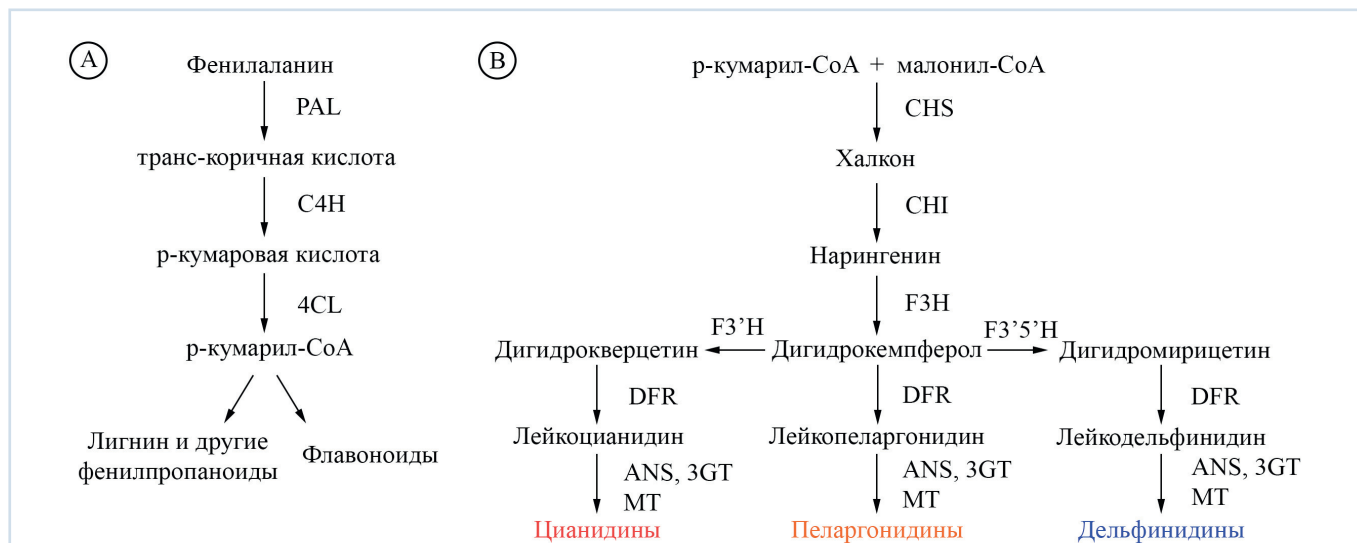
liera, 2013). Беталаины являются производными индола, они ответственны за жёлтую, оранжевую, розовую, красную окраску цветков. Антоцианы, относящиеся к группе флавоноидов (Рисунок), придают цветкам красную, синюю и фиолетовую окраску, а являющиеся производными ликопина каротиноиды – жёлтую, оранжевую и ярко-красную (Rodriguez-Amaya, 2019). В природе беталаины и антоцианы не встречаются вместе в одном растении (Delgado-Vargas, Jimenez, Paredes, Lopez, 2000). Беталаины среди высших растений обнаружены только у представителей порядка Гвоздичноцветные, например, у представителей семейств Aizoaceae и Portulacaceae, тогда как антоцианы и каротиноиды широко распространены у многих покрытосеменных видов растений (Delgado-Vargas, Jimenez, Paredes, Lopez, 2000; Stafford, 1994). Многие виды растений не имеют полной цветовой гаммы окраски цветков, что связано с отсутствием у них генов, необходимых для биосинтеза конкретного пигмента (Chandler, Brugliera, 2011). К настоящему моменту с помощью методов генной инженерии удалось модифицировать биосинтез флавоноидов (в частности антоцианов), каротиноидов и беталаинов. Существует несколько стратегий по получению новых форм растений.

## Подавление экспрессии генов

Большинство модификаций окраски цветов у трансгенных растений связано с подавлением определённого гена биосинтеза пигментов. Первой успешной модификацией окраски цветка (Krol A et al., 1988) было получение белых петуний путём введения гена антисмысловой РНК для подавления экспрессии гена, кодирующего халконсинтазу (CHS) – фермента, участвующего в биосинтезе флавоноидов. Нормальные цветки *Petunia hybrida* Vilm. имеют равномерную красную окраску, в то время как трансгенные растения в разной степени демонстрируют уменьшение пигментации: от цветков с белыми секторами до полностью белых цветков (Krol A et al., 1988). Позже с помощью подавления экспрессии гена CHS получили белую окраску цветков у *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (Courtney-Guterson et al., 1994), *Gerbera hybrida* (Elomaa et al., 1993), *Torenia fournieri* Linden ex E. Fourn. (Aida et al., 2000a).

Кроме того, на синтез антоцианов влияют гены *DFR* и *ANS*, кодирующие дигидрофлавонол - 4 -редуктазу и антоцианидинсинтазу. Так, *T. fournieri*, трансформированные антисмысловыми последовательностями генов *CHS* и *DFR*, имели белый и бледно-голубой цвет соответственно (Aida et al., 2000b). Сходным образом, трансгенные *Torenia hybrida* и *Gentiana triflora* Pall. cv. Maciry, в которых ген *ANS* был подавлен с помощью РНК-интерференции, также имели бледно-голубые цветки (Nakamura et al., 2006; Nakatsuka et al., 2008a).

Позже у растений были обнаружены белки EFP (Enhancer of Flavonoid Production), которые обеспечивают выработку достаточного количества флавоноидов (Mor-



**Рисунок. Путь биосинтеза антоцианов. (А) Общий фенилпропаноидный путь. Участвующие ферменты:** PAL – фенилаланин-аммиак-лиаза; C4H – циннамат-4-гидроксилаза; 4CL – 4-кумарат-КоА лигаза. **(В) Конкретные этапы биосинтеза антоцианов. Участвующие ферменты:** CHS – халконсинтаза; CHI – халкон изомеразы; F3H – флаванон-3-гидроксилаза, F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза, F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; ANS – антоцианидинсинтаза; 3GT – глюкозилтрансфераза; MT – метилтрансфераза (модифицировано по Delgado-Vargas et al., 2000).

**Figure. Anthocyanin biosynthesis pathway. (A) General phenylpropanoid metabolism. Enzymes involved:** PAL – phenylalanine ammonia lyase; C4H – cinnamate-4-hydroxylase; 4CL – 4-coumarate-CoA ligase. **(B) Specific steps of anthocyanin biosynthesis. Enzymes involved:** CHS – chalcone synthase; CHI – chalcone isomerase; F3H, F3'H, F3'5'H – flavonol hydroxylases; DFR – dihydroflavonol-4-reductase; ANS – anthocyanin synthase; 3GT – glucosyl transferase; MT – methyl transferase (modified according to Delgado-Vargas et al., 2000).

ita et al, 2014). Подавление экспрессии гомологов EFR в *P. hybrida* и *T. hybrida* привело к бледной окраске цветков по причине низкого уровня накопления флавоноидов в растениях.

Сообщений об изменении окраски цветков декоративных растений путём модификации биосинтеза каротиноидов известно намного меньше. Первая такая попытка была предпринята на *Ch. morifolium*. Известно, что у хризантемы белый цвет лепестков доминирует над жёлтым (Ohmiya et al., 2006). Каротиноид-расщепляющие диоксигеназы (CCD) являются ключевыми ферментами, расщепляющими каротиноиды в нормальных белых лепестках хризантемы. С помощью РНК-интерференции была подавлена экспрессия гена *CCD4a*, что привело к изменению окраски лепестков с белого на жёлтый цвет (Ohmiya et al., 2006).

### Введение дополнительных генов

Известно, что флавоноиды в цветках сильно различаются по химическому составу между разными видами и сортами растений (Scarano, Chieppa, Santino, 2018). Некоторые растения могут продуцировать определенные антоцианы, а другие нет. Таким образом, многообещаю-

щим подходом является синтез ненативных флавоноидов (особенно пигментированных антоцианов) путём введения чужеродных генов в интересующее растение. Этот подход был впервые продемонстрирован на *P. hybrida* более 30 лет назад в 1987 году (Meyer et al., 1987). Петуния не способна синтезировать пеларгонидин оранжевого цвета из-за отсутствия фермента дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR). Окраска цветка была успешно изменена с помощью сверхэкспрессии гетерологичного гена *DFR* (*At*), кодирующего дигидрофлавонол-4-редуктазу кукурузы. *DFR* кукурузы привела к образованию антоцианов типа пеларгонидина, в результате чего окраска цветков сменилась с бледно-розового на кирпичный цвет (Meyer et al., 1987).

Характер гидроксирования антоцианов значительно влияет на их окраску, количество гидроксильных групп контролируется генами *F3'H* и *F3'5'H*, продукты экспрессии которых вводят в В-кольцо дигидрокемпферола гидроксильные группы в положения 3' и 3', 5' соответственно (Khoo et al., 2017). Посредством контроля характера гидроксирования были получены коммерческие трансгенные фиолетовые розы (*Rosa hybrida*) и гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.), накапливающие антоцианы типа дельфинидинов, которые не синтезируются

естественным путём в данных растениях (Tanaka, Brugliera, 2013). В случаях гвоздики и розы для получения желаемых пигментов была необходима не только дополнительная экспрессия чужеродного гена, но также одновременное подавление нескольких эндогенных генов. У *D. caryophyllus* избыточная экспрессия одного гена *F3'5'H* была недостаточной для полного преобразования биосинтеза антоцианов в сторону дельфинидина, который придаёт цветкам синюю окраску (Nishihara, Nakatsuka, 2010). Поэтому для получения фиолетовых цветков, накапливающих дельфинидины, работали с гвоздикой, у которой отсутствовала активность эндогенного *DFR*. Белую гвоздику с дефицитом *DFR* трансформировали геном *F3'5'H* петунии или фиалки и геном *DFR* петунии, в результате чего накапливались дельфинидины, придающие фиолетовую окраску (Nishihara, Nakatsuka, 2010).

В случае с *R. hybrida* (Katsumoto et al., 2007) экспрессию эндогенного гена *DFR* подавили с помощью РНК-интерференции. Кроме того, ввели ген фиалки (*Viola × wittrockiana*), кодирующий фермент *F3'5'H*, и ген *DFR Iris × hollandica* для синтеза дельфинидина. При этом чтобы ферменты *F3'5'H* фиалки и *F3'H* розы не конкурировали друг с другом за субстрат – предшественника дельфинидина, для создания голубой розы был выбран генотип с отсутствием активности эндогенного гена *F3'H* (Katsumoto et al., 2007). Сходным образом были получены *Ch. morifolium* (Brugliera et al., 2013; Noda et al., 2017), *Petunia grandiflora* (Qi et al., 2013).

Одним важным фактором для регуляции генов является выбор промотора. В большинстве случаев в создании трансгенных растений использовался промотор 35S (CaMV 35S) вируса мозаики цветной капусты. Однако CaMV 35S не функционирует у некоторых культур, таких как горечавка и хризантема; поэтому для таких растений должны использоваться другие промоторы. (Nishihara, Nakatsuka, 2011)

Примером преобразования биосинтеза каротиноидов является изменение окраски цветка у *Lotus japonicus* L. Путём агробактериальной трансформации в растения был введён ген *crtW* бактерии *Agrobacterium aurantiacum*, который кодирует β-каротин-кетотазу, участвующую в синтезе каротиноидов розового и красного цвета. В результате у трансгенных линий растений характерный для дикого типа светло-жёлтый цвет лепестков изменился на темно-жёлтый – оранжевый цвет (Suzuki et al., 2007).

Единственное сообщение об успешном изменении окраски венчика цветка декоративного растения с помощью модификации пути биосинтеза беталаинов было сделано в 2017. Белый сорт петунии (*Petunia × hybrida* cv. Mitchell) был трансформирован вектором pX11, содержащим гены *DODA1*, *CYP76AD1* от *Beta vulgaris* L. и *cDOPA5GT* от *Mirabilis jalapa* L. После трансформации петунии демонстрировали бледно-фиолетовый цвет лепестков. LC-MS анализ лепестков подтвердил наличие бетанина и изобетанина в качестве основных продуцируемых беталаинов (Polturak et al., 2019).

## Факторы транскрипции и редактирование генома

Молекулярные исследования показывают, что пути биосинтеза пигментов регулируются на уровне транскрипции (Nishihara, Nakatsuka, 2010). Из трёх основных пигментов хорошо изучен биосинтез флавоноидов, и известно, что три фактора транскрипции, такие как R2R3-MYB, bHLH и WD40 (WDR), участвуют в регуляции генов биосинтеза флавоноидов (Quattrocchio et al., 2006). Эти факторы транскрипции образуют комплексы и активируют различные гены биосинтеза флавоноидов в растениях (Albert et al., 2014). В настоящее время ещё не было выявлено ни одного ключевого транскрипционного фактора, участвующего в биосинтезе каротиноидов и беталаинов (Nishihara, Nakatsuka, 2010).

Были получены петунии, которых трансформировали с помощью гена *Lc* кукурузы, кодирующего регуляторный фактор bHLH биосинтеза антоцианов. За счёт сверхэкспрессии гена *Lc* у *Zea mays* L. под промотором CaMV 35S все стадии биосинтеза антоцианов были интенсифицированы, трансгенные растения проявляли сильную пигментацию, как в вегетативных, так и в генеративных тканях (Bradley et al., 2002). Было показано, что транскрипционные факторы R2R3-MYB также регулируют пигментацию таких растений как *Ipomoea nil* (L.) Roth (Morita et al., 2006), *G. triflora* cv. Maciry (Nakatsuka et al., 2008b), *Antirrhinum majus* L. (Schwinn et al., 2006), лилии (*Lilium* spp.) 'Montreux' (Yamagishi et al., 2010), *R. hybrida* (Lin-Wang et al., 2010), *Petunia axillaris* × (*P. axillaris* × *P. hybrida* cv. 'Rose of Heaven'; Cornu and Farcy, 1981) и *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinnars (Schwinn et al., 2014).

Современные технологии редактирования генома позволяют вносить мутации в почти любую целевую геномную последовательность при правильном выборе метода. Подобно тому, как у трансгенных растений может наследоваться трансген, растения с отредактированным геномом, могут передавать введённую мутацию своему потомству (Kishi-Kaboshi, Aida, Sasaki, 2018).

Первое изменение окраски лепестков данным методом было проведено на *I. nil*. С помощью технологии CRISPR/Cas9 через агробактериальную трансформацию удалось изменить окраску цветов и стеблей растений путём генерации мутаций в гене *DFR-B*, который отвечает за синтез антоцианов (Watanabe et al., 2018). Полученные мутантные растения имели белые, а не фиолетовые цветы. Кроме того, были получены химерные растения с промежуточной окраской цветка, но количество химерных растений было мало. После данного исследования последовало получение новых форм *I. nil* через CRISPR/Cas9-направленный нокаут гена *CCD4*, кодирующего CCD, за счёт чего лепестки растений приобрели бледно-жёлтую окраску в результате накопления каротиноидов (Watanabe et al., 2018). Изменение окраски цветков с помощью CRISPR/Cas9 также удалось осуществить на *T. fournieri* (Nishihara et al., 2018) путём введения мутаций в ген *F3H*.

Технология позволила получить бледно-голубые (почти белые) цветки торении с высокой частотой (около 80% регенерированных линий).

## Перспективы и будущие направления

Несколько лет назад Джим Данвелл (Dunwell, 1999) предсказал, что генномодифицированные декоративные растения будут широко распространены к 2020 году. Однако в настоящее время по-прежнему существует ряд проблем, препятствующих распространению коммерческих сортов ГМ растений на рынке.

Получение разрешения на культивирование и распространение ГМ декоративных растений – сложный, длительный и дорогостоящий процесс, который делает разработку новых сортов, по словам Добрес, «непривлекательной с точки зрения бизнеса» (Dobres, 2008. Р. 13). Если затраты на одобрение ГМ растений сократятся, на рынке появится больше возможностей для использования трансгенных декоративных растений. В настоящее время ГМ декоративными растениями, которые могут использоваться в розничной торговле, являются розы и гвоздики (Chandler, Brugliera, 2011). Компания Florigene Flowers является производителем различных сортов гвоздики широкого спектра оттенков фиолетового. Розы с синими оттенками появились благодаря совместной работе компаний Florigene и Suntory (Noda, 2018).

Ещё одной важной проблемой является трудоёмкость и низкая эффективность трансформации в отношении некоторых видов растений. Так, однодольные растения обладают низкой чувствительностью к агробактериальной инфекции, а древесные растения характеризуются низкой частотой трансформации и трудностями, связанными с регенерацией (Chandler, Sanchez, 2012). Поскольку трансформация сильно зависит от вида растения, необходимо разработать более эффективные системы трансформации, которые будут подходить для большого числа видов и сортов.

## Заключение

В обзоре описаны некоторые удачные примеры модификации окраски цветков декоративных растений с помощью различных стратегий, таких как подавление экспрессии эндогенных генов, введение дополнительных генов, отвечающих за биосинтез пигментов, непосредственное редактирование генома, регуляция факторов транскрипции и сочетание данных методов. За последние годы технологии создания новых форм растений значительно улучшились. В самых ранних исследованиях для изменения окраски цветка работа велась с одним единственным геном растения, в то время как более поздние эксперименты позволили модифицировать сложные пути биосинтеза пигментов с помощью регуляции одновременно несколь-

ко генов.

Несмотря на существующие проблемы ГМ растений по распространению на рынке, трансгенный подход в ряде случаев является единственной возможностью для создания многих ранее недостижимых оттенков цветков. Благодаря совершенствованию методов генной инженерии получение новых форм и сортов может представлять не только научный интерес, но и экономическую выгоду для производителей декоративных растений.

*Обзор подготовлен в рамках магистерской программы «Молекулярная биология и агробиотехнология растений» биологического факультета СПбГУ. Особую благодарность автор выражает д.б.н. Матвеевой Татьяне Валерьевне за предложенную тему обзора и ценные замечания / The review was prepared as part of the master degree program in Molecular Biology and Plant Agrobiotechnology of the Faculty of Biology of St. Petersburg State University. The author expresses special gratitude to Dr. Biol. Sci. Tatiana V. Matveeva for the proposed topic of the review and valuable comments.*

## References/Литература

- Aida R., Kishimoto S., Tanaka Y., Shibata M. Modification of flower color in torenia (*Torenia fournieri* Lind.) by genetic transformation. *Plant Science*. 2000a;151(1):33-42. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00239-3
- Aida R., Yoshida K., Kondo T., Kishimoto S., Shibata M. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic torenia plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene. *Plant Science*. 2000b;160(1):49-56. DOI: 10.1016/S0168-9452(00)00364-2
- Albert N.W., Davies K.M., Lewis D.H., Zhang H., Montefiori M., Brendolise C., Boase M.R., Ngo H., Jameson P.E., Schwinck K.E. A conserved network of transcriptional activators and repressors regulates anthocyanin pigmentation in eudicots. *The Plant Cell*. 2014;26(3):962-80. DOI: 10.1105/tpc
- Boutigny A.L., Dohin N., Pomin D., Rolland M. Overview and detectability of the genetic modifications in ornamental plants. *Horticulture Research*. 2020;7:11. DOI: 10.1038/s41438-019-0232-5
- Bradley J., Davies K., Dolores S., Bloor S., Lewis D. The maize *Lc* regulatory gene up regulates the flavonoid biosynthetic pathway of *Petunia*. *The Plant Journal*. 2002;13(3):381-392. DOI: 10.1046/j.1365-3113.1998.00031.x
- Brand M.H. Ornamental Plant Transformation. *Journal of Crop Improvement*. 2006;17(1):27-50. DOI: 10.1300/J411v17n01\_02
- Brugliera F., Tao G.Q., Tams U., Kalc G., Mouradova E., Price K., Stevenson K., Nakamura N., Stacey I., Katsumoto Y., Tanaka Y., Mason J.G. Violet/blue chrysanthemums--metabolic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway results in novel petal colors. *Plant and Cell Physiology*. 2013;54(10):1696-1710. DOI: 10.1093/pcp/ptt110
- Chandler S.F., Brugliera F. Genetic modification in floriculture. *Biotechnology Letters*. 2011;33(2):207-214. DOI: 10.1007/s10529-010-0424-4
- Chandler S.F., Sanchez C. Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnology Journal*. 2012;10(8):891-903. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00693.x
- Chandler S.F., Tanaka Y. Genetic Modification in Floriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2007;26(4):169-197. DOI: 10.1080/07352680701429381
- Courtney-Gutterson N., Napoli C., Lemieux C., Morgan A., Firoozabady E., Robinson K.E. Modification of flower color in florist's chrysanthemum: production of a white-flowering variety through molecular genetics. *Biotechnology*. 1994;12(3):268-271. DOI: 10.1038/nbt0394-268

- Delgado-Vargas F., Jimenez A.R., Paredes-Lopez O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000;40(3):173-289. DOI: 10.1080/10408690091189257
- Dobres M. Barriers to Genetically Engineered Ornamentals: An Industry Perspective. In: J.A.T. da Silva (ed.). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues*, Volume V. London: Global Science Books; 2008. p.1-14.
- Dunwell J. Transgenic Crops: The Next Generation, or an Example of 2020 Vision. *Annals of Botany*. 1999;84(3):269-277. DOI: 10.1006/anbo.1999.0934
- Elomaa P., Honkanen J., Puska R., Seppänen P., Helariutta Y., Mehto M., Kotilainen M., Nevalainen L., Teeri T.H. *Agrobacterium*-Mediated Transfer of Antisense Chalcone Synthase cDNA to *Gerbera hybrida* Inhibits Flower Pigmentation. *Biotechnology*. 1993;11:508-511. DOI: 10.1038/nbt0493-508
- Katsumoto Y., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Brugliera F., Holton T.A., Karan M., Nakamura N., Yonekura-Sakakibara K., Togami J., Pigeaire A., Tao G.Q., Nehra N.S., Lu C.Y., Dyson B.K., Tsuda S., Ashikari T., Kusumi T., Mason J.G., Tanaka Y. Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating. *Plant and Cell Physiology*. 2007;48(11):1589-1600. DOI: 10.1093/pcp/pcm131
- Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., Lim S.M. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*. 2017;61(1):1361779. DOI: 10.1080/16546628.2017.1361779
- Kishi-Kaboshi M., Aida R., Sasaki K. Genome engineering in ornamental plants: Current status and future prospects. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018;131:47-52. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.03.015
- Krol A., Lenting P., Veenstra J., Meer I., Koes R., Gerats A., Mol J., Stuitje A. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature*. 1998;333:866-869. DOI: 10.1038/333866a0
- Kuligowska K., Lutken H., Muller R. Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta*. 2016;244(1):1-17. DOI: 10.1007/s00425-016-2493-7
- Lin-Wang K., Bolitho K., Grafton K., Kortstee A., Karunairetnam S., McGhie T.K., Espley R.V., Hellens R.P., Allan A.C. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. *BMC Plant Biology*. 2010;10:50. DOI: 10.1186/1471-2229-10-50
- Meyer P., Heidmann I., Forkmann G., Saedler H. A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*. 1987;330(6149):677-678. DOI: 10.1038/330677a0
- Morita Y., Saitoh M., Hoshino A., Nitasaka E., Iida S. Isolation of cDNAs for R2R3-MYB, bHLH and WDR Transcriptional Regulators and Identification of c and ca Mutations Conferring White Flowers in the Japanese Morning Glory. *Plant and Cell Physiology*. 2006;47(4):457-470. DOI: 10.1093/pcp/pcj012
- Morita Y., Takagi K., Fukuchi-Mizutani M., Ishiguro K., Tanaka Y., Nitasaka E., Nakayama M., Saito N., Kagami T., Hoshino A., Iida S. A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. *The Plant Journal*. 2014;78(2):294-304. DOI: 10.1111/tj.12469
- Nakamura N., Fukuchi-Mizutani M., Miyazaki K., Suzuki K., Tanaka Y. RNAi suppression of the anthocyanidin synthase gene in *Torenia hybrida* yields white flowers with higher frequency and better stability than antisense and sense suppression. *Plant Biotechnology*. 2006;23(1):13-17. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.23.13
- Nakatsuka T., Mishiba K., Abe Y., Kubota A., Kakizaki Y., Yamamura S., Nishihara M. Flower color modification of gentian plants by RNAi-mediated gene silencing. *Plant Biotechnology*. 2008a;25(1):61-68. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.25.61
- Nakatsuka T., Haruta K.S., Pitakutheepong C., Abe Y., Kakizaki Y., Yamamoto K., Shimada N., Yamamura S., Nishihara M. Identification and characterization of R2R3-MYB and bHLH transcription factors regulating anthocyanin biosynthesis in gentian flowers. *Plant and Cell Physiology*. 2008b;49(12):1818-1829. DOI: 10.1093/pcp/pcn163
- Nishihara M., Higuchi A., Watanabe A., Tasaki K. Application of the CRISPR/Cas9 system for modification of flower color in *Torenia fournieri*. *BMC Plant Biology*. 2018;18(1):331. DOI: 10.1186/s12870-018-1539-3
- Nishihara M., Nakatsuka T. Genetic engineering of novel flower colors in floricultural plants: recent advances via transgenic approaches. *Methods in Molecular Biology*. 2010;589:325-347. DOI: 10.1007/978-1-60327-114-1\_29
- Nishihara M., Nakatsuka T. Genetic engineering of flavonoid pigments to modify flower color in floricultural plants. *Biotechnology Letters*. 2011;33(3):433-441. DOI: 10.1007/s10529-010-0461-z
- Noda N. Recent advances in the research and development of blue flowers. *Breeding Science*. 2018;68:79-87. DOI: 10.1270/jsbbs.17132
- Noda N., Yoshioka S., Kishimoto S., Nakayama M., Douzono M., Tanaka Y., Aida R. Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Science Advances*. 2017;3(7):e1602785. DOI: 10.1126/sciadv.1602785
- Ohmiya A., Kishimoto S., Aida R., Yoshioka S., Sumitomo K. Carotenoid cleavage dioxygenase (CmCCD4a) contributes to white color formation in chrysanthemum petals. *Plant Physiology*. 2016;142(3):1193-1201. DOI: 10.1104/pp.106.087130
- Polturak G., Grossman N., Vela-Corcia D., Dong Y., Nudel A., Pliner M., Levy M., Rogachev I., Aharoni A. Engineered gray mold resistance, antioxidant capacity, and pigmentation in betalain-producing crops and ornamentals. *PNAS*. 2017;114(34):9062-9067. DOI: 10.1073/pnas.1707176114
- Qi Y., Lou Q., Quan Y., Liu Y., Wang Y. Flower-specific expression of the *Phalaenopsis* flavonoid 3', 5'-hydroxylase modifies flower color pigmentation in *Petunia* and *Lilium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2013;115:263-273 DOI: 10.1007/s11240-013-0359-2
- Quattrocchio F., Baudry A., Lepiniec L., Grotewold E. The Regulation of Flavonoid Biosynthesis. In: Grotewold E. (eds) *The Science of Flavonoids*. New York: Springer; 2006. p. 97-122. DOI: 10.1007/978-0-387-28822-2\_4
- Rodriguez-Amaya D.B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*. 2019;124:200-205. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.05.028
- Scarano A., Chieppa M., Santino A. Looking at Flavonoid Biodiversity in Horticultural Crops: A Colored Mine with Nutritional Benefits. *Plants (Basel)*. 2018;7(4):98. DOI: 10.3390/plants7040098
- Schwinn K.E., Boase M.R., Bradley J.M., Lewis D.H., Deroles S.C., Martin C.R., Davies K.M. MYB and bHLH transcription factor transgenes increase anthocyanin pigmentation in petunia and lisianthus plants, and the petunia phenotypes are strongly enhanced under field conditions. *Frontiers in Plant Science*. 2014;5:603. DOI: 10.3389/fpls.2014.00603
- Schwinn K., Venail J., Shang Y., Mackay S., Alm V., Butelli E., Oyama R., Bailey P., Davies K., Martin C. A small family of MYB-regulatory genes controls floral pigmentation intensity and patterning in the genus *Antirrhinum*. *The Plant Cell*. 2006;18(4):831-851. DOI: 10.1105/tpc.105.039255
- Shibata M. Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding. *Plant Biotechnology*. 2008;25(1):3-8. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.25.3
- Suzuki S., Nishihara M., Nakatsuka T., Misawa N., Ogiwara I., Yamamura S. Flower color alteration in *Lotus japonicus* by modification of the carotenoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Reports*. 2007;26(7):951-959. DOI: 10.1007/s00299-006-0302-7
- Stafford H.A. Anthocyanins and betalains: evolution of the mutually exclusive pathways. *Plant Science*. 1994;101(2):91-98. DOI: 10.1016/0168-9452(94)90244-5
- Tanaka Y., Brugliera F. Flower color and cytochromes P450. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013;368(1612):20120432. DOI: 10.1098/rstb.2012.0432
- Watanabe K., Oda-Yamamizo C., Sage-Ono K., Ohmiya A., Ono M. Alteration of flower color in *Ipomoea nil* through CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of carotenoid cleavage dioxygenase 4. *Transgenic Research*. 2018;27(1):25-38. DOI: 10.1007/s11248-017-0051-0
- Yamagishi M., Shimoyamada Y., Nakatsuka T., Masuda K. Two R2R3-MYB genes, homologs of *Petunia* AN2, regulate anthocyanin biosyntheses in flower tepals, tepal spots and leaves of asiatic hybrid lily. *Plant and Cell Physiology*. 2010;51(3):463-474. DOI: 10.1093/pcp/pcq011

# РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ ПШЕНИЦЫ, ЯЧМЕНЯ И КУКУРУЗЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

Стрыгина К.В.<sup>1\*</sup>, Хлесткина Е.К.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44; ✉ \*k.strygina@vir.nw.ru

<sup>2</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 630090 Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10

Точное редактирование генов растительных организмов, обладающих сложными геномами, долгое время оставалось трудной задачей. Технология CRISPR/Cas, разработанная в последнее десятилетие, стала одним из наиболее предпочтительных инструментов для сайт-направленного мутагенеза генов растений и быстро заменила системы ZFN и TALEN. Однако, несмотря на то, что система CRISPR/Cas показала себя как эффективный инструмент модификации генома диплоидных видов, её применение для таких организмов, как злаки, обладающих сложными и, в случае мягкой пшеницы, полиплоидными геномами, осложняется рядом препятствий. В данном обзоре собраны основные результаты, полученные при использовании системы CRISPR/Cas на хозяйственно ценных злаках – мягкой пшенице *Triticum aestivum* L., ячмене *Hordeum vulgare* L. и кукурузе *Zea mays* L., структура генома которых увеличивает вероятность появления нецелевых мутаций и снижает специфичность редактирования. С каждым годом количество методических публикаций по направленному мутагенезу данных культур, нацеленных на оптимизацию и улучшение работы системы CRISPR/Cas, экспоненциально увеличивается, а эффективность редактирования достигает 100% для кукурузы и ячменя. Экспериментальные статьи, главным образом, направлены на улучшение хозяйственно ценных признаков растений, таких как повышение урожайности, питательной ценности и появление устойчивости к заболеваниям и гербицидам. Улучшение растений также связано с редактированием генов, влияющих на контроль опыления, который используется в гибридной селекции. Это создаёт предпосылки к созданию новых селекционных форм и к насыщению уже имеющихся сортов кукурузы, ячменя и пшеницы необходимыми свойствами.

**Ключевые слова:** геномное редактирование, *Hordeum*, *Triticum*, *Zea*, качество зерна, мужская стерильность, направленный мутагенез, период покоя семян, повышение урожайности, устойчивость к болезням.

## Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

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

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-o2>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы./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/No conflict of interest

## WHEAT, BARLEY AND MAIZE GENES EDITING USING THE CRISPR/Cas SYSTEM

Strygina K. V.<sup>1\*</sup>, Khlestkina E. K.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia;

✉ \*k.strygina@vir.nw.ru

<sup>2</sup> Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 10 Acad. Lavrentyeva Ave., Novosibirsk 630090, Russia.

Precise editing of the genes of plant organisms with complex genomes has long been a difficult task. The CRISPR/Cas technology developed in the last decade has become one of the preferred tools for site-directed mutagenesis of plant genes and has quickly replaced the ZFN and TALEN systems. However, while the CRISPR/Cas system has proven to be an effective tool for modifying the genome of diploid species, its application to organisms such as cereals with complex and, in the case of common wheat, polyploid genomes is complicated by a number of obstacles. This review summarizes the main results obtained using the CRISPR/Cas system in such economically valuable cereals as common wheat *Triticum aestivum* L., barley *Hordeum vulgare* L., and maize *Zea mays* L., the genome structure of which increases the probability of the emergence of non-target mutations and reduces the specificity of editing. Every year the number of methodological publications on the directed mutagenesis of these crops, aimed at optimizing and improving the performance of the CRISPR/Cas system, increases exponentially, and the editing efficiency reaches 100% for maize and barley. The experimental articles are mainly aimed at improving the economically important traits of plants, such as improved yields, nutritional value and resistance to diseases and herbicides. Plant improvement is also associated with editing genes that affect pollination control, which is used in hybrid breeding. This creates the prerequisites for the creation of new maize, barley and wheat varieties, and for the saturation of existing ones with the necessary properties.

**Key words:** genome editing, *Hordeum*, *Triticum*, *Zea*, grain quality, male sterility, targeted mutagenesis, seed dormancy, yield increase, disease resistance.

**Для цитирования:** Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Редактирование генов пшеницы, ячменя и кукурузы с использованием системы CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):46-56. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o2

**For citation:** Strygina K. V., Khlestkina E. K. Wheat, barley and maize genes editing using the CRISPR/Cas system. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):46-56. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o2

## ORCID:

Strygina K. V. <https://orcid.org/0000-0001-6938-1348>

Khlestkina E. K. <https://orcid.org/0000-0002-8470-8254>

УДК 575.852:577.214

Поступила в редакцию: 25.03.2020

Принята к публикации: 24.04.2020

## Введение

Путь создания новых высокоурожайных, адаптированных к определённым условиям окружающей среды сортов культурных растений предполагает сочетание в одном генотипе нужных аллельных вариантов хозяйственно ценных признаков для конкретной зоны возделывания данной культуры. В основе этого трудоёмкого, многостадийного и длительного процесса лежит использование естественных механизмов клетки, связанных с рекомбинацией гомологичных хромосом, а также искусственный отбор (Becker, 1993; Khlestkina, Shumny, 2016). Начиная с 1950-х гг. в селекции стали активно применяться методы мутагенеза при использовании химических мутагенов и ионизирующего излучения, что позволяло индуцировать случайные мутации, и среди множества растений с изменённым генотипом отбирать растения, превосходящие исходный сорт по тому или иному признаку. Полученные мутанты использовали в качестве исходного материала для селекции. Так, например, был получен сорт пшеницы мягкой *Triticum aestivum* L., посевами которого в своё время было занято несколько млн. га, – Новосибирская-67, высокоурожайный сорт с отличными хлебопекарными свойствами (Cherny et al., 1975). Другим примером являются высокоурожайные и короткостебельные сорта ячменя Diamant и Golden Promise, которые внесли очень большой вклад в Европейское сельское хозяйство и активно использовались в селекции во всём мире.

Секвенирование геномов культурных растений в последние два десятилетия, идентификация и описание первичной структуры генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки, открыло возможность применения сайт-направленного мутагенеза – то есть позволило в отличие от случайного мутагенеза действовать с «ювелирной» точностью и вносить различные заданные изменения в геном от внесения длинной последовательности ДНК чужеродного происхождения вплоть до замены или удаления одного нуклеотида в конкретной позиции генома. Такого результата позволяют достичь технологии генетического редактирования, результат их применения – создание генотипов, которые приобрели новые свойства или избавлены от нежелательных признаков (Korotkova et al., 2017, 2019).

Первые системы генетического редактирования основаны на использовании нуклеаз с цинковыми пальцами (zinc finger nucleases, ZFN) и эффекторных нуклеаз, подобных активаторам транскрипции (transcription activator-like effector nuclease, TALEN).

Данные нуклеазы состоят из специфичных для нуклеотидной последовательности модулей связывания ДНК, соединённых с неспецифическим модулем расщепления ДНК, создающим двуцепочечные разрывы в сайтах-мишенях, которые восстанавливаются посредством работы естественных систем репарации клетки (Gaj et al., 2013; Shan et al., 2014; Ali et al., 2015; Belhaj et al., 2015; Bortesi,

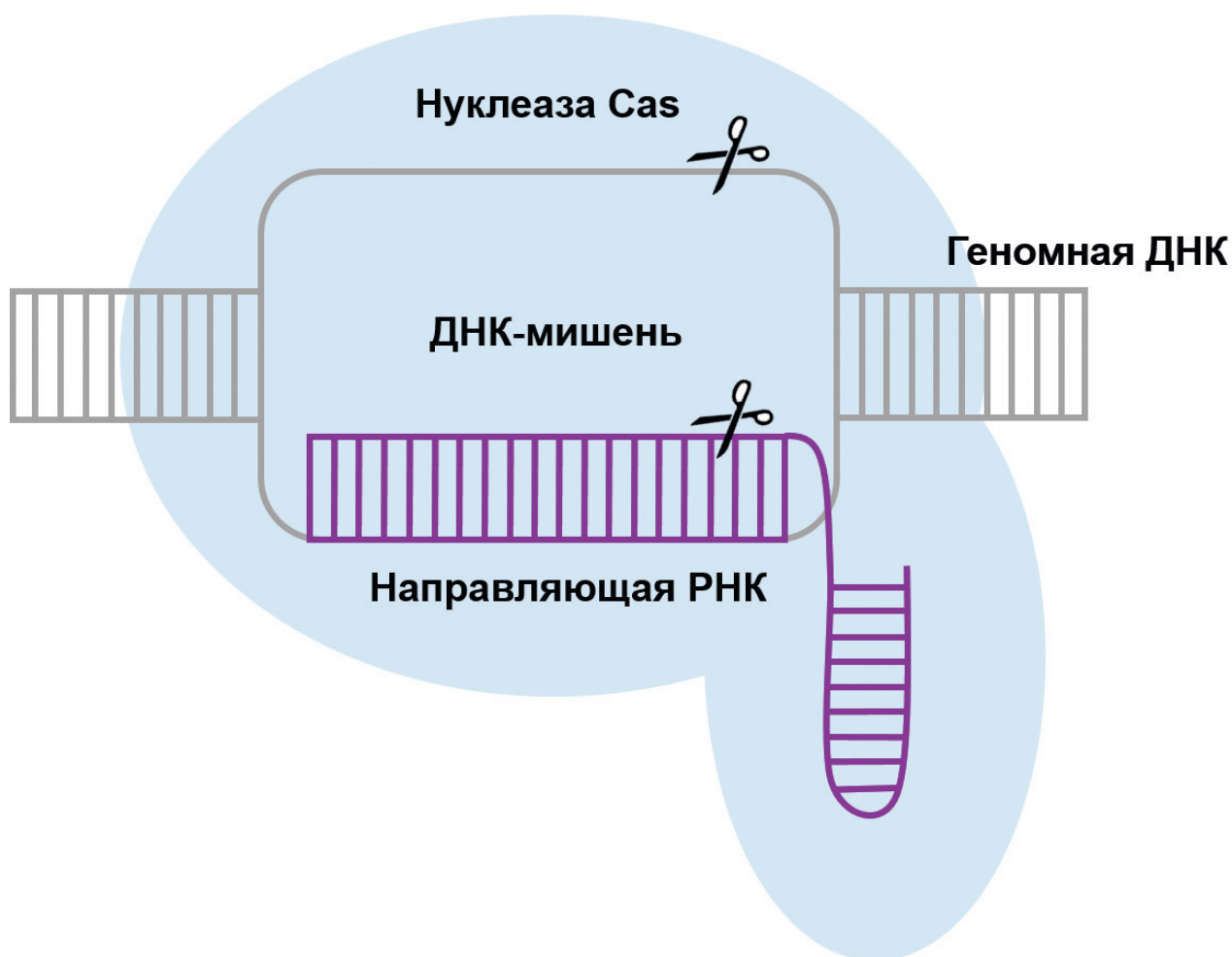
Fischer, 2015). Использование систем ZFN и TALEN требует применения методов белковой инженерии. На смену этим трудоёмким и дорогостоящим подходам в 2013 году пришла система CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein), которая отличается большей доступностью, а по точности и эффективности не уступает предыдущим системам (Upadhyay et al., 2013; Doudna, Charpentier, 2014; Belhaj et al., 2015; Jaganathan et al., 2018). Основу данной системы составляют направляющая РНК (нРНК, состоящая примерно из 20 нуклеотидов, комплементарных последовательности в целевом гене), которая связывается с ДНК-мишенью, и нуклеаза Cas, которая расщепляет ДНК в позиции, следующей после мотива PAM (protospacer adjacent motif, PAM; обычно 5'NGG) (Рис. 1) (Jinek et al., 2012).

После того, как система CRISPR/Cas вносит двуцепочечный разрыв, происходит репарация по механизму нехомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ) или гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR). Во время репарации путём NHEJ может возникнуть потеря небольшого участка ДНК, что может привести к сдвигу рамки считывания; при HDR возможна вставка участка ДНК, гомологичного на концах участку, содержащему двуцепочечный разрыв. Таким образом, система CRISPR/Cas представляет универсальный инструмент для редактирования генома, с которым возможно изменить последовательность целевого гена или добавить в геном организма новую последовательность; при этом система может быть нацелена как на один, так и на несколько генов (Doudna, Charpentier, 2014; Belhaj et al., 2015; Gerasimova et al., 2017).

Первые применения системы CRISPR/Cas на однодольных и двудольных растениях были описаны в 2013 году (Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013). Наследование индуцированных мутаций впервые было продемонстрировано на арабидопсисе *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. и рисе *Oryza sativa* L. (Feng et al., 2014; Zhang et al., 2014; Zhou et al., 2014).

Но несмотря на то, что редактирование генома через систему CRISPR/Cas имеет значительные преимущества, есть ряд факторов, которые могут на настоящем этапе развития этой технологии затруднять применение системы для некоторых видов растений. Хозяйственно ценные культуры, таких как злаки (семейство Poaceae), обладают сложными, часто полиплоидными геномами. Такая структура генома и в особенности наличие многократных копий «похожих» генов увеличивает вероятность нецелевых мутаций и снижает специфичность редактирования (Peng et al., 2016; Kim et al., 2018).

Среди всех возделываемых культур наиболее масштабное применение технологии CRISPR/Cas наблюдается на модельном злаке рисе *O. sativa* (2n = 24) (Khlestkina, 2019). Рис обладает диплоидным геномом размером около 0,5 Gb, что делает его компактным по сравне-



**Рис. 1. Система CRISPR/Cas. Серым цветом обозначена геномная ДНК, голубым – нуклеаза Cas, фиолетовым – направляющая РНК. Пояснения даны в тексте.**

**Fig. 1. CRISPR/Cas system. Genomic DNA is indicated in gray, Cas nuclease in blue, guide RNA in purple. Explanations are given in the text.**

нию с крупными геномами других модельных злаков: кукурузы *Zea mays* L. (2,4 Gb,  $2n = 40$ ), мягкой пшеницы *T. aestivum* (17 Gb,  $2n = 6x = 42$ ) и ячменя *Hordeum vulgare* L. (5 Gb,  $2n = 14$ ). Помимо этого, геном пшеницы *T. aestivum* характеризуется сложной аллогексаплоидной структурой, состоящей из трёх разных субгеномов А, В и D. Каждый субгеном эквивалентен геному диплоидного растения, редактирование которого может привести к гомозиготным, гетерозиготным или химерным мутантам (Zhang et al., 2019b).

Но несмотря на это, на ячмене, пшенице и кукурузе было продемонстрировано успешное применение системы CRISPR/Cas (Upadhyay et al., 2013; Xing et al., 2014; Lawrenson et al., 2015). К настоящему моменту количе-

ство экспериментальных и методических публикаций по геномному редактированию данных культур с использованием CRISPR/Cas с каждым годом экспоненциально увеличивается (Рис. 2, Таблица), а эффективность редактирования кукурузы и ячменя достигает очень высоких частот – мутации обнаруживаются почти у 100% редактированных растений (Feng et al., 2016; Zhu et al., 2016; Gasparis et al., 2018; Kumar et al., 2018; Lee et al., 2019; Malzahn et al., 2019). Напротив, эффективность генетического редактирования пшеницы намного ниже и достигает в лучшем случае чуть более 50% (Zhang et al., 2018). Это делает гексаплоидный геном пшеницы важным объектом для оптимизации системы редактирования генома.

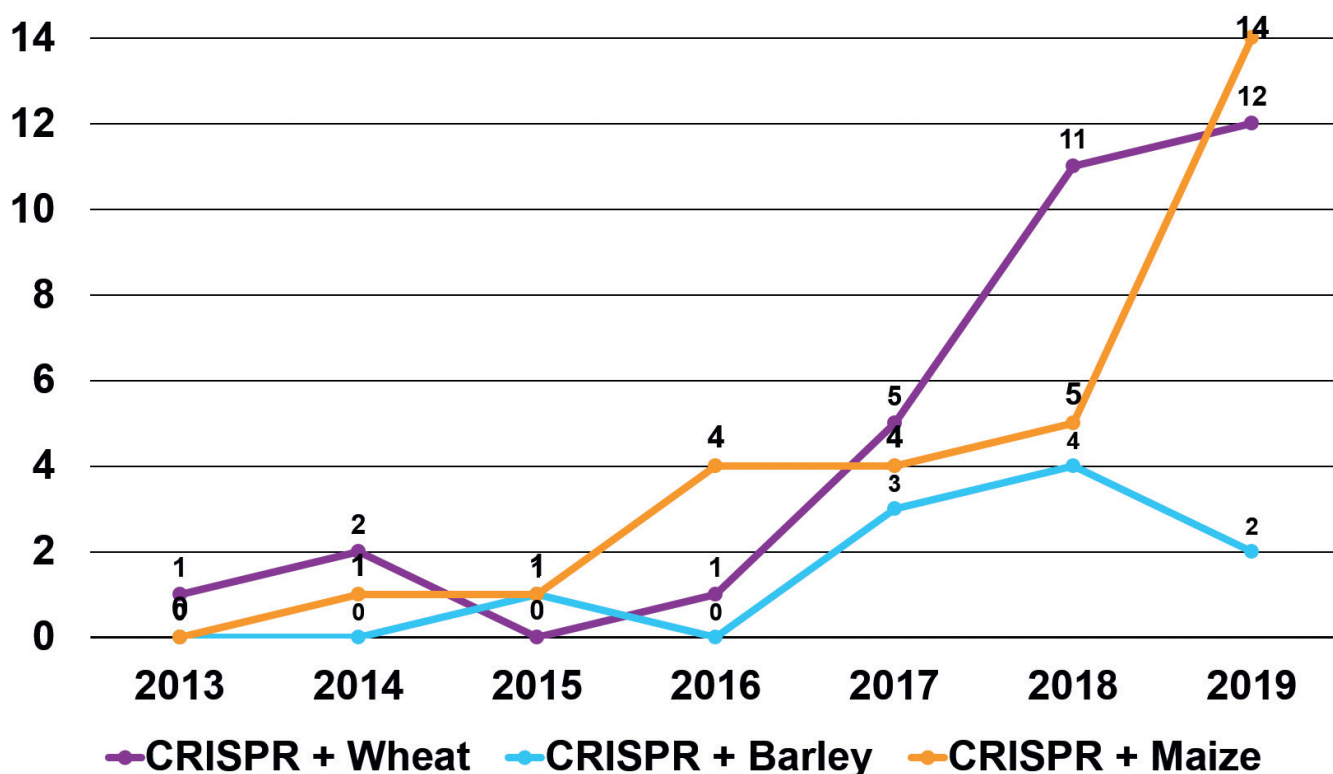


Рис. 2. Число экспериментальных работ, связанных с применением технологии CRISPR/Cas для редактирования генов кукурузы, ячменя и пшеницы, на основе публикаций, обнаруженных в базе данных Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com), дата обращения 09.12.2019) посредством поиска по сочетанию терминов CRISPR + Maize, CRISPR + Barley и CRISPR + Wheat, соответственно, и дальнейшего анализа публикаций в ручном режиме.

Fig. 2. The number of experimental works related to the application of CRISPR/Cas technology for genes editing in maize, barley and wheat, based on publications identified in the Scopus database ([www.scopus.com](http://www.scopus.com), accessed December 9, 2019) by search using combinations of terms CRISPR + Maize, CRISPR + Barley and CRISPR + Wheat, respectively, and subsequent analysis of publications in manual mode.

#### Разработка и оптимизация системы редактирования генома CRISPR/Cas для злаковых растений

Среди рассматриваемых культур впервые возможность использования системы редактирования генов CRISPR/Cas была продемонстрирована на пшенице *T. aestivum* (Upadhyay et al., 2013). В результате, использование суспензионной культуры клеток пшеницы позволило выявить мутации в 18–22% случаев для разных протоспейсеров генов *INOX* и *PDS*. Данная работа впервые показала, что система CRISPR/Cas может успешно применяться для редактирования очень больших геномов растений.

Первая работа, где был разработан набор векторов для трансформации однодольных растений на при-

мере кукурузы (ген *HKT1*), появилась в 2014 году (Xing et al., 2014), а возможность использования системы CRISPR/Cas на ячмене была продемонстрирована только в 2015 году (Lawrenson et al., 2015). В работе Lawrenson et al. (2015) был осуществлён нокаут гена *PM19*, который в пшенице действует как позитивный регулятор покоя зерна (Barrero et al., 2015), и нецелевой нокаут его высокотопологических копий, произошедший несмотря на наличие по крайней мере одного несоответствия между направляющей РНК и последовательностью нецелевого гена. Описанные в работе нецелевые мутации стали рассматриваться как возможности для редактирования семейств генов у сельскохозяйственных культур (Lawrenson et al., 2015).

Последующие работы по редактированию геномов пшеницы, ячменя и кукурузы в основном были нацелены на улучшение и оптимизацию системы для редакти-

Таблица. Перечень генов кукурузы *Zea mays* L., пшеницы *Triticum aestivum* L. и ячменя *Hordeum vulgare* L., нокаутированных с помощью системы CRISPR/Cas.

Table. A list of the genes of maize *Zea mays* L., wheat *Triticum aestivum* L., and barley *Hordeum vulgare* L. knocked out using the CRISPR/Cas system.

| Вид                         | Ген            | Функция гена                                       | Фенотип после нокаутирования                                      | Источник                                         |
|-----------------------------|----------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <i>Zea mays</i> L.          | <i>al, a4</i>  | Биосинтез антоцианов                               | Отсутствие антоциановой пигментации                               | (Char et al., 2017)                              |
|                             | <i>GRP1</i>    | Регуляция сплайсинга                               | Изменение сплайсинга многочисленных генов                         | (Chen et al., 2018a)                             |
|                             | <i>CST1</i>    | Транспорт глюкозы                                  | Снижение олигомеризации и транспортной активности глюкозы         | (Wang et al., 2019b)                             |
|                             | <i>DEK42</i>   | Регуляция сплайсинга генов во время развития зерна | Нарушение экспрессии генов развития зерна                         | (Zuo et al., 2019)                               |
|                             | <i>PIF5</i>    | Регуляция световой сигнализации и морфогенеза      | Подавленное удлинение мезокотилия у выращенных в темноте растений | (Wu et al., 2019)                                |
| <i>Triticum aestivum</i> L. | <i>Br2</i>     | Транспорт ауксина                                  | Полукарликовый фенотип                                            | (Bage et al., 2020)                              |
|                             | <i>EDR1</i>    | Чувствительность к мучнистой росе                  | Устойчивость к мучнистой росе                                     | (Zhang et al., 2017)                             |
|                             | <i>GW2</i>     | Негативная регуляция размера и веса зерна          | Увеличения размера и веса зерна                                   | (Wang et al., 2018)                              |
|                             | <i>Ms1</i>     | Мужская фертильность                               | Ядерная мужская стерильность                                      | (Okada et al., 2019)                             |
|                             | <i>Ms45</i>    | Мужская фертильность                               | Ядерная мужская стерильность                                      | (Singh et al., 2018)                             |
| <i>Hordeum vulgare</i> L.   | <i>PDS</i>     | Биосинтез каротиноидов                             | Обесцвечивание                                                    | (Howells et al., 2018)                           |
|                             | <i>PAPhy_a</i> | Созревание зерна                                   | Низкий уровень фитазной активности зерна; замедленное прорастание | (Holme et al., 2017)                             |
|                             | <i>Nud</i>     | Образование плёнки зерна                           | Голозёрный тип                                                    | (Gasparis et al., 2018; Gerasimova et al., 2018) |
|                             | <i>PTST1</i>   | Накопление крахмала в зерновке                     | Отсутствие крахмала в зерновке                                    | (Zhong et al., 2019)                             |
|                             | <i>GBSSI</i>   | Синтез крахмала в зерновке                         | Накопление амилопектина                                           | (Zhong et al., 2019)                             |
|                             | <i>MORCI</i>   | Стабилизация генома                                | Дерепрессия мобильных генетических элементов                      | (Kumar et al., 2018)                             |

рования генов, а также одновременного редактирования копий генов (Shan et al., 2014; Svitashv et al., 2015, 2016; Qi et al., 2016; Zhang et al., 2016, 2019b, 2019a; Zhu et al., 2016; Čermák et al., 2017; Kapusi et al., 2017; Liang et al., 2017, 2018; Wolter et al., 2017; Gil-Humanes et al., 2017; Rey et al., 2018; Feng et al., 2018; Gasparis et al., 2018; Hamada et al., 2018; Cui et al., 2019; Kumar et al., 2019; Doll et al., 2019; Young et al., 2019; Gao et al., 2019; Hayta et al., 2019; Hu et al., 2019).

Были продемонстрированы возможности редактирования одного основания ДНК – замены цитозина на тимин – без необходимости вставки чужеродной ДНК или разрыва двойной цепи ДНК; а также изменения аденина на гуанин при использовании аденозиндеаминазы, соединённой с нисказой (Zong et al., 2017; Li et al., 2018). Также было показано, что гетерохроматин не влияет на эффективность редактирования при помощи системы CRISPR/Cas (Feng et al., 2016). Не влияет на эффективность редактирования и степень метилирования редактируемого участка ДНК, что также составляет преимущество данной системы (Hsu et al., 2013).

Позже, применение системы CRISPR/Cas в сочетании с технологией одноклеточных микроспор позволило разработать оптимизированную систему мутагенеза гаплоидных растений для индукции генетических модификаций в геноме пшеницы (Bhowmik et al., 2018). За счёт дальнейшего удвоения наборов хромосом гаплоидов можно сразу получить мутации в гомозиготе.

Схожая работа была проведена спустя год для кукурузы (Wang et al., 2019). Однако в этом случае для получения гаплоидов использовали метод применения гаплоиндуктора. Такой сочетанный метод был назван гаплоиндуктор-опосредованное геномное редактирование (haploid-inducer mediated genome editing, IMGE). Достоинство этого метода заключалось не только в возможности быстрого получения мутантов в гомозиготе, но и в том, что редактирующая система закладывается в специальную линию-гаплоиндуктор, а изменения проводятся в опыляемой элитной инбредной линии. Таким образом, в первом же поколении получают модифицированную нетрансгенную линию (гомозиготные двойные гаплоидные линии с целевым признаком могут быть получены уже в течение двух поколений, многократно ускоряя процедуру выведения сортов с улучшенными признаками; Wang et al., 2019). Кроме того, этот метод позволяет избежать проблем с генотипически обусловленным снижением способности к трансформации и регенерации. Достаточно в качестве гаплоиндуктора выбрать генотип, не связанный с этими проблемами. Метод IMGE может найти более широкое применение. Известно, что гаплоиндукторами пшеницы также могут являться линии кукурузы, следовательно, можно с его помощью повысить эффективность редактирования пшеницы. Кроме того, можно с помощью этого метода решать не только генотип-, но и видозависимые проблемы с трансформацией и регенерацией.

Несмотря на то, что на пути к широкому применению системы CRISPR/Cas для улучшения возделываемых культур ещё предстоит решить ряд технологических задач, сегодня уже наблюдаются яркие примеры, связанные с улучшением генотипов зерновых культур, определяющих широкий спектр хозяйственно-ценных признаков.

### Питательная ценность зерна

Возможное улучшение питательной ценности зерна впервые было показано на кукурузе (Liang et al., 2014). Фитиновая кислота (инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат), присутствующая в большом количестве в зерновках кукурузы, является антинутриентом, поскольку она не может перевариваться животными с однокамерным желудком и может вызывать загрязнение окружающей среды. Таким образом, снижение содержания фитиновой кислоты в зерновках кукурузы – это важная задача. В данной работе в качестве мишени был нокаутирован ген *ZmIPK*, кодирующий фермент, который катализируют один из этапов биосинтеза фитиновой кислоты, благодаря чему синтез данного соединения должен быть блокирован у мутантной линии.

Изменение соотношения разных типов полимерных молекул (амилоза и амилопектин) в составе крахмала зерновки кукурузы было достигнуто благодаря редактированию гена *Wx1* (Qi et al., 2018). После его модификации у рецессивных гомозигот-мутантов *wx1/wx1* амилоза в зерновках растений T<sub>0</sub> практически не обнаруживалась.

Изменение содержания и состава глютена в зерновках пшеницы также является актуальной задачей в виду распространения целиакии, связанной с непереносимостью некоторых белковых компонентов зерновки пшеницы. Запасные белки зерна отвечают за уникальные вязкие и упругие свойства продуктов, полученных из пшеницы; однако, некоторые из них вызывают патологии у восприимчивых людей. Среди них семейство  $\alpha$ -глюдинов является основной группой белков, определяющих чувствительность к глютену и развитие целиакии (Sapone et al., 2011). На сегодняшний день вышли две работы, нацеленные на снижение содержания аллергенов в зерне пшеницы при помощи генетического редактирования (Sánchez-León et al., 2018; Jouanin et al., 2019). Группа Sanchez-Leon разработала нРНК, нацеленные на консервативную область генов синтеза  $\alpha$ -глюаина. В результате была получена двадцать одна мутантная линия, все из которых демонстрируют сильное снижение содержания  $\alpha$ -глюадинов (Sánchez-León et al., 2018). Группа Jouanin разработала нРНК, нацеленные на специфические сайты семейств генов  $\alpha$ -глюаина и  $\gamma$ -глюаина, трансформировала сорт пшеницы Fielder и выявила изменения в сравнении с мутантными линиями сорта Paragon и эталонным сортом пшеницы Chinse Spring (Jouanin et al., 2019). Полученные в данных исследованиях линии пшениц

могут использоваться для производства пищевых продуктов с низким содержанием глютена и служить исходным материалом для получения элитных сортов пшеницы. Однако ещё предстоит исследовать, какого качества хлеб может быть получен из этих сортов пшеницы.

### Повышение урожайности

Возможность сохранения урожайности в условиях стресса за счёт изменения гена *ARGOS8* была показана на кукурузе (Shi et al., 2017). Ген *ARGOS8* является негативным регулятором этиленового ответа. Растения, обладающие избыточной экспрессией *ARGOS8*, имеют пониженную чувствительность к этилену и стабильный урожай в условиях стресса, вызванного засухой. В работе Shi et al. (2017) при использовании технологии CRISPR/Cas нативный промотор *ARGOS8* был заменён на промотор гена *GOS2* кукурузы. В результате уровень экспрессии гена *ARGOS8* был выше аллеля дикого типа, а полевые исследования показали, что растения с отредактированным *ARGOS8* имели более высокий урожай в сравнении с оригинальными растениями в условиях стресса и не несли потери урожая в условиях оптимального водного режима (Shi et al., 2017).

Для ячменя удалось добиться повышения продуктивности растения на 15% путём нокаута гена цитокининдегидрогеназы *CKX1* (Holubová et al., 2018). Однако, хотя растения произвели больше побегов и зёрен, общая биомасса зерна снизилась до 80%. Это свидетельствует о том, что локальное накопление цитокининов негативно влияет на поток питательных веществ, что приводит к снижению биомассы зерна.

Увеличения размеров зерновки и показателя масса тысячи зёрен у сортов пшеницы Bobwhite и Paragon удалось достичь при внесении нонсенс-мутаций в гомеологичные копии генов *GW2*, которые являются негативными регуляторами данных признаков (Wang et al., 2018). Растения, несущие один отредактированный ген, показали разные уровни увеличения данных признаков, причём масса тысячи зёрен увеличивалась в среднем на 5,5%. Двойные мутанты имели в среднем на 12,1% выше массу тысячи зёрен по отношению к линиям дикого типа, а тройные мутанты имели массу тысячи зёрен выше на 16,3% (Wang et al., 2018). Эти результаты указывают на то, что вариабельность размера и массы зерна может модулироваться дозой гомеологичных генов.

В работе Wang et al. (2019) удалось изменить размер и вес зерновки пшеницы за счёт изменения последовательности гена *GW7* в геномах В и D (Wang et al., 2019c). Было показано, что мутации в одном или обоих генах увеличивают ширину и массу зерна, но уменьшают его длину. Последующий анализ показал, что ген *GW7* участвует в путях, регулирующих деление клеток и рост органов, что также подтверждается колокализацией белка *GW7* с белками  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина (Wang et al., 2019c).

Увеличить такой показатель продуктивности пшеницы, как число зёрен в колосе, удалось за счёт редактирования четырёх генов-мишеней, регулирующих размер зерна, – *CKX2-1*, *GLW7*, *GW2* и *GW8* (Zhang et al., 2019d). В результате было получено 68 мутантов по этим генам, причём растения, гомозиготные по делеции 1160 пн в гене *CKX2-1*, показали значительное увеличение числа зёрен в колосе и его плотности. Эти результаты показывают, что *CKX2-1* является негативным регулятором признака числа зёрен в колосе.

Гены гомеологичной серии *Qsd1-A1*, *-B1* и *-D1* пшеницы являются регуляторами периода покоя семян. В 2019 году вышла работа, описывающая получение мутантных линий пшеницы с потерей функции данных генов (Abe et al., 2019). В результате авторам удалось получить линию пшеницы, несущую мутации сразу трёх гомеологов *Qsd1*. Данное растение было скрещено с сортом дикого типа Fielder для получения нетрансгенного тройного рецессивного мутанта. Мутант показал значительно более длительный период покоя семян, чем дикий тип, что может быть использовано для снижения прорастания зерна на корню (Abe et al., 2019).

### Устойчивость к факторам биотического и абиотического стресса

К настоящему времени вышли две работы по редактированию генов, связанных с чувствительностью к грибному патогену *Blumeria graminis* f. sp. tritici, Bgt, поражение которым вызывает заболевание пшеницы мучнистой росой, существенно снижая урожай (Singh et al., 2016). В одной из работ был произведён нокаут генов *MLO* (mildew-resistance loci; Wang et al., 2014), в другой – генов *EDR1* (enhanced disease resistance1; Zhang et al., 2017). Показано, что для полной устойчивости растений пшеницы необходим нокаут сразу трёх гомеологичных копий *EDR1*. То же самое касается *MLO*. Нокаут одной копии (*MLO-A1*) придавал лишь частичную устойчивость.

Устойчивость кукурузы к широкому спектру абиотических стрессов может быть достигнута за счёт редактирования гена *ACD6* (ранее *ANK23*). Но в данном случае для повышения устойчивости требуется усиление экспрессии этого гена, а его нокаут, напротив, приводит к восприимчивости. Так, при использовании системы CRISPR/Cas были созданы растения кукурузы, нокаутные по гену *ACD6*, которые были более восприимчивы к пузырчатой головне (грибной патоген *Ustilago maydis* (DC.) Corda), чем растения дикого типа (Zhang et al., 2019c). Напротив, у линии кукурузы (SC-9) с относительно высоким уровнем экспрессии *ACD6* наблюдалась повышенная устойчивость к *U. maydis*.

Ген *EPSPS* пшеницы является идеальной мишенью для геномного редактирования, поскольку известно несколько хорошо охарактеризованных аминокислотных замен в этом гене, которые придают растению устой-

чивость к широко используемому гербициду глифосату (Sammons, Gaines, 2014). За счёт изменения последовательностей гомеологичных генов-мишеней *EPSPS* была достигнута устойчивость пшеницы к этому препарату (Arndell et al., 2019).

### Контроль опыления для гибридной селекции

Стерильность растений по мужскому типу является полезным инструментом для производства гибридных семян растений. Основываясь на типе наследования, мужская стерильность может быть цитоплазматической (ЦМС) и генетической/ядерной (ГМС). ЦМС обычно вызывается мутациями митохондриальных генов, которые приводят к нарушению функций митохондрий растений. ГМС связана с мутациями генов ядерного генома, регулирующих образование мужских гамет.

Ген мужской стерильности пшеницы *Ms45* в геномах A, B и D был нокаутирован с использованием CRISPR/Cas, в результате чего были обнаружены растения с мутациями во всех трёх гомеологичных копиях. Генетический анализ мутаций показал, что все три гена *Ms45* в доминантном состоянии способствуют мужской фертильности и что тройные гомозиготные мутанты необходимы для прекращения развития пыльца и достижения мужской стерильности (Singh et al., 2018).

В другой работе были получены стерильные формы пшеницы за счёт внесения мутаций в ген *Ms1* пшеницы у сортов пшеницы Fielder и Gladius (Okada et al., 2019). Внесение биаллельных мутаций привело к сдвигу рамки считывания, что привело к нокауту гена *Ms1*, а на уровне фенотипа - к полной стерильности по мужскому типу.

Стерильные генотипы кукурузы удалось получить за счёт нокаута ядерных генов *Ms33* и *Ms8* (Chen et al., 2018b; Xie et al., 2018). Мутация в этих генах и мужской стерильный фенотип наследуются согласно законам Менделя.

Необходимой компонентой системы контроля опыления в гибридной селекции, кроме генов стерильности, являются восстановители фертильности. При помощи системы CRISPR/Cas была уточнена функция разных аллельных вариантов гена *Rf4* кукурузы, расположенного на хромосоме 8S и кодирующего фактор транскрипции bHLH (Jaqueth et al., 2020). Редактирование привело к замене фенилаланина (F) в позиции 187 на тирозин (Y), анализ фенотипа (растения, содержащие F187, были полностью фертильными, а растения, содержащие Y187, были стерильными) подтвердил ранее высказанную гипотезу о том, что восстановление фертильности определяется изменением одной аминокислоты гена *Rf4*. F187 оказался критичным для стабилизации конформации белка Rf4 и его взаимодействия с другими белками (Jaqueth et al., 2020).

### Заключение

В значительной мере быстрый выход работ по редактированию разнообразных генов зерновых культур с момента появления системы редактирования CRISPR/Cas связан не только с преимуществами самой системы, но и с накоплением знаний о хозяйственно-ценных генах пшеницы, ячменя и кукурузы. Геномное редактирование на настоящее время имеет два основных направления: определение/подтверждение функций генов и получение новых сортов сельскохозяйственных растений. Практический успех последнего будет во многом зависеть от законодательных норм для использования таких растений. Дальнейший успех в развитии геномного редактирования будет связан не только с преодолением технологических проблем (например, низкая эффективность редактирования пшеницы, генотип-зависимая низкая способность к трансформации и регенерации у ячменя), но прежде всего с интенсивностью и достижениями генетических исследований, направленных на расшифровку механизмов формирования хозяйственно-ценных признаков у этих культур.

### Благодарности/Acknowledgements

*Данная статья подготовлена при поддержке РФФИ (№ 18-416-543007). / The present paper was supported by RFFI (No. 18-416-543007).*

### Литература/References

- Abe F., Haque E., Hisano H., Tanaka T., Kamiya Y., Mikami M., Kawaura K., Endo M., Onishi K., Hayashi T., Sato K. Genome-Edited Triple-Recessive Mutation Alters Seed Dormancy in Wheat. *Cell Reports*. 2019;28(5):1362-1369.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.06.090
- Ali Z., Abul-Faraj A., Li L., Ghosh N., Piatek M., Mahjoub A., Aouida M., Piatek A., Baltes N.J., Voytas D.F., Dinesh-Kumar S., Mahfouz M.M. Efficient Virus-Mediated Genome Editing in Plants Using the CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant*. 2015;8(8):1288-1291. DOI: 10.1016/j.molp.2015.02.011
- Arndell T., Sharma N., Langridge P., Baumann U., Watson-Haigh NS, Whitford R. gRNA validation for wheat genome editing with the CRISPR-Cas9 system. *BMC Biotechnology*. 2019;19(1):1-12. DOI: 10.1186/s12896-019-0565-z
- Bage S.A., Barten T.J., Brown A.N., Crowley J.H., Deng M., Fouquet R., Gomez J.R., Hatton T.W., Lamb J.C., LeDeaux J.R., Lemke B.M., Manjunath S., Marengo M.S., Morales E.Y., Garcia M.O., Peevers J.M., Pellet J.-L., Avendano A.R., Rymarkus L.A., Sridharan K., Valentine M.F., Yang D.H., Cargill E.J.. Genetic characterization of novel and CRISPR-Cas9 gene edited maize brachytic 2 alleles. *Plant Gene*. 2020;21(2020):100198. DOI: 10.1016/j.plgene.2019.100198
- Barrero J.M., Cavanagh C., Verbyla K.L., Tibbits J.F.G., Verbyla A.P., Huang B.E., Rosewarne G.M., Stephen S., Wang P., Whan A., Rigault P., Hayden M.J., Gubler F. Transcriptomic analysis of wheat near-isogenic lines identifies PM19-A1 and A2 as candidates for a major dormancy QTL. *Genome Biology*. 2015;16(1):93. DOI: 10.1186/s13059-015-0665-6
- Becker H. Pflanzenzüchtung. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer/UTB für Wissenschaft; 1993. [in German] (Russian Translation: Eds. V.I.

- Leunov, G.F. Monachos. Moscow: Partnership of scientific publications KMK; 2015. 425 p.).
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N.J., Nekrasov V. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015;32:76-84. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.11.007
- Bhowmik P., Ellison E., Polley B., Bollina V., Kulkarni M., Ghanbarnia K., Song H., Gao C., Voytas D.F., Kagale S. Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1-10. DOI: 10.1038/s41598-018-24690-8
- Bortesi L., Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*. 2015;33(1):41-52. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006
- Čermák T., Curtin S.J., Gil-Humanes J., Čegan R., Kono T.J.Y., Konečná E., Belanto J.J., Starker C.G., Mathre J.W., Greenstein R.L., Voytas D.F. A multipurpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *Plant Cell*. 2017;29(6):1196-217. DOI: 10.1105/tpc.16.00922
- Char S.N., Neelakandan A.K., Nahampun H., Frame B., Main M., Spalding M.H., Becraft P.W., Meyers B.C., Walbot V., Wang K., Yang B. An Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*. 2017;15(2):257-68. DOI: 10.1111/pbi.12611
- Chen Q., Han Y., Liu H., Wang X., Sun J., Zhao B., Li W., Tian J., Liang Y., Yan J., Tian F. Genome-wide association analyses reveal the importance of alternative splicing in diversifying gene function and regulating phenotypic variation in maize. *Plant Cell*. 2018a;30(7):1404-23. DOI: 10.1105/tpc.18.00109
- Chen R., Xu Q., Liu Y., Zhang J., Ren D., Wang G., Liu Y. Generation of transgene-free maize male sterile lines using the CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science*. 2018b;9:1180. DOI: 10.3389/fpls.2018.01180
- Cherny I.V., Shkvarnikov P.K., Maksimenko V.P. Spring wheat variety Novosibirskaya-67 (Sort yarovoy pshenitsy Novosibirskaya-67). Russian Federation; authorship certificate number: 1801/1975. [in Russian] (Чёрный И.В., Шкварников П.К., Максименко В.П. Сорт яровой пшеницы Новосибирская 67. Российская Федерация; авторское свидетельство № 1801/1975).
- Cui X., Balcerzak M., Scherthner J., Babic V., Datla R., Brauer E.K., Labbé N., Subramaniam R., Ouellet T. An optimised CRISPR/Cas9 protocol to create targeted mutations in homeologous genes and an efficient genotyping protocol to identify edited events in wheat. *Plant Methods*. 2019;15(1):1-12. DOI: 10.1186/s13007-019-0500-2
- Doll N.M., Gilles L.M., Gérentes M.F., Richard C., Just J., Fierlej Y., Borrelli V.M.G., Gendrot G., Ingram G.C., Rogowsky P.M., Widiez T. Single and multiple gene knockouts by CRISPR-Cas9 in maize. *Plant Cell Reports*. 2019;38(4):487-501. DOI: 10.1007/s00299-019-02378-1
- Doudna J.A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. 2014;346(6213):1258096. DOI: 10.1126/science.1258096
- Feng C., Su H., Bai H., Wang R., Liu Y., Guo X., Liu C., Zhang J., Yuan J., Birchler J.A., Han F. High-efficiency genome editing using a dmcl promoter-controlled CRISPR/Cas9 system in maize. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(11):1848-1857. DOI: 10.1111/pbi.12920
- Feng C., Yuan J., Wang R., Liu Y., Birchler J.A., Han F. Efficient Targeted Genome Modification in Maize Using CRISPR/Cas9 System. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016;43(1):37-43. DOI: 10.1016/j.jgg.2015.10.002
- Feng Z., Mao Y., Xu N., Zhang B., Wei P., Yang D., Wang Z. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(12):4632-4637. DOI: 10.1073/pnas.1400822111
- Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*. 2013;31(7):397-405. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.04.004
- Gao Q., Xu W.Y., Yan T., Fang X.D., Cao Q., Zhang Z.J., Ding Z.H., Wang Y., Wang X.B. Rescue of a plant cytorhabdovirus as versatile expression platforms for planthopper and cereal genomic studies. *New Phytologist*. 2019;223(4):2120-33. DOI: 10.1111/nph.15889
- Gasparis S., Kała M., Przyborowski M., Łyznik L.A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. A simple and efficient CRISPR/Cas9 platform for induction of single and multiple, heritable mutations in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Methods*. 2018;14:111. DOI: 10.1186/s13007-018-0382-8
- Gerasimova S., Hertig C., Korotkova A., Otto I., Hiekel S., Kochetov A., Kumlehn J., Khlestkina E. Converting hulled into naked barley through targeted knock-out of the Nud1 gene. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2018;54(1):101. DOI: 10.1007/s11627-018-9923-0
- Gerasimova S.V., Khlestkina E.K., Kochetov A.V., Shumny V.K. Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2017;64(2):141-155. (Герасимова С.В., Хлесткина Е.К., Кочетов А.В., Шумный В.К. Система CRISPR/Cas9 для редактирования геномов и особенности ее применения на однодольных растениях. *Физиология Растений*. 2017;64(2):92-108). DOI: 10.1134/S1021443717010071
- Gerasimova S.V., Korotkova A.M., Hertig C., Hiekel S., Hoffie R., Budhagatapalli N., Otto I., Hensel G., Shumny V.K., Kochetov A.V., Kumlehn J., Khlestkina E.K. Targeted genome modification in protoplasts of a highly regenerable Siberian barley cultivar using RNA-guided Cas9 endonuclease. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):1033-1039. DOI: 10.18699/VJ18.447
- Gil-Humanes J., Wang Y., Liang Z., Shan Q., Ozuna C.V., Sánchez-León S., Baltes N.J., Starker C., Barro F., Gao C., Voytas D.F. High-efficiency gene targeting in hexaploid wheat using DNA replicons and CRISPR/Cas9. *Plant Journal*. 2017;89(6):1251-1262. DOI: 10.1111/tpj.13446
- Hamada H., Liu Y., Nagira Y., Miki R., Taoka N., Imai R. Biolistic-delivery-based transient CRISPR/Cas9 expression enables in planta genome editing in wheat. *Scientific Reports*. 2018;8:14422. DOI: 10.1038/s41598-018-32714-6
- Hayta S., Smedley M.A., Demir S.U., Blundell R., Hinchliffe A., Atkinson N., Harwood W.A. An efficient and reproducible Agrobacterium-mediated transformation method for hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Methods*. 2019;15:121. DOI: 10.1186/s13007-019-0503-z
- Holme I.B., Wendt T., Gil-Humanes J., Deleuran L.C., Starker C.G., Voytas D.F., Brinch-Pedersen H. Evaluation of the mature grain phytase candidate HvPAPhy a gene in barley (*Hordeum vulgare* L.) using CRISPR/Cas9 and TALENs. *Plant Molecular Biology*. 2017;95(1-2):111-121. DOI: 10.1007/s11103-017-0640-6
- Holubová K., Hensel G., Vojta P., Tarkowski P., Bergougnoux V., Galuszka P. Modification of barley plant productivity through regulation of cytokinin content by reverse-genetics approaches. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:1676. DOI: 10.3389/fpls.2018.01676
- Howells R.M., Craze M., Bowden S., Wallington E.J. Efficient generation of stable, heritable gene edits in wheat using CRISPR/Cas9. *BMC Plant Biology*. 2018;18:215. DOI: 10.1186/s12870-018-1433-z
- Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E.J., Wu X., Shalem O., Cradick T.J., Marraffini L.A., Bao G., Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*. 2013;31(9):827-832. DOI: 10.1038/nbt.2647
- Hu J., Li S., Li Z., Li H., Song W., Zhao H., Lai J., Xia L., Li D., Zhang Y. A barley stripe mosaic virus-based guide RNA delivery system for targeted mutagenesis in wheat and maize. *Molecular Plant Pathology*. 2019;20(10):1463-1474. DOI: 10.1111/mpp.12849
- Jaganathan D., Ramasamy K., Sellamuthu G., Jayabalan S., Venkataraman G. CRISPR for crop improvement: An update review. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:985. DOI: 10.3389/fpls.2018.00985
- Jaqueth J.S., Hou Z., Zheng P., Ren R., Nagel B.A., Cutter G., Niu X., Vollbrecht E., Greene T.W., Kumpatla S.P. Fertility restoration of maize CMS-C altered by a single amino acid substitution within the Rf4 bHLH transcription factor. *Plant Journal*. 2020;101(1):101-111. DOI: 10.1111/tpj.14521
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Jennifer A. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. DOI: 10.1126/science.1225829
- Jouanin A., Schaart J.G., Boyd L.A., Cockram J., Leigh F.J., Bates R., Wallington E.J., Visser R.G.F., Smulders M.J.M. Outlook for coeliac disease patients: towards bread wheat with hypoimmunogenic gluten by gene editing of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -gliadin gene families. *BMC plant biology*. 2019;19(1):333. DOI: 10.1186/s12870-019-1889-5

- Kapusi E., Corcuera-Gómez M., Melnik S., Stoger E. Heritable genomic fragment deletions and small indels in the putative ENGase gene induced by CRISPR/Cas9 in barley. *Frontiers in Plant Science*. 2017;8:540. DOI: 10.3389/fpls.2017.00540
- Khlestkina E.K. Rice genome editing using CRISPR/Cas system. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2019;2(1):49–54 [in Russian] (Хлесткина Е.К. Геномное редактирование риса при использовании системы CRISPR/Cas. *Биотехнология и селекция растений*. 2019;2(1):49–54). DOI: 10.30901/2658-6266-2019-1-49-54
- Khlestkina E.K., Shumny V.K. Prospects for application of breakthrough technologies in breeding: The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing. *Russian Journal of Genetics*. 2016;52(7):676–687. [in Russian] (Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений. *Генетика*. 2016;52(7):774–787). DOI: 10.1134/S102279541607005X
- Kim D., Alptekin B., Budak H. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional and Integrative Genomics*. 2018;18(1):31–41. DOI: 10.1007/s10142-017-0572-x
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Khlestkina E.K. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(1):29–37. [in Russian] (Короткова А.М., Герасимова С.В., Хлесткина Е.К. Текущие достижения в области модификации генов культурных растений с использованием системы CRISPR/Cas. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2019;23(1):29–37). DOI: 10.18699/VJ19.458
- Korotkova A.M., Gerasimova S.V., Shumny V.K., Khlestkina E.K. Crop genes modified using CRISPR/Cas system. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017;21(2):250–258. [in Russian] (Короткова А.М., Герасимова С.В., Шумный В.К., Хлесткина Е.К. Гены сельскохозяйственных растений, модифицированные с помощью системы CRISPR/Cas. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(2):250–258). DOI: 10.18699/VJ17.244
- Kumar N., Galli M., Ordon J., Stuttmann J., Kogel K.H., Imani J. Further analysis of barley MORC1 using a highly efficient RNA-guided Cas9 gene-editing system. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(11):1892–903. DOI: 10.1007/s10142-017-0572-x
- Kumar R., Mamrutha H.M., Kaur A., Venkatesh K., Sharma D., Singh G.P. Optimization of Agrobacterium-mediated transformation in spring bread wheat using mature and immature embryos. *Molecular Biology Reports*. 2019;46(2):1845–1853. DOI: 10.1007/s11033-019-04637-6
- Lawrenson T., Shorinola O., Stacey N., Li C., Østergaard L., Patron N., Uauy C., Harwood W. Induction of targeted, heritable mutations in barley and *Brassica oleracea* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Genome Biology*. 2015;16(1):258. DOI: 10.1186/s13059-015-0826-7
- Lee K., Zhang Y., Kleinstiver B.P., Guo J.A., Aryee M.J., Miller J., Malzahn A., Zarecor S., Lawrence-Dill C.J., Joung J.K., Qi Y., Wang K. Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17(2):362–372. DOI: 10.1111/pbi.12982
- Li C., Zong Y., Wang Y., Jin S., Zhang D., Song Q., Zhang R., Gao C. Expanded base editing in rice and wheat using a Cas9-adenosine deaminase fusion. *Genome Biology*. 2018;19:59. DOI: 10.1186/s13059-018-1443-z
- Li J., Aach J., Norville J.E., McCormack M., Bush J., Church G.M., Sheen J. Multiplex and homologous recombination-mediated plant genome editing via guide RNA/Cas9. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8):688–691. DOI: 10.1038/nbt.2654.Multiplex
- Liang Z., Chen K., Li T., Zhang Y., Wang Y., Zhao Q., Liu J., Zhang H., Liu C., Ran Y., Gao C. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*. 2017;8(1):1–5. DOI: 10.1038/ncomms14261
- Liang Z., Chen K., Zhang Y., Liu J., Yin K., Qiu J., Gao C. Genome editing of bread wheat using biolistic delivery of CRISPR/Cas9 in vitro transcripts or ribonucleoproteins. *Nature Protocols*. 2018;13(3):413–430. DOI: 10.1038/nprot.2017.145
- Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *Journal of Genetics and Genomics*. 2014;41(2):63–68. DOI: 10.1016/j.jgg.2013.12.001
- Malzahn A.A., Tang X., Lee K., Ren Q., Sretenovic S., Zhang Y., Chen H., Kang M., Bao Y., Zheng X., Deng K., Zhang T., Salcedo V., Wang K., Zhang Y., Qi Y. Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and *Arabidopsis*. *BMC Biology*. 2019;17:9. DOI: 10.1186/s12915-019-0629-5
- Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J.D.G., Kamoun S. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8):691–693. DOI: 10.1038/nbt.2655
- Okada A., Arndell T., Borisjuk N., Sharma N., Watson-Haigh N.S., Tucker E.J., Baumann U., Langridge P., Whitford R. CRISPR/Cas9-mediated knockout of Msl enables the rapid generation of male-sterile hexaploid wheat lines for use in hybrid seed production. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17(10):1905–1913. DOI: 10.1111/pbi.13106
- Peng R., Lin G., Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS Journal*. 2016;283(7):1218–1231. DOI: 10.1111/febs.13586
- Qi W., Zhu T., Tian Z., Li C., Zhang W., Song R. High-efficiency CRISPR/Cas9 multiplex gene editing using the glycine tRNA-processing system-based strategy in maize. *BMC Biotechnology*. 2016;16:58. DOI: 10.1186/s12896-016-0289-2
- Qi X., Dong L., Liu C., Mao L., Liu F., Zhang X., Cheng B., Xie C. Systematic identification of endogenous RNA polymerase III promoters for efficient RNA guide-based genome editing technologies in maize. *Crop Journal*. 2018;6(3):314–320. DOI: 10.1016/j.cj.2018.02.005
- Rey M.D., Martín A.C., Smedley M., Hayta S., Harwood W., Shaw P., Moore G. Magnesium increases homoeologous crossover frequency during meiosis in ZIP4 (Phl gene) mutant wheat-wild relative hybrids. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9:509. DOI: 10.3389/fpls.2018.00509
- Sammons R.D., Gaines T.A. Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Management Science*. 2014;70(9):1367–1377. DOI: 10.1002/ps.3743
- Sánchez-León S., Gil-Humanes J., Ozuna C.V., Giménez M.J., Sousa C., Voytas D.F., Barro F. Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*. 2018;16(4):902–910. DOI: 10.1111/pbi.12837
- Sapone A., Lammers K.M., Casolaro V., Cammarota M., Giuliano M.T., De Rosa M., Stefanile R., Mazzarella G., Tolone C., Russo M.I., Esposito P., Ferraraccio F., Carteni M., Riegler G., de Magistris L., Fasano A. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: Celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Medicine*. 2011;9:23. DOI: 10.1186/1741-7015-9-23
- Shan Q., Wang Y., Li J. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8):686–688. DOI: 10.1038/nbt.2650
- Shan Q., Wang Y., Li J., Gao C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nature Protocols*. 2014;9(10):2395–2410. DOI: 10.1038/nprot.2014.157
- Shi J., Gao H., Wang H., Lafitte H.R., Archibald R.L., Yang M., Hakiimi S.M., Mo H., Habben J.E. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal*. 2017;15(2):207–216. DOI: 10.1111/pbi.12603
- Singh M., Kumar M., Albertsen M.C., Young J.K., Cigan A.M. Concurrent modifications in the three homeologs of Ms45 gene with CRISPR-Cas9 lead to rapid generation of male sterile bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology*. 2018;97(4–5):371–383. DOI: 10.1007/s11103-018-0749-2
- Singh R.P., Singh P.K., Rutkoski J., Hodson D.P., He X., Jørgensen L.N., Hovmöller M.S., Huerta-Espino J. Disease Impact on Wheat Yield Potential and Prospects of Genetic Control. *Annual Review of Phytopathology*. 2016;54(1):303–322. DOI: 10.1146/annurev-phyto-080615-095835
- Svitashev S., Schwartz C., Lenderts B., Young J.K., Cigan A.M. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications*. 2016;7(1):1–7. DOI: 10.1038/ncomms13274
- Svitashev S., Young J.K., Schwartz C., Gao H., Falco S.C., Cigan A.M. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA. *Plant Physiology*.

- 2015;169(2):931-945. DOI: 10.1104/pp.15.00793
- Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R. RNA-Guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2013;3(12):2233-2238. DOI: 10.1534/g3.113.008847
- Wang B., Zhu L., Zhao B., Zhao Y., Xie Y., Zheng Z., Li Y., Sun J., Wang H. Development of a Haploid-Inducer Mediated Genome Editing System for Accelerating Maize Breeding. *Molecular Plant*. 2019a;12(4):597-602. DOI: 10.1016/j.molp.2019.03.006
- Wang H., Yan S., Xin H., Huang W., Zhang H., Teng S., Yu Y.C., Fernie A.R., Lu X., Li P., Li S., Zhang C., Ruan Y.L., Chen L.Q., Lang Z. A subsidiary cell-localized glucose transporter promotes stomatal conductance and photosynthesis. *Plant Cell*. 2019b;31(6):1328-1343. DOI: 10.1105/tpc.18.00736
- Wang W., Pan Q., Tian B., He F., Chen Y., Bai G., Akhunova A., Trick H.N., Akhunov E. Gene editing of the wheat homologs of TONNEAU1-recruiting motif encoding gene affects grain shape and weight in wheat. *Plant Journal*. 2019c;100(2):251-264. DOI: 10.1111/tpj.14440
- Wang W., Simmonds J., Pan Q., Davidson D., He F., Battal A., Akhunova A., Trick H.N., Uauy C., Akhunov E. Gene editing and mutagenesis reveal inter-cultivar differences and additivity in the contribution of TaGW2 homoeologues to grain size and weight in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;131(11):2463-2475. DOI: 10.1007/s00122-018-3166-7
- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*. 2014;32(9):947-951. DOI: 10.1038/nbt.2969
- Wolter F., Edelmann S., Kadri A., Scholten S. Characterization of paired Cas9 nickases induced mutations in maize mesophyll protoplasts. *Maydica*. 2017;62(2):1-11.
- Wu G., Zhao Y., Shen R., Wang B., Xie Y., Ma X., Zheng Z., Wang H. Characterization of Maize Phytochrome-Interacting Factors in Light Signaling and Photomorphogenesis. *Plant physiology*. 2019;181(2):789-803. DOI: 10.1104/pp.19.00239
- Xie K., Wu S., Li Z., Zhou Y., Zhang D., Dong Z., An X., Zhu T., Zhang S., Liu S., Li J., Wan X. Map-based cloning and characterization of *Zea mays* male sterility33 (*ZmMs33*) gene, encoding a glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Theoretical and Applied Genetics*. 2018;131(6):1363-78. DOI: 10.1007/s00122-018-3083-9
- Xing H.-L., Dong L., Wang Z.-P., Zhang H.-Y., Han C.-Y., Liu B., Wang X.-C., Chen Q.-J. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology*. 2014;14(1):327. DOI: 10.1186/s12870-014-0327-y
- Young J., Zastrow-Hayes G., Deschamps S., Svitashvili S., Zaremba M., Acharya A., Paulraj S., Peterson-Burch B., Schwartz C., Djukanovic V., Lenderts B., Feigenbutz L., Wang L., Alarcon C., Siksnys V., May G., Chilcoat N.D., Kumar S. CRISPR-Cas9 Editing in Maize: Systematic Evaluation of Off-target Activity and Its Relevance in Crop Improvement. *Scientific Reports*. 2019;9(1):1-11. DOI: 10.1038/s41598-019-43141-6
- Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Mao Y., Yang L., Zhang H., Xu N., Zhu J.K. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnology Journal*. 2014;12(6):797-807. DOI: 10.1111/pbi.12200
- Zhang Q., Zhang Y., Lu M.H., Chai Y.P., Jiang Y.Y., Zhou Y., Wang X.C., Chen Q.J. A novel ternary vector system united with morphogenic genes enhances CRISPR/Cas delivery in maize. *Plant Physiology*. 2019a;181(4):1441-1448. DOI: 10.1104/pp.19.00767
- Zhang S., Zhang R., Gao J., Gu T., Song G. Highly Efficient and Heritable Targeted Mutagenesis in Wheat via the Agrobacterium tumefaciens-Mediated CRISPR/Cas9 System. *International Journal of Molecular Sciences Article*. 2019b;20(17):4257. DOI: 10.3390/ijms20174257
- Zhang S., Zhang R., Song G., Gao J., Li W., Han X., Chen M., Li Y., Li G. Targeted mutagenesis using the Agrobacterium tumefaciens-mediated CRISPR-Cas9 system in common wheat. *BMC Plant Biology*. 2018;18(1):1-12. DOI: 10.1186/s12870-018-1496-x
- Zhang Y., Bai Y., Wu G., Zou S., Chen Y., Gao C., Tang D. Simultaneous modification of three homoeologs of TaEDR1 by genome editing enhances powdery mildew resistance in wheat. *Plant Journal*. 2017;91(4):714-724. DOI: 10.1111/tpj.13599
- Zhang Y., Liang Z., Zong Y., Wang Y., Liu J., Chen K., Qiu J.L., Gao C. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Communications*. 2016;7:1-8. DOI: 10.1038/ncomms12617
- Zhang Z., Guo J., Zhao Y., Chen J. Identification and characterization of maize ACD6-like gene reveal ZmACD6 as the maize orthologue conferring resistance to Ustilago maydis. *Plant Signaling and Behavior*. 2019c;14(10):e1651604. DOI: 10.1080/15592324.2019.1651604
- Zhang Z., Hua L., Gupta A., Tricoli D., Edwards K.J., Yang B., Li W. Development of an Agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for wheat genome editing. *Plant Biotechnology Journal*. 2019d;17(8):1623-1635. DOI: 10.1111/pbi.13088
- Zhong Y., Blennow A., Kofoed-Enevoldsen O., Jiang D., Hebelstrup K.H. Protein Targeting to Starch 1 is essential for starch endosperm development in barley. *Journal of Experimental Botany*. 2019;70(2):485-496. DOI: 10.1093/jxb/ery398
- Zhou H., Liu B., Weeks D.P., Spalding M.H., Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(17):10903-10914. DOI: 10.1093/nar/gku806
- Zhu J., Song N., Sun S., Yang W., Zhao H., Song W., Lai J. Efficiency and Inheritance of Targeted Mutagenesis in Maize Using CRISPR-Cas9. *Journal of Genetics and Genomics*. 2016;43(1):25-36. DOI: 10.1016/j.jgg.2015.10.006
- Zong Y., Wang Y., Li C., Zhang R., Chen K., Ran Y., Qiu J.L., Wang D., Gao C. Precise base editing in rice, wheat and maize with a Cas9-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*. 2017;35(5):438-440. DOI: 10.1038/nbt.3811
- Zuo Y., Feng F., Qi W., Song R. Dek42 encodes an RNA-binding protein that affects alternative pre-mRNA splicing and maize kernel development. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2019;61(6):728-748. DOI: 10.1111/jipb.12798

Научный рецензируемый журнал

## БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

---

Научный редактор: Михайлова Е. И.

Переводчик: Шувалов С. В.

Корректор: Шувалов С. В.

Компьютерная верстка: Чухин Г. К.

Подписано в печать 25.06.2020    Формат бумаги 70×100<sup>1/8</sup>  
Бумага офсетная.    Печать офсетная  
Печ. л. 7    Тираж 30 экз.

Сектор редакционно-издательской деятельности ВИР  
190000, Санкт-Петербург, Большая Морская ул., 42, 44

---

ООО "Р-КОПИ"  
Санкт-Петербург, пер. Гривцова, 6б

БИОТЕХНОЛОГИЯ  
И СЕЛЕКЦИЯ  
РАСТЕНИЙ

3(1), 2020