

ISSN 1029-8940 (Print)
ISSN 2524-230X (Online)
УДК 577.29
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-2-104-115>

Поступила в редакцию 31.10.2025
Received 31.10.2025

А. М. Шишлова-Соколовская, В. Е. Неборская, О. Ю. Урбанович

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА КАРТОФЕЛЯ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 ДЛЯ НОКАУТА ГЕНОВ *StDMR6-1* И *StCHL1*, ВОВЛЕЧЕННЫХ В УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОФТОРОЗУ

Аннотация. Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации в геном сортов картофеля белорусской селекции Першацвет, Юлия, Красавик были введены векторные генетические конструкции, несущие в своем составе элементы системы CRISPR/Cas9 для нокаута генов регуляторов защитных реакций *StDMR6-1* и *StCHL1*. Нокаут данных генов (S-генов) является перспективным, актуальным и современным подходом для повышения устойчивости картофеля к фитофторозу. Получено 288 трансгенных растений картофеля T₀ поколения, 161 из которых было проанализировано на наличие мутационных событий инсерционно-делеционного типа с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. При этом из 161 трансформанта T₀ поколения 84 имели мутантные последовательности генов *StCHL1* и *StDMR6-1* с частотой встречаемости мутаций от 1 до 97 % при $p < 0,001$ и 99,2 % при $p \geq 0,001$ в зависимости от сорта. В результате эксперимента впервые в Республике Беларусь были получены генетически редактированные растения картофеля сортов белорусской селекции Юлия, Першацвет, Красавик, несущие мутации генов *StCHL1* и *StDMR6-1*, приводящие к сдвигу рамки считывания и, как следствие, к нокауту генов.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9 система, *StDMR6-1*, *StCHL1*, *Solanum tuberosum*

Для цитирования: Шишлова-Соколовская, А. М. Редактирование генома картофеля с помощью системы CRISPR/Cas9 для нокаута генов *StDMR6-1* и *StCHL1*, вовлеченных в устойчивость к фитофторозу / А. М. Шишлова-Соколовская, В. Е. Неборская, О. Ю. Урбанович // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2026. – Т. 71, № 2. – С. 104–115. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-2-104-115>

Anastasia M. Shishlova-Sokolovskaya, Valeria E. Neborskaya, Oksana Yu. Urbanovich

Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

POTATO GENOME EDITING USING THE CRISPR/Cas9 SYSTEM TO KNOCK OUT THE *StDMR6-1* AND *StCHL1* GENES INVOLVED IN LATE BLIGHT RESISTANCE

Abstract. Using *Agrobacterium*-mediated transformation, vector genetic constructs, carrying CRISPR/Cas9 elements in their composition for the knockout of the *StDMR6-1* and *StCHL1* genes regulating defense responses, were introduced into the genomes of Belarusian potato varieties Pershatsvet, Yuliya and Krasavik. The knockout of these genes (S-genes) is a promising, essential and modern approach for increasing potato resistance to late blight. A total of 288 transgenic T₀ potato plants were obtained, and 161 out of them were analyzed for insertion-deletion mutations using Sanger sequencing. Moreover, out of 161 transformants of the T₀ generation, 84 had mutant sequences of the *StCHL1* and *StDMR6-1* genes with a mutation frequency from 1 to 97 % at $p < 0.001$ and 99.2 % at $p \geq 0.001$, depending on the variety. As a result of the experiment, genetically edited potato plants of the varieties of Belarusian selection Yuliya, Pershatsvet, and Krasavik were obtained for the first time in the Republic of Belarus. These plants carry mutations in the *StCHL1* and *StDMR6-1* genes, leading to a shift in the reading frame and, as a consequence, to gene knockout.

Keywords: CRISPR/Cas9 system, *StDMR6-1*, *StCHL1*, *Solanum tuberosum*

For citation: Shishlova-Sokolovskaya A. M., Neborskaya V. E., Urbanovich O. Yu. Potato genome editing using the CRISPR/Cas9 system to knock out the *StDMR6-1* and *StCHL1* genes involved in late blight resistance. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seryya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2026, vol. 71, no. 2, pp. 104–115 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2026-71-2-104-115>

Введение. В Республике Беларусь картофель (*Solanum tuberosum*) занимает первое место среди овощных культур и является одним из основных продуктов питания. Его клубни – это хороший источник питательных веществ, таких как углеводы, белки, минералы и витамин С [1, 2]. Однако выращивание картофеля сопряжено с риском развития ряда заболеваний, наиболее опасным из которых является фитофтороз (возбудитель – оомицет *Phytophthora infestans*). Болезнь поражает

листья, стебли и клубни. Она имеет широкое распространение во всех зонах возделывания картофеля и приводит к потерям урожая до 30–50 %. Разработка надежных, экологически безопасных и экономически осуществимых тактик управления проблемой является непосредственной целью многих исследователей. В настоящее время наиболее надежный подход – это интегрированная агротехника картофеля, включающая посадку здорового семенного материала, своевременную уборку внутрихозяйственных источников патогена (клубней, ботвы, сорняков), применение фунгицидов и использование устойчивых сортов. Применение эффективных фунгицидов позволяет возделывать восприимчивые сорта картофеля. Однако большинство препаратов дорогостоящие и оказывают неблагоприятное воздействие на окружающую среду. Использование устойчивых сортов картофеля минимизирует потребление фунгицидов и является одним из эффективных способов борьбы с фитофторозом. Данные сорта картофеля создаются путем интрогрессии генов устойчивости (R-генов) от диких видов *Solanum*. R-гены, как правило, редки и часто преодолеваются эволюцией патогенов [3]. Относительно недавно был описан альтернативный тип устойчивости растений к болезням, основанный на потере функции генов восприимчивости (S-генов), используемых патогеном во время колонизации и заражения. Было показано, что нокаут S-генов может индуцировать неспецифическую устойчивость у растений [4]. Таким образом, создание растений картофеля, несущих генетически редактированные с помощью системы CRISPR/Cas9 гены восприимчивости *StDMR6-1* и *StCHL1*, является перспективным, актуальным и современным подходом для повышения устойчивости картофеля к фитофторозу.

Материалы и методы исследования. На основании степени устойчивости к *P. infestans* и максимальных показателей морфогенетической отзывчивости в культуре *in vitro* в качестве объекта исследований нами было выбрано 3 перспективных сорта картофеля белорусской селекции: Першацвет, Юлия, Красавик. Предметом исследования являлись гены *S. tuberosum CHL1* (Gene ID: 102589204, updated on 2-Nov-2023) и *DMR6-1* (Gene ID:102590513, updated on 6-Nov-2021).

Создание трансгенных/редактированных растений картофеля. Для получения трансгенных растений картофеля мы использовали систему стабильной экспрессии целевых последовательностей на основе Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*. Векторные генетические конструкции для нокаута генов-мишеней *StDMR6-1* и *StCHL1* были созданы на основе бинарного вектора *pRGEB31* [5]. Культивирование ночной культуры *A. tumefaciens* штамма *LBA4404* проводилось в темноте в течение 24 ч при температуре 25 °С в 20 мл жидкой среды LB с добавлением антибиотиков канамицина и рифампицина в концентрациях 50 мг/л каждого. С помощью полученной агробактериальной суспензии выполнялось инфицирование эксплантов, в качестве которых в нашей работе использовались листья и части стебля 3–4-недельных растений картофеля, выращенных в асептических условиях на белом свете, выровненном по падающим квантам фотосинтетически активной радиации (ФАР), равным 300 ± 50 мкмоль/см²/с, при температуре 24/18 °С с часовым фото периодом 16/8 соответственно. Экспланты размером 0,3–0,5 × 0,3–0,5 см нарезались и помещались в предварительно подготовленную агробактериальную суспензию и кокультивировались в течение 30–40 мин в темноте при температуре 24 °С. Далее экспланты переносились на твердые селективные среды, содержащие соли и витамины по Мурасиге – Скуга, сахарозу и фитогормоны для индукции процессов тканевой дедифференцировки и инициации непрямого морфогенеза (табл. 1), а также антибиотик гиромидин для селекции в концентрации 10 мг/л, и культивировались в пробирках на белом свете, выровненном по падающим квантам ФАР, равным 250 ± 50 мкмоль/см²/с, при температуре 24/18 °С с часовым фото периодом 16/8 соответственно.

Таблица 1. Состав фитогормонов для непрямого морфогенеза картофеля в культуре *in vitro*

Table 1. Composition of phytohormones for indirect potato morphogenesis in *in vitro* culture

Фитогормон	Количество для инициации каллусогенеза/регенерации, мг/л
Кинетин	1/–
Индолилуксусная кислота	–/0,1–0,3
6-бензиламинопурин	2–4/1
1-нафталинуксусная кислота	0,3–1/0,2
Гиббереллиновая кислота	–/0,1–1
2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота	3/–

Укоренение первичных трансформантов с 3–4 настоящими листочками проводилось на ½ среды Мурасиге – Скуга с содержанием сахарозы 10–15 г/л в присутствии селективного агента. Растения, полностью сформировавшие корни и вегетативную массу, были высажены в условия закрытого грунта в супесчаную и легкосуглинистую почву, которая на протяжении вегетации сохраняла рыхлость, имела нейтральную или слабокислую реакцию и содержала не менее 2 % гумуса. Условия культивирования растений были следующие: белый свет, выровненный по падающим квантам ФАР, равным 450 ± 50 мкмоль/см²/с, температура – 24/18 °С с часовым фото периодом 16/8 соответственно.

Молекулярно-генетический анализ. Геномную ДНК трансгенных растений картофеля поколения T₀, отобранных на селективной среде, и растений дикого типа выделяли с использованием набора реагентов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Для анализа событий трансгенеза и направленного сайт-специфического мутагенеза применялись следующие методы: ПЦР-анализ и секвенирование по Сэнгеру. При этом использовались синтетические олигонуклеотиды, разработанные и апробированные *in silico* в программе SnapGene Viewer 6.0 и базе данных NCBI (табл. 2).

Таблица 2. Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов, использованных для анализа событий трансгенеза и направленного сайт-специфического мутагенеза в трансгенных растениях картофеля поколения T₀

Table 2. The sequence and annealing temperature of synthetic oligonucleotides used for the analysis of transgenic and site-directed mutagenesis events in the transgenic potato plants of the T₀ generation

Синтетические олигонуклеотиды	Последовательность синтетических олигонуклеотидов, 5'→3'	Температура отжига, °С
U3-F	AGCTTAAGGAATCTTTAAACATACGAACAGAT	59
35-f	TCAACAAAGGGTAATATCCGGAAACCTCCTCGGA	66
35-R	AGTCCCCCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAAC	65
Tnos-F	CGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTT	59
Tnos-R	GCTATATTTGTTTTCTATCGCGTAT	54
SEQex1DMR6-1-F	TATTGTGAATAAATCTTCAATTCACAAATTAT	54
St-seq/guid1-DRM6/1-R	TATTAATCGAAAAATGATTATTAATTCATGAGT	54
St-seq/guide2-DRM6/1-F	TAAGTAGTACTACCTATTTTAAACCCACC	56
St-seq/guide2-DRM6/1-R	TTAACGAACATCGATGTTTTATTATTATCAT	54
SEQex2CHL1-F	CTTTCATATAAAGAATCAGATCCACATCTCAC	57
St-seq/guide2,3-CHL1-R	GGTACTAAATCTTGCAGAAATCTCATTCTCTC	59

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл, в смесь входили следующие реагенты: 100–200 нг ДНК, 2,5 мкл 10X Taq Turbo буфера (ЗАО «Евроген», Российская Федерация); 2,5 мкл 0,4 мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (ООО «Артбиотех», Республика Беларусь); 2 мкл 25 мМ MgCl₂ (ОДО «Праймтех», Республика Беларусь); 2,5 мкл каждого из праймеров; 0,2 мкл 5 ед. Taq ДНК-полимеразы (ОДО «Праймтех»); 10,7 мкл H₂O. Амплификацию проводили в амплификаторе GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) с использованием следующей программы: денатурация – 94 °С – 4 мин; отжиг праймеров – 35 циклов: 94 °С – 30 с, 56 °С – 45 с, 72 °С – 1 мин; ренатурация – 72 °С – 7 мин, 4 °С – ∞ мин (в зависимости от нуклеотидной последовательности и размера амплифицируемого фрагмента температура отжига олигонуклеотидов и время элонгации варьируют). Синтетические олигонуклеотиды SEQex1DMR6-1-F, St-seq/guid1-DRM6/1-R, St-seq/guide2-DRM6/1-F, St-seq/guide2-DRM6/1-R, SEQex2CHL1-F, St-seq/guide2,3-CHL1-R использовались для амплификации протоспейсерных областей в генах мишенях перед секвенированием. Продукт реакции разделяли в 1%-ом агарозном геле с бромистым этидием в электрическом поле с помощью камеры для горизонтального электрофореза Sub-Cell GT (Bio-Rad, США). Фрагмент после электрофореза визуализировали с помощью системы Gel Doc 2000 (Bio-Rad). После этого необходимые для дальнейшей работы продукты амплификации выделяли из 1%-го агарозного геля с помощью набора реагентов Gene Jet™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) по методике изготовителя. С выделенным из геля продуктом ставили секвенирующую ПЦР с наборами реагентов BrilliantDye™ Terminator Cycle

Sequencing Kit v.3.1 (NimaGen, Нідерланды) і AMGene Dye v3.1 (Рэспубліка Беларусь) і сінтэтычнымі олигонуклеотидамі, прадставленымі ў табл. 2, на генетычным аналізатаре Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Аналіз атрычаных нуклеотыдных паслядоўнасцей выконваўся з дапамогай праграмы SnapGene Viewer 6.0, базы даных NCBI і онлайн-інструментаў аналізу даных ICE CRISPR Analysis Tool v3.0 і TIDE.

Результаты і іх абсуджэнне. Большасць патогенаў для падаўлення ці обхода імунітэта раслін і для ўстаноўлення сумеснага ўзаемадзеяння з хазіяном у працэсе эвалюцыі прыобрэлі прыспасобленне, пазваляючае патогену ствараць пільныя структуры, такія як гаусторыі, ўнутры клеткі хазіяна для атрымання пільных рэчываў [6]. Усе гены раслін, спосабаваючыя інфіцыраванню і падтрыманню сумеснасці патогена з хазіяном, на сённяшні дзень, як правіла, вызначаюцца як гены восприимчивости (S). Мутацыі ў S-генах могуць вызываць устойлівасць к патогенам у раслін з-за адсутнасці сістэмы прыспасоблення сумеснага ўзаемадзеяння «хазіян-патоген», так як парушаюцца механізмы прэ-пронікнення (распазнаванне хазіяна і пранікненне) ці спецыфічныя механізмы пост-пронікнення (полученне пільных рэчываў). Выкарыстанне S-генаў у якасці альтэрнатывы можа забяспечыць адносна шырокі спектр устойлівасці ў раслін, вызываючы доўгую і канстытутыўную абарону. Было паказана, што к такім генам адносяцца гены картофеля *CHLI* і *DMR6-1* і для атрымання раслін з мутацыямі ў генах восприимчивости можа быць выкарыстана тэхналогія геномнага рэдакціравання на аснове сістэмы CRISPR/Cas9. Ген *CHLI* кодзіруе брасіностероід-чувствітэльны фактар транскрыпцыі хазіяна CIB1/HBI1-like 1, ад якога залежыць узровень экспрэсіі бялкоў сямейства BSL (BRI1-SUPPRESSOR1-like). BSL-белкі з'яўляюцца фактарамі восприимчивости раслін к заражэнню фітофторозам і, следоўна, пры экспрэсіі ў геноме *S. tuberosum* гена *CHLI* ўзмацняецца калонізацыя *P. infestans* і парушаецца працэс нармальнага апоптоза, пазваляючы фітофторе неогранічана размнажацца, што прыводзіць к заражэнню і гібелі раслін [7, 8]. Ген *DMR6-1* таксама класіфіцыруецца як ген восприимчивости (S), які важны для ўспешнага заражэння патогенам. Потэра функцыі гена *DMR6-1* забяспечвае шырокі спектр устойлівасці к захворванням у томатаў і павышаную ўстойлівасць к *P. infestans* у картофеля. Ген *DMR6-1 S. tuberosum* кодзіруе 2-оксоглутарат (2OG) і Fe(II)-залежную аксігеназу, якая валодае актывнасцю 5-гідроксилазы саліцылавой кіслоты (SA) і, такім чынам, зніжае актывны пул SA [9]. Пры нокаўце гэтых генаў раслін прыобрэталі ўстойлівасць к фітофторозу без якіх-лібо фенатыпічных змяненняў [10–12]. Для стабільнай інтэграцыі сістэмы CRISPR/Cas9 ў раслінны геном мы выкарысталі *Agrobacterium*-опосрадаваную трансфармацыю ліставых дыскаў і частэй сцябла 3–4-недзельных раслін картофеля, вырашаных ў асептычных умовах. Гэтым метадам было атрымана 288 першачных трансфармантаў T₀ пакалення сортаў картофеля беларускай селекцыі Першацвет, Красавік, Юлія (табл. 3).

Табліца 3. Частота *Agrobacterium*-опосрадаванай трансфармацыі ліставых дыскаў і частэй сцябла картофеля сортаў беларускай селекцыі

Table 3. Frequency of the *Agrobacterium*-mediated transformation of the potato leaf discs and stem parts of Belarusian breeding varieties

Сорт	Кол-во эксплантов, шт.	Кол-во регенерантов/трансформантов, шт.	Частота регенерации, %	Частота трансформации, %
Першацвет	408	200/114	49,02	27,94
Красавік	358	134/63	37,43	17,60
Юлія	439	243/111	55,35	25,28

Как видно из данных, представленных в табл. 3, частота регенерации и трансформации варьировала в зависимости от сорта и составила 37,43–55,35 и 17,60–27,94 % соответственно. Максимальными показателями обладал сорт Першацвет: частота регенерации – 49,02 %, частота трансформации – 27,94 %.

Молекулярно-генетический анализ первичных трансформантов картофеля T₀ поколения выявил присутствие в их геноме инсерции экспрессионной кассеты из бинарного вектора *pRGEB31*, содержащей *OsU3*-промотор для малых РНК, спейсерную последовательность, RNA scaffold, терминатор транскрипции для РНК-полимеразы III, CaMV 35S-промотор и нопалинсинтазный терминатор (*T-nos*) (рис. 1).

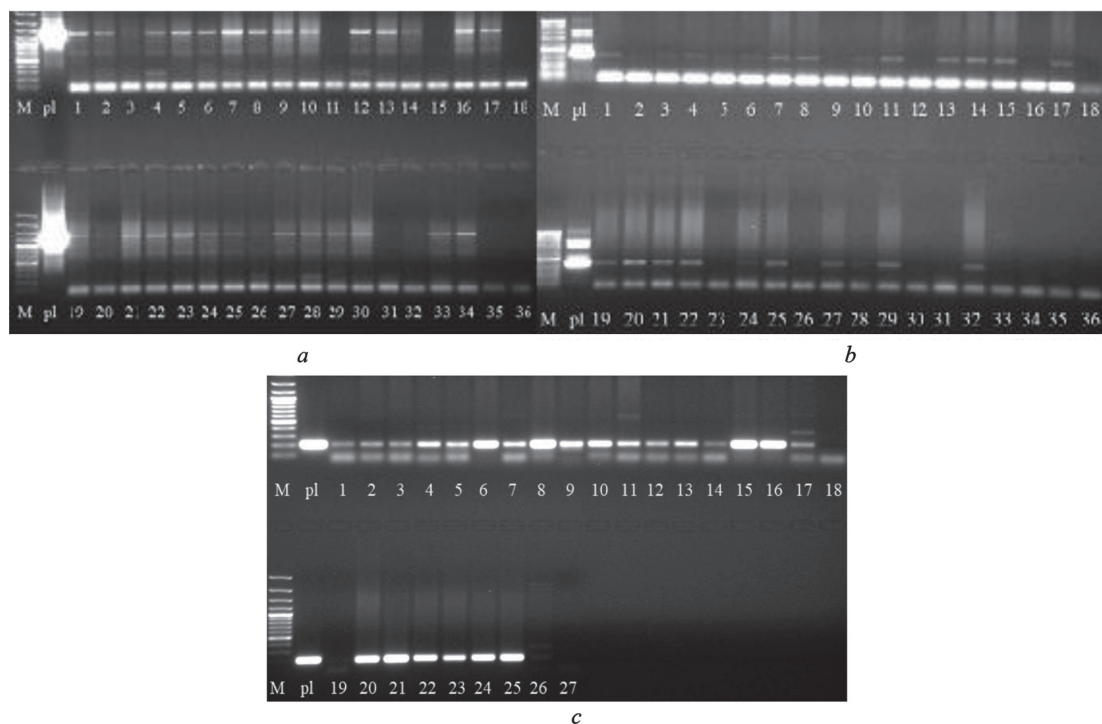


Рис. 1. *a*) электрофореграмма ПЦР-продукта (1 398 п. н.) геномной ДНК трансгенных растений картофеля T_0 поколения с праймерами U3-F и 35-R: М – маркер молекулярного веса Gene Ruler 100 bpPlus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), pl – положительный контроль (ДНК плазмиды *pRGEB31*), 1–34 – ДНК первичных трансформантов картофеля, 35 – ДНК растения картофеля дикого типа, 36 – отрицательный контроль; *b*) электрофореграмма ПЦР-продукта (346 п. н.) геномной ДНК трансгенных растений картофеля T_0 поколения с праймерами 35-f и 35-R: М – маркер молекулярного веса DNA Ladder MP 100 bp (ОДО «Праймтех»), pl – положительный контроль (ДНК плазмиды *pRGEB31*), 1–17, 19–33 – ДНК первичных трансформантов картофеля, 34, 35 – ДНК растений картофеля дикого типа, 36 – отрицательный контроль; *c*) электрофореграмма ПЦР-продукта (203 п. н.) геномной ДНК трансгенных растений картофеля T_0 поколения с праймерами Tnos-F и Tnos-R: М – маркер молекулярного веса Gene Ruler 100 bpPlus DNA Ladder, pl – положительный контроль (ДНК плазмиды *pRGEB31*), 1–17, 19–26 – ДНК первичных трансформантов картофеля, 18 – ДНК растения картофеля дикого типа, 27 – отрицательный контроль

Fig. 1. *a*) electropherogram of the PCR product (1,398 bp) of the genomic DNA of the transgenic potato plants of the T_0 generation with U3-F and 35-R primers: M – the molecular weight marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), pl – positive control (*pRGEB31* plasmid DNA), 1–34 – DNA of primary potato transformants, 35 – DNA of the wild-type potato plant, 36 – negative control; *b*) electropherogram of the PCR product (346 bp) of the genomic DNA of the transgenic potato plants of the T_0 generation with 35-f and 35-R primers: M – the molecular weight marker (100 bp DNA Ladder, Primetech, Belarus), pl – positive control (*pRGEB31* plasmid DNA), 1–17 and 19–33 – DNA of primary potato transformants, 34, 35 – DNA of wild-type potato plants, 36 – negative control; *c*) electropherogram of the PCR product (203 bp) of the genomic DNA of the transgenic potato plants of the T_0 generation with Tnos-F and Tnos-R primers: M – the molecular weight marker (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), pl – positive control (*pRGEB31* plasmid DNA), 1–17 and 19–26 – DNA of primary potato transformants, 18 – DNA of wild-type potato plants, 27 – negative control

Из данных, представленных на электрофореграммах (рис. 1), видно, что 83 % первичных трансформантов картофеля являются трансгенными и несут вставку экспрессионной кассеты с регуляторными элементами и элементами системы CRISPR/Cas9, а остальные 17 % не имеют инсерции Т-ДНК, что может быть связано как с устойчивостью к антибиотику в культуре *in vitro* картофеля за счет самоклональной изменчивости, так и с процессом трансгенеза [13, 14].

Для эффективного и точного редактирования генома требуется быстрый, качественно-количественный и недорогой анализ оценки нокаутных генотипов. Результаты эксперимента по редактированию с помощью системы CRISPR/Cas9 непредсказуемы и приводят к образованию гетерогенной популяции клеток, и не сразу понятно, произошло редактирование или нет и следует ли продолжать эксперимент. Для этого разработаны различные методы для идентификации нока-

утных последовательностей целевых локусов. Одним из таких методов является анализ секвеннограмм на наличие соматических мутационных событий в растительном геноме, индуцированных системами CRISPR/Cas, с помощью онлайн-инструментов ICE CRISPR Analysis Tool и TIDE. Алгоритмы ICE CRISPR Analysis Tool и TIDE являются точными, воспроизводимыми и надежными, их можно использовать для точного определения спектра и частоты целевых мутаций, генерируемых в пуле клеток с помощью инструментов редактирования генома, таких как CRISPR/Cas9, TALEN и ZFN. Кроме этого, онлайн-инструменты позволяют обнаруживать мутационные события без ограничения их размера, индуцированные различными системами CRISPR/Cas с одной или несколькими направляющими РНК, точно определять положение вставленных и удаленных оснований в ДНК как из клонированных, так и из объемных популяций клеток и проводить анализ в экспериментах, потенциально использующих любую конфигурацию последовательностей донорской ДНК, систем CRISPR/Cas и эндогенных путей репарации ДНК [15–17].

События направленного мутагенеза в геноме сортов картофеля белорусской селекции Красавик, Першацвет, Юлия, индуцированные системой CRISPR/Cas9, изучались в функционально значимых областях гена *StDMR6-1* в положениях 11–357 п. о. 1-го экзона и 6 023–6 403 п. о. 4-го экзона и гена *StCHL1* в положении 1 081–1 627 п. о. 4-го экзона. Оценка мутаций инсерционно-делеционного типа в гетерогенных популяциях клеток была выполнена на случайной выборке, состоящей из 161 трансгенного растения картофеля T₀ поколения, с помощью онлайн-инструментов, описанных выше.

Анализ спектра мутационных событий пула нуклеотидных последовательностей ДНК трансгенных растений *S. tuberosum* сортов Першацвет и Юлия в функционально значимых областях гена *StDMR6-1* с помощью онлайн-инструмента анализа данных ICE CRISPR Analysis Tool показал частоту мутации инсерционно-делеционного типа 66 и 85 % соответственно (рис. 2).

Из данных, представленных на рис. 2, а, видно, что в геноме картофеля сорта Першацвет 1 % нокаутных изменений – это инсерция 10 п. о., остальные 65 % имеют делеционный характер от 1 до 30 п. о. (из них 49 % приходится на делецию в 1 п. о.). Анализ мутационных событий в геноме картофеля сорта Юлия выявил, что 77 % являются инсерцией в 1 п. о., а оставшиеся 8 % – делецией от 8 до 28 п. о. (рис. 2, б). При этом видно, что частота мутации инсерционно-делеционного типа для сорта Першацвет составляет 66 % от общего числа проанализированных геномов при $R^2 = 0,71$, для сорта Юлия – 85 % от общего числа проанализированных геномов при $R^2 = 0,85$. При этом 64 % (сорт Першацвет) и 85 % (сорт Юлия) мутаций приводят к сдвигу рамки считывания в последовательности гена и, как следствие, образованию стоп-кодонов, что влечет за собой изменение функциональной активности гена-мишени.

При использовании веб-инструмента TIDE для анализа секвеннограмм была показана аналогичная картина результатов анализа данных для гена *StDMR6-1*, как и при использовании онлайн-инструмента ICE CRISPR Analysis Tool (рис. 3).



Рис. 2. Анализ присутствия мутационных событий в гене *StDMR6-1*, индуцированных системой CRISPR/Cas9, в геномах трансгенных растений *S. tuberosum* сортов белорусской селекции Першацвет (а) и Юлия (б) с помощью онлайн-инструмента анализа данных ICE CRISPR Analysis Tool

Fig. 2. Analysis of the presence of mutational events in the *StDMR6-1* gene induced by CRISPR/Cas9 system in the genomes of the transgenic *S. tuberosum* plants of the Belarusian breeding varieties Pershatsvet (a) and Yuliya (b) using the ICE CRISPR Analysis Tool for online data analysis

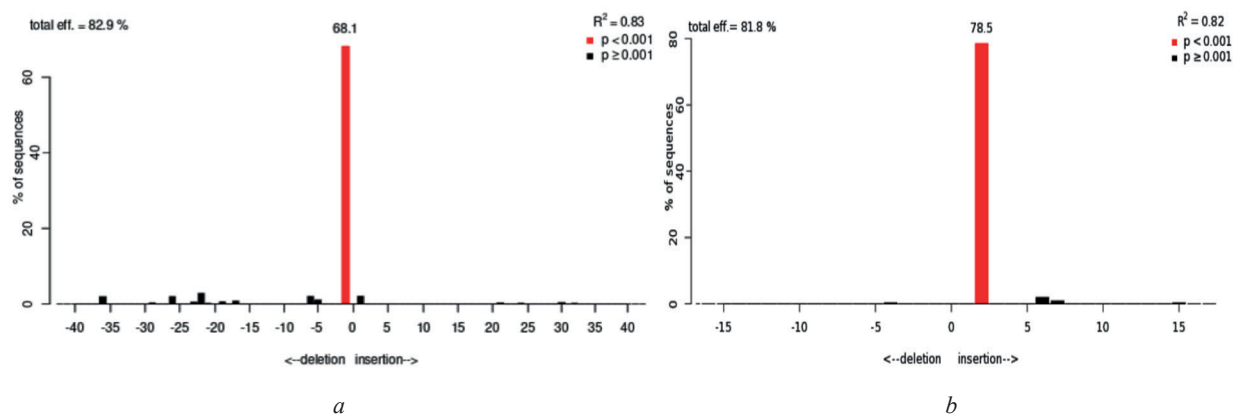


Рис. 3. Анализ присутствия мутационных событий в гене *StDMR6-1*, индуцированных системой CRISPR/Cas9, в геномах трансгенных растений *S. tuberosum* сортов белорусской селекции Першацвет (а) и Юлия (б) с помощью онлайн-инструмента анализа данных TIDE

Fig. 3. Analysis of the presence of mutational events in the *StDMR6-1* gene induced by CRISPR/Cas9 system in the genomes of the transgenic *S. tuberosum* plants of the Belarusian breeding varieties Pershatsvet (a) and Yuliya (b) using the online data analysis tool TIDE

Как видно из данных, отображенных на рис. 3, в ампликонах гена-мишени *StDMR6-1* сорта Першацвет в положении 11–357 п. о. 1-го экзона наиболее распространенной мутацией являлась делеция –1 позиции (68,1 %), остальные 14,8 % также приходились в основном на делеции при $p \geq 0,001$. В геноме сорта Юлия в положении 132–154 п. о. 1-го экзона мутацией с наибольшей частотой встречаемости была инсерция в положении +1 с частотой 78,5 % при $p < 0,001$, а остальные 3,3 % также являлись инсерцией в 6–7 п. о. при $p \geq 0,001$. При этом из анализируемых данных видно, что общая эффективность для сорта Першацвет составляла 82,9 % при $R^2 = 0,83$, для сорта Юлия – 81,8 % при $R^2 = 0,82$ от общего числа проанализированных геномов. Выявленные мутационные события в геномах трансформантов T_0 поколения картофеля сортов Першацвет и Юлия являются причиной изменения транскрипции гена-мишени за счет сдвига рамки считывания, приводящей к образованию стоп-кодонов.

Следовательно, подобно общему проценту мутационных событий, сравнение результатов анализа данных секвенограмм, полученных с помощью веб-инструментов ICE CRISPR Analysis Tool и TIDE, показало близкое совпадение по частоте мутаций, а именно, вариация для сорта Першацвет составила 2,1 %, вариация для сорта Юлия – 6,5%. При этом разница в общей эффективности нокаутов при использовании всех веб-инструментов для сорта Першацвет не превысила 16,9 %, а для сорта Юлия – 3,2 %.

В результате использования алгоритмов веб-инструментов ICE CRISPR Analysis Tool и TIDE для анализа секвенограмм методом разложения было выявлено, что из 161 трансформанта картофеля сортов белорусской селекции Першацвет, Красавик, Юлия T_0 поколения 84 имели мутантные последовательности в генах мишенях *StCHL1* и *StDMR6-1*. Так, среди образцов сорта Першацвет события генетического редактирования выявлены у 45 образцов. Из них 8 образцов несли мутации в генах *StCHL1* и *StDMR6-1* одновременно, 36 – в гене *StDMR6-1*, 1 – в гене *StCHL1*. Среди образцов, созданных на основе сорта Юлия, в 4 выявлены мутации в генах *StCHL1* и *StDMR6-1* одновременно, в 29 – в гене *StDMR6-1*, в 3 – в гене *StCHL1*. Для сорта Красавик удалось получить 3 генетически отредактированных растения: 2 – с мутациями в генах *StCHL1* и *StDMR6-1* одновременно и 1 – с отредактированным геном *StCHL1*. При этом эффективность мутагенеза в генах-мишенях, рассчитанная от общего числа проанализированных геномов, составила 52,17 % с частотой встречаемости индуцированных белком Cas9 мутационных событий от 1 до 99,2 %. Средняя эффективность инделирования в отдельных генотипах сортов картофеля белорусской селекции Першацвет, Красавик, Юлия равнялась 70,84 %. В геноме сорта Красавик индуцировать мутации (делеции размером 25–38 п. о.) посредством эндонуклеазы Cas9 удалось с частотой, не превышающей 5 %, при $R^2 = 0,92$ (рис. 4–6).

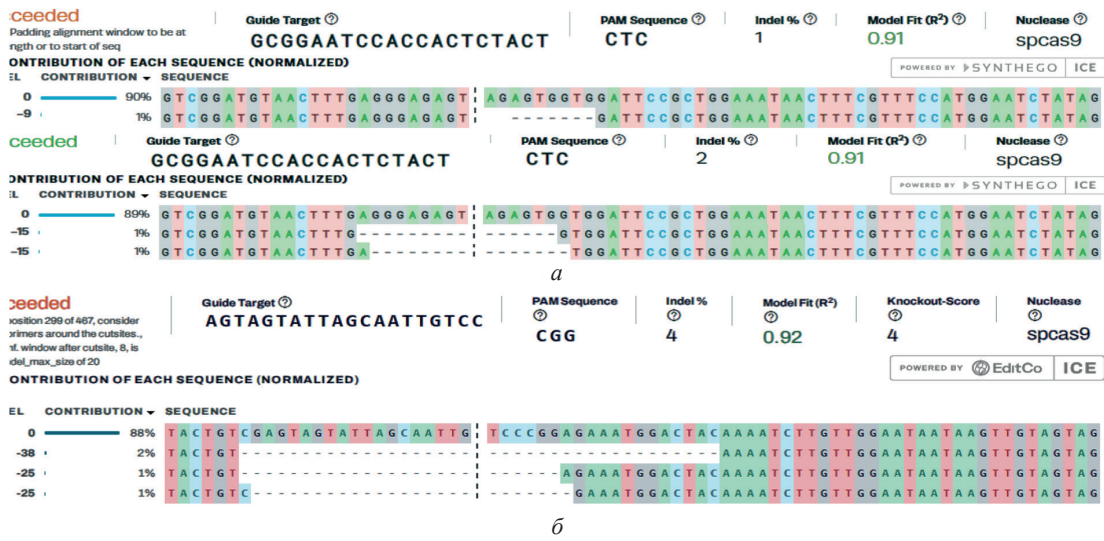


Рис. 4. Анализ присутствия мутационных событий в гене *StDMR6-1*, индуцированных системой CRISPR/Cas9, в геноме трансгенных растений *S. tuberosum* сортов белорусской селекции Першацвет (а), Красавик (б) с помощью онлайн-инструмента анализа данных ICE CRISPR Analysis Tool
 Fig. 4. Analysis of the presence of mutational events in the *StDMR6-1* gene induced by CRISPR/Cas9 system in the genome of the transgenic *S. tuberosum* plants of the Belarusian breeding varieties Pershatsvet (a) and Krasavik (b) using the ICE CRISPR Analysis Tool for online data analysis

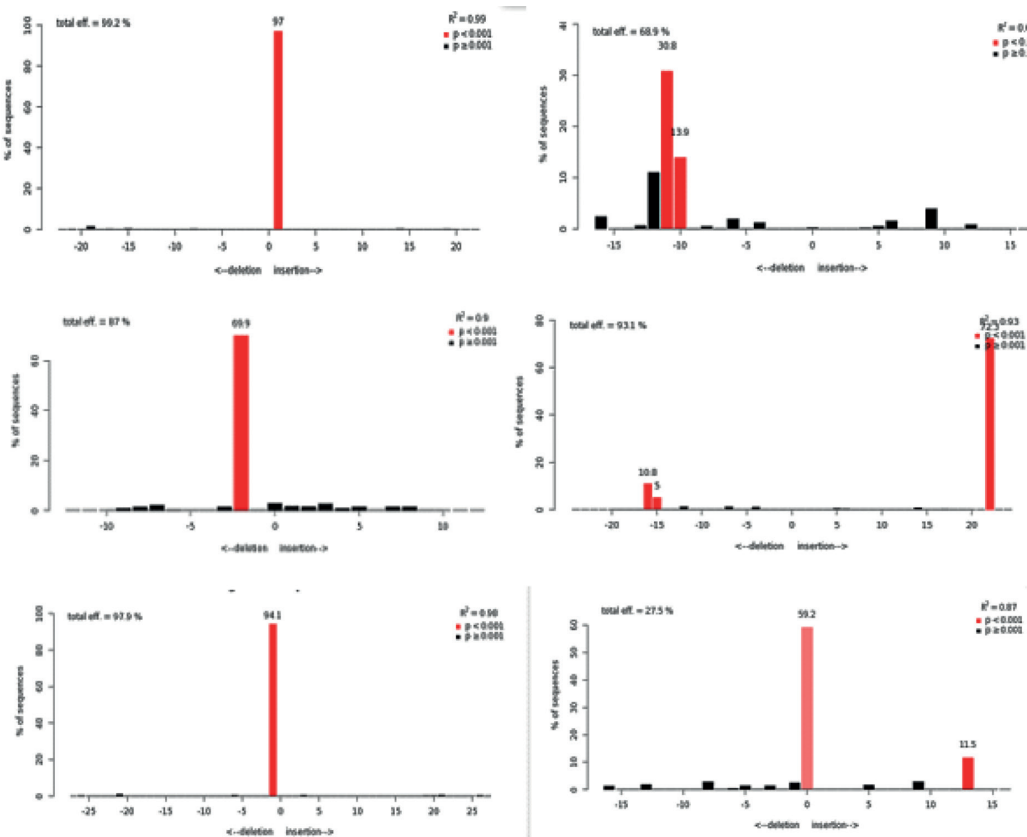


Рис. 5. Анализ присутствия мутационных событий с различной частотой в генах *StCHL1* и *StDMR6-1*, индуцированных системой CRISPR/Cas9, в геномах трансгенных растений *S. tuberosum* сорта белорусской селекции Юлия с помощью онлайн-инструмента анализа данных TIDE
 Fig. 5. Analysis of the presence of mutational events with varying frequency in the *StCHL1* and *StDMR6-1* genes induced by CRISPR/Cas9 system in the genomes of the transgenic *S. tuberosum* plants of the Belarusian breeding variety Yuliya using the online data analysis tool TIDE

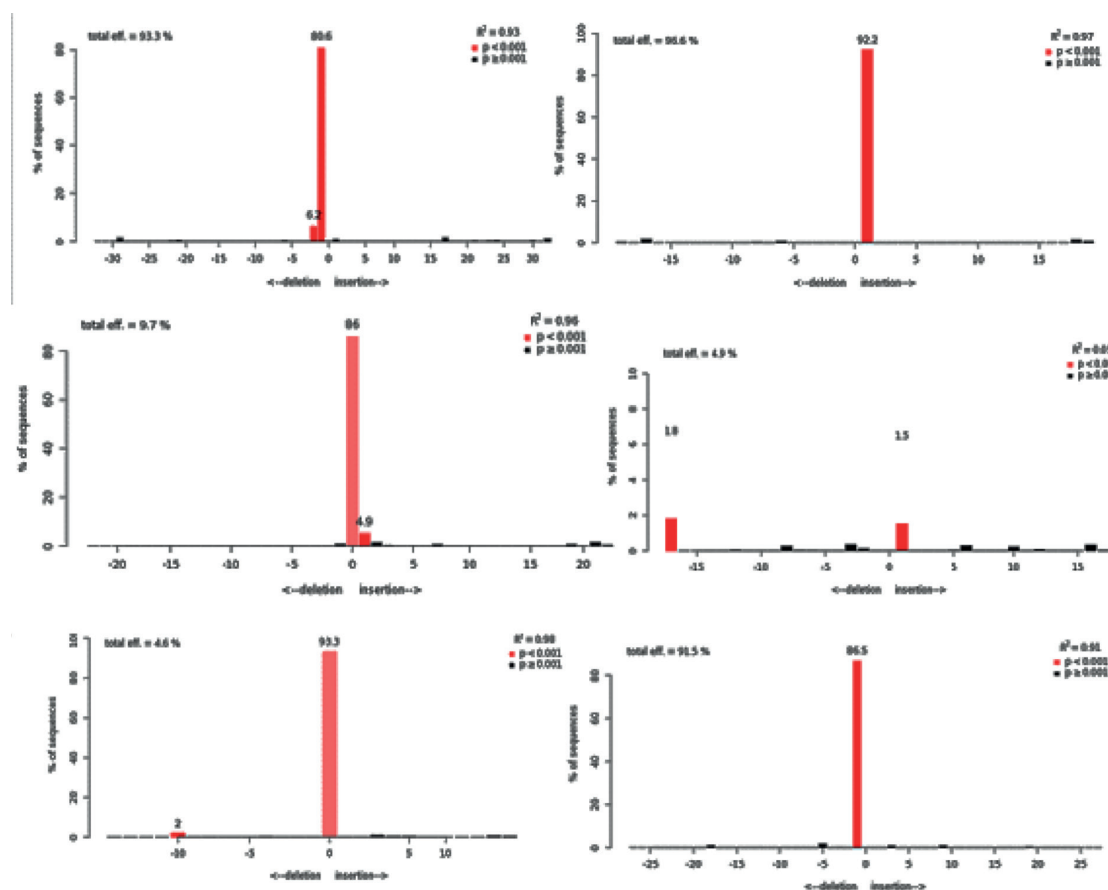


Рис. 6. Анализ присутствия мутационных событий различной частоты в генах *StCHL1* и *StDMR6-1*, индуцированных системой CRISPR/Cas9, в разных протоспейсерах в геномах трансгенных растений *S. tuberosum* сорта белорусской селекции Першацвет с помощью онлайн-инструмента анализа данных TIDE

Fig. 6. Analysis of the presence of mutational events with varying frequency in the *StCHL1* and *StDMR6-1* genes induced using CRISPR/Cas9 system in various protospacers in the genomes of the transgenic *S. tuberosum* plants of the Belarusian breeding variety Pershatsvet using the online data analysis tool TIDE

У остальной части трансформантов не было обнаружено мутированных последовательностей в целевых генах, что может быть связано как с процессами репарации внесенных разрывов эндонуклеазой Cas9 в нити ДНК, так и с нарушением функциональной активности системы CRISPR/Cas9 в геноме этих растений [18, 19]. Также на эффективность может влиять не только уровень нарабатываемого продукта в клетке (в нашем случае белка Cas9 и гидРНК), но и способ доставки и место встраивания элементов системы CRISPR/Cas9 в реципиентном геноме [20–22].

На основе отдельных фаз процессов взаимодействия хозяина и патогена выделяют три основных механизма, посредством которых S-гены способствуют восприимчивости и развитию инфекции: базовая совместимость, облегчающая распознавание хозяина и проникновение, механизм негативной регуляции иммунной сигнализации и механизм, обеспечивающий устойчивую совместимость, удовлетворяющую метаболические или структурные потребности, способствующие пролиферации патогена. Все это указывает на то, что растение содержит компоненты, которые используются нитчатыми патогенами в качестве важных сигналов развития патогенности, а растительные гены, участвующие в синтезе таких соединений, способствуют восприимчивости и могут рассматриваться как S-гены [23, 24]. В работе в качестве генов восприимчивости нами были выбраны гены картофеля *StCHL1* и *StDMR6-1*, при нокауте которых растение приобретает конститутивную неспецифическую устойчивость к патогенам. При этом понимание результатов редактирования, которые вызывает направленный сайт-специфический мутагенез, имеет решающее значение, особенно при индуцировании мутационных событий инсерционно-делеционного типа посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), направленных

на разрушение функции гена. Для анализа результатов редактирования реципиентного генома картофеля, а именно выбранных нами в качестве мишеней генов *CHLI* и *DMR6-1*, мы использовали 2 широко распространенных метода (TIDE, ICE CRISPR Analysis Tool), и при сравнительном анализе данных было показано, что размер и точность инделирования, выявленного веб-инструментом TIDE, коррелируют с инделированием, полученным Synthego, при $R^2 = 0,69$ и выше. Из данных, представленных на рис. 4–6, видно, что нокаут различных функционально значимых кодирующих последовательностей генов *StCHLI* и *StDMR6-1* удалось индуцировать с различной частотой мутаций инсерционно-делеционного типа от 1 до 99,2 %, при этом основным типом мутации являлись как инсерции в 1 п. о., так и делеции в 1 п. о. Эффективность направленного мутагенеза генома картофеля, а именно генов-мишеней *StCHLI* и *StDMR6-1*, составляла 52,17 %.

Заключение. В результате *Agrobacterium*-опосредованной трансформации сортов картофеля белорусской селекции Юлия, Першацвет, Красавик векторными генетическими конструкциями, несущими в своем составе систему CRISPR/Cas9 для нокаута различных функционально значимых кодирующих последовательностей генов *StCHLI* и *StDMR6-1*, было получено 288 трансгенных растений T_0 поколения. Из 288 трансгенных растений картофеля T_0 поколения 161 растение было проанализировано на наличие мутационных событий инсерционно-делеционного типа, индуцированных системой CRISPR/Cas9, с использованием данных, полученных методом секвенирования по Сэнгеру. При этом из 161 трансформанта T_0 поколения 84 имели мутантные последовательности генов *StCHLI* и *StDMR6-1* с частотой встречаемости мутаций от 1 до 97 % при $p < 0,001$ и 99,2 % при $p \geq 0,001$ в зависимости от сорта.

Таким образом, с помощью системы CRISPR/Cas9 впервые в Республике Беларусь получены генетически отредактированные растения картофеля сортов белорусской селекции Юлия, Першацвет, Красавик, несущие мутации в генах *StCHLI* и *StDMR6-1*, приводящие к сдвигу рамки считывания и, как следствие, к нокауту генов. Данные растения в дальнейшем планируется оценить на устойчивость к фитофторе.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Работа выполнена в рамках отдельного проекта фундаментальных и прикладных исследований НАН Беларуси «Создать растения картофеля, несущие генетически отредактированные с помощью системы CRISPR/Cas9 гены регуляторы защитных реакций *StDMR6-1* и *StCHLI*, для повышения устойчивости к фитофторозу» и при поддержке гранта БРФФИ № B23-062.

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of a separate project of fundamental and applied research of the National Academy of Sciences of Belarus “To create potato plants carrying genetically edited using the CRISPR/Cas9 system genes regulating defense reactions, *StDMR6-1* and *StCHLI*, to increase resistance to late blight” and with the support of the BRFFR grant No. B23-062.

Список использованных источников

1. Potato. Nutrition and Food Security / P. Raigond, B. Singh, S. Dutt, S. K. Chakrabarti – Singapore: Springer, 2020. – 287 p.
2. The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agri-food Systems / A. Devaux, J.-P. Goffart, P. Kromann [et al.] // Potato Research. – 2021. – Vol. 64, N 4. – P. 681–720. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>
3. Fry, W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer / W. Fry // Molecular Plant Pathology. – 2008. – Vol. 9, N 3. – P. 385–402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>
4. Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance / K. Sun, A.-M. A. Wolters, J. H. Vossen [et al.] // Transgenic Research. – 2016. – Vol. 25, N 5. – P. 731–742. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9964-2>
5. Шишлова-Соколовская, А. М. Создание векторных конструкций, несущих CRISPR/Cas9 систему, для направленного мутагенеза генов *CHLI* и *DMR6-1 Solanum tuberosum* / А. М. Шишлова-Соколовская, О. Ю. Урбанович // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси; редкол.: А. В. Кильчевский (гл. ред.) [и др.]. – Мн., 2025. – Т. 38. – С. 24–35.
6. Jones, J. D. G. The plant immune system / J. D. G. Jones, J. L. Dangl // Nature. – 2006. – Vol. 444, N 7117. – P. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
7. AVR2 Targets BSL Family Members, Which Act as Susceptibility Factors to Suppress Host Immunity / D. Turnbull, H. Wang, S. Breen [et al.] // Plant Physiology. – 2019. – Vol. 180, N 1. – P. 571–581. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01143>
8. RXLR Effector AVR2 Up-Regulates a Brassinosteroid-Responsive bHLH Transcription Factor to Suppress Immunity / D. Turnbull, L. Yang, S. Naqvi [et al.] // Plant Physiology. – 2017. – Vol. 174, N 1. – P. 356–369. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01804>

9. Vlot, A. C. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease / A. C. Vlot, D. A. Dempsey, D. F. Klessig // *Annual Review of Phytopathology*. – 2009. – Vol. 47. – P. 177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
10. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes / N. P. Kieu, M. Lenman, E. S. Wang [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11, N 1. – Art. 4487. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>
11. CRISPR/Cas9 genome editing of potato *StDMR6-1* results in plants less affected by different stress conditions / M. Karlsson, N. P. Kieu, M. Lenman [et al.] // *Horticulture Research*. – 2024. – Vol. 11, N 7. – Art. uhae130. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae130>
12. CRISPR/Cas9 editing of *Downy mildew resistant 6 (DMR6-1)* in grapevine leads to reduced susceptibility to *Plasmopara viticola* / S. Djennane, S. Gersch, F. Le-Bohec [et al.] // *Journal of Experimental Botany*. – 2024. – Vol. 75, N 7. – P. 2100–2112. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad487>
13. Маренкова, Т. В. Мозаичный характер экспрессии трансгенов у растений / Т. В. Маренкова, Д. Б. Логинова, Е. В. Дейнеко // *Генетика*. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 293–306.
14. Маренкова, Т. В. Особенности экспрессии чужеродных генов в сложноорганизованных инсерциях у трансгенных растений табака с мозаичным характером проявления гена *nrpII* / Т. В. Маренкова, В. В. Кузнецов, Е. В. Дейнеко // *Генетика*. – 2021. – Т. 57, № 3. – С. 321–331.
15. Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data / D. Conant, T. Hsiau, N. Rossi [et al.] // *The CRISPR Journal*. – 2022. – Vol. 5, N 1. – P. 123–130. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0113>
16. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition / E. K. Brinkman, T. Chen, M. Amendola, B. Steensel // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, N 22. – P. e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>
17. Brinkman, E. K. Rapid Quantitative Evaluation of CRISPR Genome Editing by TIDE and TIDER / E. K. Brinkman, B. van Steensel // *CRISPR Gene Editing*. – 2019. – Vol. 1961. – P. 29–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_3
18. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants / X. Ma, Q. Zhang, Q. Zhu [et al.] // *Molecular Plant*. – 2015. – Vol. 8, N 8. – P. 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
19. Mikami, M. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice / M. Mikami, S. Toki, M. Endo // *Plant Cell Reports*. – 2015. – Vol. 34, N 10. – P. 1807–1815. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1826-5>
20. Xie, K. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System / K. Xie, Y. Yang // *Molecular Plant*. – 2013. – Vol. 6, N 6. – P. 1975–1983. <https://doi.org/10.1093/mp/sst119>
21. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system / Z. Feng, B. Zhang, W. Ding [et al.] // *Cell Research*. – 2013. – Vol. 23, N 10. – P. 1229–1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>
22. Schöb, H. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing / H. Schöb, C. Kunc, F. Meins // *Molecular and General Genetics MGG*. – 1997. – Vol. 256, N 5. – P. 581–585. <https://doi.org/10.1007/s004380050604>
23. Yi, M. Communication Between Filamentous Pathogens and Plants at the Biotrophic Interface / M. Yi, B. Valent // *Annual Review of Phytopathology*. – 2013. – Vol. 51. – P. 587–611. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172916>
24. Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism / K. Zhang, R. Halitschke, C. Yin [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 110, N 36. – P. 14807–14812. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302702110>

References

1. Raigond P., Singh B., Dutt S., Chakrabarti S. K. *Potato. Nutrition and Food Security*. Singapore, Springer, 2020. 287 p.
2. Devaux A., Goffart J.-P., Kromann P., Andrade-Piedra J., Polar V., Hareau G. The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agri-food. *Potato Research*, 2021, vol. 64, no. 4, pp. 681–720. <https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4>
3. Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 2008, vol. 9, no. 3, pp. 385–402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>
4. Sun K., Wolters A.-M. A., Vossen J. H., Rouwet M. E., Looen A. E. H. M., Jacobsen E. Visser R. G. F., Bai Y. Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic Research*, 2016, vol. 25, no. 5, pp. 731–742. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9964-2>
5. Shishlova-Sokolovskaya A. M., Urbanovich O. Yu. Designing vector constructs carrying CRISPR/Cas9 for the directed mutagenesis of the *Solanum tuberosum* *CHL1* and *DMR6-1* genes. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: collection of scientific papers]. Minsk, 2025, vol. 38, pp. 24–35 (in Russian).
6. Jones J. D. G., Dangl J. L. The plant immune system. *Nature*, 2006, vol. 444, no. 7117, pp. 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
7. Turnbull D., Wang H., Breen S., Malec M., Naqvi S., Yang L., Welsh L., Hemsley P., Zhendong T., Brunner F., Gilroy E. M., Birch P. R. J. AVR2 Targets BSL Family Members, Which Act as Susceptibility Factors to Suppress Host Immunity. *Plant Physiology*, 2019, vol. 180, no. 1, pp. 571–581. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01143>
8. Turnbull D., Yang L., Naqvi S., Breen S., Welsh L., Stepchens J., Morris J., Boevink P. C., Hedley P. E., Zhan J., Birch P. R. J., Gilroy E. M. RXLR Effector AVR2 Up-Regulates a Brassinosteroid-Responsive bHLH Transcription Factor to Suppress Immunity. *Plant Physiology*, 2017, vol. 174, no. 1, pp. 356–369. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01804>

9. Vlot A. C., Dempsey D. A., Klessig D. F. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, vol. 47, pp. 177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
10. Kieu N. P., Lenman M., Wang E. S., Petersen B. L., Andreasson E. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Scientific Reports*, 2021, vol. 11, no. 1, art. 4487. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>
11. Karlsson M., Kieu N. P., Lenman M., Marttila S., Resjo S., Zahid M. A., Andreasson E. CRISPR/Cas9 genome editing of potato *StDMR6-1* results in plants less affected by different stress conditions. *Horticulture Research*, 2024, vol. 11, no. 7, art. uhae130. <https://doi.org/10.1093/hr/uhae130>
12. Djennane S., Gersch S., Le-Bohec F., Piron M.-Ch., Baltenweck R., Lemaire O., Merdinoglu D., Hugueneu Ph., Nogue F., Mestre P. CRISPR/Cas9 editing of *Downy mildew resistant 6 (DMR6-1)* in grapevine leads to reduced susceptibility to *Plasmopara viticola*. *Journal of Experimental Botany*, 2024, vol. 75, no. 7, pp. 2100–2112. <https://doi.org/10.1093/jxb/erad487>
13. Marenkova T. V., Loginova D. B., Deineko E. V. Mosaic patterns of transgene expression in plants. *Russian Journal of Genetics*, 2012, vol. 48, no. 3, pp. 249–260. <https://doi.org/10.1134/S1022795412030088>
14. Marenkova T. V., Kuznetsov V. V., Deineko E. V. Features of expression of foreign genes in complex insertions in transgenic tobacco plants with a mosaic pattern of nptII gene expression. *Russian Journal of Genetics*, 2021, vol. 57, no. 3, pp. 319–328. <https://doi.org/10.1134/S1022795421030108>
15. Conant D., Hsiao T., Rossi N., Oki J., Maures T., Waite K., Yang J., Joshi S., Kelso R., Holden K., Enzmann B. L., Stoner R. Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. *The CRISPR Journal*, 2022, vol. 5, no. 1, pp. 123–130. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0113>
16. Brinkman E. K., Chen T., Amendola M., Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 22, p. e168. <https://doi.org/10.1093/nar/gku936>
17. Brinkman E. K., van Steensel B. Rapid Quantitative Evaluation of CRISPR Genome Editing by TIDE and TIDER. *CRISPR Gene Editing*, 2019, vol. 1961, pp. 29–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_3
18. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Z., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen S., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Z., Liu Y.-G. A Robust CRISPR/Cas9 System for Convenient, High-Efficiency Multiplex Genome Editing in Monocot and Dicot Plants. *Molecular Plant*, 2015, vol. 8, no. 8, pp. 1274–1284. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.04.007>
19. Mikami M., Toki S., Endo M. Parameters affecting frequency of CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis in rice. *Plant Cell Reports*, 2015, vol. 34, no. 10, pp. 1807–1815. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1826-5>
20. Xie K., Yang Y. RNA-Guided Genome Editing in Plants Using a CRISPR–Cas System. *Molecular Plant*, 2013, vol. 6, no. 6, pp. 1975–1983. <https://doi.org/10.1093/mp/sst119>
21. Feng Z., Zhang B., Ding W., Lio X., Yang D.-L., Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao Y., Zhu J.-K. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Research*, 2013, vol. 23, no. 10, pp. 1229–1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>
22. Schöb H., Kunc C., Meins F. Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular and General Genetics MGG*, 1997, vol. 256, no. 5, pp. 581–585. <https://doi.org/10.1007/s004380050604>
23. Yi M., Valent B. Communication Between Filamentous Pathogens and Plants at the Biotrophic Interface. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, vol. 51, pp. 587–611. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172916>
24. Zhang K., Halitschke R., Yin C., Lio C.-J., Gan S. S. Salicylic acid 3-hydroxylase regulates *Arabidopsis* leaf longevity by mediating salicylic acid catabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, vol. 110, no. 36, pp. 14807–14812. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302702110>

Інфармацыя аб аўтарах

Шышлова-Сокаловская Анастасія Михайловна – ст. науч. супрацоўнік. Інстытут генетыкі і цыталогіі НАН Беларусі (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: s_anastasia78@mail.ru

Неборская Валерыя Еўгеньевна – мл. науч. супрацоўнік. Інстытут генетыкі і цыталогіі НАН Беларусі (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: V.Tereshko@igc.by

Урбановіч Оксана Юр'евна – д-р біол. навук, прафесар, заведуючы лабараторыяй. Інстытут генетыкі і цыталогіі НАН Беларусі (ул. Ф. Скорины, 34, 220141, г. Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: O.Urbanovich@igc.by

Information about the authors

Anastasia M. Shishlova-Sokolovskaya – Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: s_anastasia78@mail.ru

Valeria E. Neborskaya – Junior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: V.Tereshko@igc.by

Oksana Yu. Urbanovich – D. Sc. (Biol.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skorina Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: O.Urbanovich@igc.b