

ISSN 1029-8940 (Print)  
 ISSN 2524-230X (Online)  
 УДК 577.29  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-298-308>

Поступила в редакцию 11.03.2024  
 Received 11.03.2024

**А. М. Шишлова-Соколовская, О. Ю. Урбанович**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

### **CRISPR/Cas9-ОПОСРЕДОВАННЫЙ НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ ГЕНА *PDS NICOTIANA TABACUM L.***

**Аннотация.** Система CRISPR/Cas9 является одним из эффективных инструментов для редактирования геномов растений. С помощью этой системы нами получены трансформанты *Nicotiana tabacum* с различным фенотипом, несущие в своем геноме мутационные события инсерционно-делеционного типа в гене *PDS*, кодирующем фермент 15-цис-фитоендесатуразу. Эндогенный ген табака *NtPDS* был выбран в качестве мишени, так как внесение мутаций в его нуклеотидную последовательность позволяет легко визуализировать признаки. Тетрааллельный нокаут гена *NtPDS* приводил к полному альбинизму растений. Трансформанты-альбиносы отличались более медленным ростом, карликовостью и были нежизнеспособны при культивировании *in vitro*. Мутанты с пестролистностью в культуре *in vitro* образовывали корни и не отличались от контрольных растений по размеру листьев. Анализ нуклеотидной последовательности протоспейсера гена мишени *NtPDS* был выполнен на случайной выборке, включавшей 21 трансгенное растение поколения T<sub>0</sub> с различным фенотипом – от полностью альбиносного до дикого типа. Результаты секвенирования показали, что все трансформанты с видимыми фенотипическими проявлениями несут мутантные последовательности в гене *NtPDS* с частотой 51,0–80,0 %, при этом эффективность направленного мутагенеза составила 33,33 %. У трансформантов с фенотипом дикого типа не обнаружено мутированных последовательностей в мишени.

**Ключевые слова:** система CRISPR/Cas9, гидовая РНК, PAM, *pRGEB31*, *NtPDS*, *Nicotiana tabacum*

**Для цитирования:** Шишлова-Соколовская, А. М. CRISPR/Cas9-опосредованный направленный мутагенез гена *PDS Nicotiana tabacum L.* / А. М. Шишлова-Соколовская, О. Ю. Урбанович // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. биол. наук. – 2024. – Т. 69, № 4. – С. 298–308. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-298-308>

**Anastasia M. Shishlova-Sokolovskaya, Oksana Yu. Urbanovich**

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

### **CRISPR/Cas9-MEDIATED SITE-DIRECTED MUTAGENESIS OF THE *PDS* GENE OF *NICOTIANA TABACUM L.***

**Abstract.** CRISPR/Cas9 system is one of the effective tools for editing plant genomes. Using the CRISPR/Cas9 system, we have obtained different-type *Nicotiana tabacum* transformants carrying in their genome the mutational events of insertion-deletion type in the *PDS* gene, encoding 15-cis-phytoene desaturase enzyme. The endogenous tobacco *NtPDS* gene was chosen as a target, since introducing mutations into its nucleotide sequence leads to appearing easily visualized characters. The tetra-allelic knockout of the *NtPDS* gene led to complete albinism in plants. Albino transformants were characterized by a slower growth, dwarfism, and were not viable when cultivated *in vitro*. Mutants with variegated leaves in the *in vitro* culture formed roots and did not differ from the control in leaf size. A nucleotide sequence of the protospacer of the target *NtPDS* gene was analyzed on a random sample, including 21 transgenic plants of the T<sub>0</sub> generation with different phenotypes – from completely albino to wild type. Sequencing results showed that all transformants with visible phenotypic manifestations carried mutant sequences in the *NtPDS* gene with a frequency of 51.0–80.0 %, while the efficiency of site-directed mutagenesis was 33.33 %. In transformants of a wild-type phenotype, no mutated sequences were detected in the target gene.

**Keywords:** CRISPR/Cas9 system, guide RNA, PAM, *pRGEB31*, *NtPDS*, *Nicotiana tabacum*

**For citation:** Shishlova-Sokolovskaya A. M., Urbanovich O. Yu. CRISPR/Cas9-mediated site-directed mutagenesis of the *PDS* gene of *Nicotiana tabacum L.* *Vesti Natsyonal'noi akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2024, vol. 69, no. 4, pp. 298–308 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2024-69-4-298-308>

**Введение.** Технология редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9 – относительно простой, но эффективный и высокоспецифичный инструмент, с помощью которого в определенные участки растительного генома можно вносить изменения, такие как инсерции, делеции, за-

мены нуклеотидов [1]. В результате может происходить нокаут генов, изменение их аллельного состава и уровня экспрессии. На сегодняшний день данная технология применяется для редактирования генома более 30 видов растений, включая такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как рис, соя, пшеница, кукуруза и картофель [2].

Эффективность данной технологии определяется рядом параметров: способом доставки генетического материала в растительную клетку, вариантом нуклеазы (Cas9 или ортологи), кодонным составом гена Cas9, регуляторными элементами (промотором, терминатором) гена Cas9 и гидовой РНК, структурой гидовой РНК. В примененной для редактирования различных геномов технологии CRISPR/Cas9 была использована одна объединенная направляющая РНК, содержащая последовательность из 20 п. о. (спейсер), комплементарную мишени (протоспейсеру) в геноме, и последовательность из 70 п. о. для образования комплекса Cas9 и геномной ДНК. При этом протоспейсерная последовательность должна содержать мотив 5'-NGG-3' (PAM), расположенный на 3'-конце мишени, для связывания белка Cas9 с ДНК и дальнейшего ее расщепления. Нуклеаза Cas9 содержит два каталитических домена: RuvC и C-концевой HNH. Каждый домен расщепляет одну из цепей ДНК, в результате чего образуются двухцепочечные разрывы ДНК на 3 п. о. выше мотива PAM [3, 4]. В эукариотических клетках репарацию двухцепочечных разрывов обеспечивают два основных механизма – NHEJ (nonhomologous end joining – негомологичное соединение концов) и HDR (homology directed repair – репарация на основе гомологичной рекомбинации) [5]. При репарации по типу NHEJ в месте разрыва могут происходить инсерции или делеции небольшой длины – до нескольких десятков пар нуклеотидов. Если место разрыва приходится на кодирующую область гена, возможен сдвиг рамки считывания, приводящий к его нокауту. Данный механизм действует на протяжении всего клеточного цикла и обладает высокой способностью к репарации, так как не требует шаблона репарации (сестринской хроматиды или гомолога) или интенсивного синтеза ДНК. NHEJ восстанавливает большинство типов поломок на порядок быстрее, чем HDR. В основном благодаря данному механизму происходит восстановление целостности нуклеотидной последовательности, нарушенной системой CRISPR/Cas9 [6–8]. При этом могут возникать индуцированные мутации различного типа, приводящие к изменению фенотипа отредактированного растения.

Цель исследования – определить, какие мутационные события имели место в гене *NtPDS* при геномном редактировании табака с помощью системы CRISPR/Cas9, и оценить их фенотипическое проявление.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования являлся табак *Nicotiana tabacum* сорта *Petit Havana* линии *SRI*, предметом исследования – ген *PDS* (Gene ID:107816873, updated on 13-Dec-2019) *N. tabacum*. Ген *NtPDS* кодирует фермент 15-цис-фитоендесатуразу. Изменения в работе данного фермента приводят к нарушению биосинтеза хлорофилла, каротиноидов и гиббереллинов, в результате чего у растений проявляется фенотип альбинизма и карликовости [9, 10].

**Создание трансгенных/отредактированных растений табака.** Для получения трансгенных растений табака нами использована система стабильной трансформации на основе Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens*. При создании векторной генетической конструкции выбрана высокоспецифичная gRNA5 (гидовая РНК) длиной 20 п. о., комплементарная протоспейсеру, находящемуся на 5-м экзоне гена *NtPDS* (3 085–3 105 п. о.). Разработанная последовательность gRNA5 клонирована по сайтам эндонуклеазы рестрикции *BsaI* в бинарный вектор *pRGEB31*. Полученную генетическую конструкцию *pRGEB31 + gRNA5-pds*, содержащую ген нуклеазы Cas9 и gRNA5, вводили в штаммы *A. tumefaciens* LBA4404 и EHA105 методом трехродительского скрещивания [11]. Жидкую культуру *A. tumefaciens* штаммов EHA105, LBA4404 культивировали в темноте в течение 24 ч при температуре 24 °С в 20 мл среды LB с добавлением антибиотиков канамицина и рифампицина в концентрациях 50 и 100 мг/л соответственно. С помощью полученной агробактериальной суспензии осуществляли инфицирование эксплантов. В качестве эксплантов использовали листья 3–4-недельных растений табака, выращенных в асептических условиях. В наших экспериментах для стабильной интеграции Т-ДНК использовано три способа *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

**Культивация на агаризованной среде.** Предварительно нарезанные растительные экспланты размером (0,3–0,5) × (0,3–0,5) см выкладывали на чашки Петри со средой СИМ (соли и витамины по Мурасиге-Скуга), 0,2 мг/л БАП (6-бензиламинопурин), 1 мг/л НУК (альфа-нафтилуксусная кислота), 30 г/л сахарозы, pH = 5,8) и агробактериальным газоном и культивировали в течение 24–48 ч в темноте при температуре 25 °С.

**Культивация в жидкой среде.** Листовые диски размером (0,3–0,5) × (0,3–0,5) см нарезали в присутствии агробактериальной суспензии и выдерживали 40 мин, а затем выкладывали на агаризованную среду СИМ и культивировали в течение 24–48 ч в темноте при температуре 25 °С.

**Вакуумная инфльтрация.** Экспланты с агробактериальной суспензией помещали в стерильную колбу Бюензена, из которой откачивался воздух до «эффекта кипения». Через 15–20 мин давление повышали до атмосферного, после чего экспланты культивировали на неселективной агаризованной среде СИМ до 48 ч в темноте при температуре 25 °С.

По завершении этапов трансформации экспланты переносили на среду СИМ с добавлением тиментина (250 мг/л) и гиргромацина (10 мг/л) и культивировали при 24/18 °С, 16/8-часовом фотопериоде и освещенности порядка 2 000–3 000 лк.

Дальнейшую клеточную дедифференциацию и непрямой морфогенез в культуре *in vitro* инициировали на агаризованных средах СИМ (МС соли и витамины, 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК, 30 г/л сахарозы, 250 мг/л тиментина, pH = 5,8) и RIM (МС соли и витамины, 0,05 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), 30 г/л сахарозы, 250 мг/л тиментина, pH = 5,8) с селективным агентом гиргромацином в концентрации 10 мг/л. Сформировавшиеся регенеранты переносили на безгормональную среду T-med (1/2 МС соли и витамины, 10 г/л сахарозы, 250 мг/л тиментина, pH = 5,8).

**Молекулярно-генетический анализ.** Геномную ДНК трансгенных растений табака поколения T<sub>0</sub>, 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 направленного сайт-специфического мутагенеза применяли методы ПЦР-анализа и секвенирования по Сэнгеру. При этом использовали праймеры, разработанные и апробированные *in silico* в программах SnapGene Viewer 6.0, Unipro UGENE 41.0, и базу данных NCBI (табл. 1).

Таблица 1. Последовательность и температура отжига синтетических олигонуклеотидов, использованных для анализа трансгенных растений табака поколения T<sub>0</sub>

Table 1. Sequence and annealing temperature of synthetic oligonucleotides used for analyzing transgenic tobacco plants of the T<sub>0</sub> generation

Олигонуклеотиды	Последовательность синтетических олигонуклеотидов, 5' → 3'	Температура отжига, °С
PDS-SEQ-F2	ttttacctgtcctgttggtgcatttctca	62
PDS-SEQ-R2	aattaacagataaaaaagataggcaaggc	57
35S-F	tcaacaagggtaatatccggaacctcctcgga	66
35S-R	agtccccgtgttctctccaaatgaaatgaac	56
Cas9-F	gccgacaagaagtacagcatcgccctggaca	69
Cas9-R	tcgcctcccagctgagacaggtcgatccgtgtc	71
U3-F	agcttaaggaatctttaacatacgaacagat	59

Объем смеси для амплификации одного образца составлял 25 мкл. В смесь входили следующие реагенты: 100 нг ДНК, 2,5 мкл 10× буфера с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Thermo Fisher Scientific, США), 2,5 мкл 10 мМ смеси нуклеотидов (dNTP) (Thermo Fisher Scientific), 2 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub> (Thermo Fisher Scientific), 2,5 мкл 4 пМ каждого из праймеров, 0,2 мкл 5 ед. Taq ДНК-полимеразы («Праймтех», Беларусь), 10,7 мкл H<sub>2</sub>O. Амплификацию проводили в амплификаторе BioRad с использованием следующей программы: денатурация – 94 °С, 4 мин; затем 35 циклов – 94 °С, 30 с, температура отжига праймеров (согласно табл. 1) – 45 с, 72 °С – 1 мин; ренатурация – 72 °С, 7 мин. Продукт реакции разделяли методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с бромистым этидием. Фрагмент ПЦР визуализировали с помощью системы Bio-Rad Gel Doc 2000.

Секвенирование по Сэнгеру выполнено на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, США) с помощью набора реагентов BrilliantDye™ Terminator (v.3.1) Cycle Sequencing Kit (NimaGen, ЕС) согласно протоколу изготовителя и праймеров, представленных в табл. 1. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы SnapGene Viewer 6.0, базы данных NCBI и онлайн-инструмента анализа данных ICE CRISPR Analysis Tool.

**Результаты и их обсуждение.** Табак (*N. tabacum*) является удобным модельным объектом для многих научных исследований, включая генетическую трансформацию [12]. Эндогенный ген табака *NtPDS* был выбран в качестве мишени, так как внесение мутаций в его нуклеотидную последовательность приводит к появлению легко визуализируемых признаков, таких как альбинизм и карликовость [13, 14]. На основе эталонной последовательности генома *N. tabacum* (NCBI ID: 425) и выбранного гена-мишени *NtPDS* с помощью онлайн-ресурсов для системы CRISPR/Cas9 нами разработана высокоспецифичная гидовая РНК (gRNA5) [11]. При ее выборе учитывали происхождение *N. tabacum*. Данный вид представляет собой аллотетраплоид ( $2n = 4 \times = 48$ ), возникший в результате гибридизации предковых видов *N. sylvestris* ( $2n = 24$ ; материнский донорский геном S, ID: 13135) и *N. tomentosiformis* ( $2n = 24$ ; отцовский донорский геном T, ID: 12239) [15]. Размер генома табака достаточно большой – ~4,5 Гб, с высоким содержанием повторяющихся элементов (>70 %). Оба субгенома тетраплоидного табака очень похожи на геномы предков, так как вид сформировался относительно недавно – менее 0,2 млн лет назад [16]. Чтобы избежать гомеологии мишени, произведен анализ нуклеотидных последовательностей предковых родительских геномов табака *N. tomentosiformis* и *N. sylvestris*, который показал полную комплементарность выбранной спейсерной последовательности генам, кодирующим фермент 15-цис-фитоендесатуразу *N. tomentosiformis* (Gene ID: 104107035, updated on 27-Oct-2021) и *N. sylvestris* (Gene ID: 104248773, updated on 2-Jun-2019), и наличие последовательности PAM на 3'-конце протоспейсера.

Разработанная gRNA5 комплементарна протоспейсеру 5-го экзона гена *NtPDS* в положении 3 085–3 105 п. о. К 3'-концу протоспейсера примыкает последовательность PAM (5'-NGG-3'), необходимая для связывания и внесения разрывов в ДНК эндонуклеазой Cas9, что было показано *in silico* (рис. 1). Данная gRNA5 была использована при создании векторной конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds* [11].

С помощью векторной генетической конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds* методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации получено 68 трансгенных растений табака поколения T<sub>0</sub>, которые

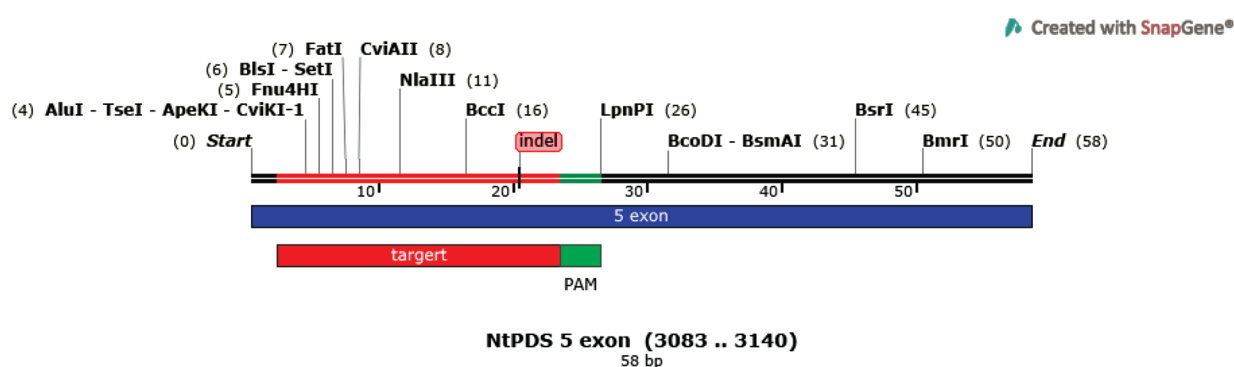


Рис. 1. Схема области 5-го экзона гена *NtPDS* *Nicotiana tabacum* сорта *Petit Havana* линии *SRI*, выбранной для направленного мутагенеза: 5 экзон – 5-й экзон гена мишени табака *NtPDS*; target – гидовая РНК, комплементарная 20 п. о. (3 085–3 105 п. о.) 5-го экзона гена *NtPDS*; PAM – мотив для специфического связывания белка Cas9 с мишенью, состоящий из 3 нуклеотидов (5'-NGG-3') и примыкающий к 3'-концевому участку гена *NtPDS*; indel – место, где эндонуклеаза Cas9 вносит разрыв в цепь ДНК целевого гена

Fig. 1. Scheme of the region of the 5th exon of the *Nicotiana tabacum* *NtPDS* gene of the *Petit Havana* variety of the *SRI* line selected for site-directed mutagenesis: 5 exon – 5th exon of the tobacco target *NtPDS* gene; target – gRNA, 20 bp (3 085–3 105 bp) complementary of the 5h exon of the *NtPDS* gene; PAM – reason for the specific binding of the Cas9 protein to the target consisting of 3 nucleotides (5'-NGG-3') and adjacent to the 3'-terminal region of the *NtPDS* gene; indel – the site where a break is introduced into the DNA chain of the target gene by Cas9 endonuclease

удалось укоренить. Способом кокультивации получено: на агаризованной среде – 19 трансформантов, в жидкой среде – 19, при вакуумной инфильтрации – 30 трансформантов.

Среди 68 трансгенных растений, способных к процессу ризогенеза, не наблюдалось исключительно альбиносного фенотипа, отражающего полную потерю функции гена *NtPDS*, так как регенеранты-альбиносы были нежизнеспособны и при длительном культивировании в культуре *in vitro* не образовывали корней и погибали. Из 68 трансгенных растений поколения  $T_0$  5 демонстрировали мозаичный фенотип, 4 из них не образовывали коробочек и были стерильными, остальные 63 растения фенотипически были идентичны дикому типу (табл. 2, рис. 2).

Таблица 2. Анализ фенотипа укорененных трансформантов табака поколения  $T_0$   
Table 2. Analysis of the phenotype of rooted tobacco transformants of the  $T_0$  generation

Фенотип	Способ трансформации					
	Кокультивация на агаризованной среде		Кокультивация в жидкой среде		Вакуумная инфильтрация	
	шт.	%	шт.	%	шт.	%
Мозаик	0	0	1	5,26	4	13,33
Дикий тип	19	100	18	94,74	26	86,67

Так как *N. tabacum* является тетраплоидом, для получения гомозиготной генетической модификации гена *PDS* (хлорофиллдефектный фенотип) необходим тетрааллельный нокаут. При неполном аллельном нокауте образуются растения с фенотипом либо дикого типа, либо мозаичным, как показано в ряде работ на других культурах [17–19].

В наших экспериментах получены трансгенные растения с тетрааллельным нокаутом гена *NtPDS*, проявляющимся в виде полного альбинизма растений. Трансформанты-альбиносы отличались более медленным ростом, карликовостью и были не способны к инициации процессов ризогенеза, что в итоге приводило к их гибели в процессе культивирования *in vitro* (рис. 2). Мутанты с пестролистностью в культуре *in vitro* образовывали корни и не отличались от контрольных листьев по размеру, но имели различную степень окраски на ранних стадиях и проявляли либо мозаичный фенотип, либо фенотип дикого типа при акклиматизации в условиях закрытого грунта. Полный альбинизм и мозаичный фенотип трансформантов могут быть связаны с нарушением путей биосинтеза каротиноидов и гибберелловой кислоты, что препятствует нормальному росту и развитию растений [20, 21].

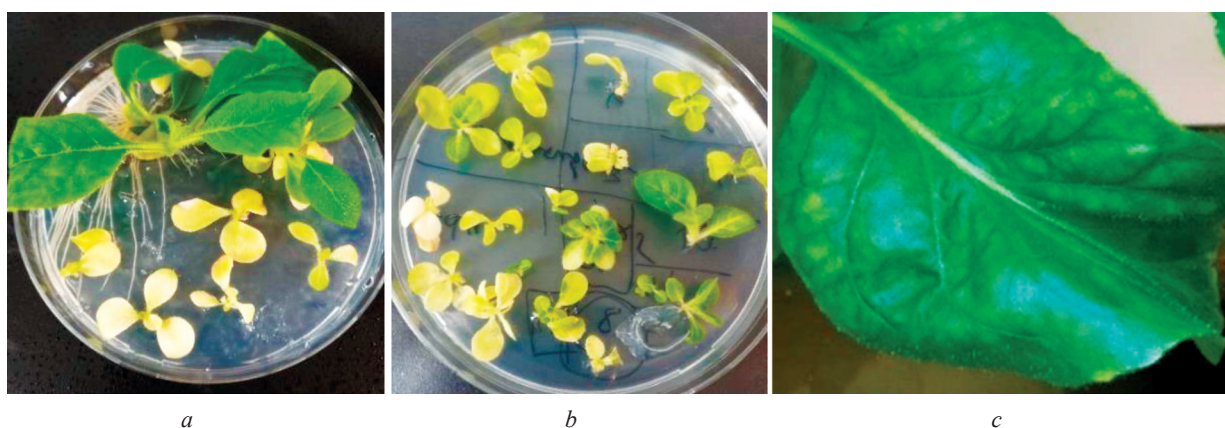


Рис. 2. Фенотипическое проявление направленного мутагенеза гена *NtPDS* с помощью системы CRISPR/Cas9 в трансгенных растениях табака поколения  $T_0$ : *a* – нежизнеспособные регенеранты-альбиносы и трансформанты дикого типа (зеленый окрас листьев) в культуре *in vitro*; *b* – трансформанты с мозаичным фенотипом и альбиносы в культуре *in vitro*; *c* – мозаичный фенотип трансгенного растения табака в культуре *in vivo*

Fig. 2. Phenotypic manifestation of the targeted mutagenesis of the *NtPDS* gene using the CRISPR/Cas9 system in the transgenic tobacco plants of the  $T_0$  generation: *a* – non-viable albino regenerants and wild-type transformants (green color of leaves) in the *in vitro* culture; *b* – transformants of mosaic phenotype and albinos in the *in vitro* culture; *c* – mosaic phenotype of the transgenic tobacco plant in the *in vivo* culture

Ген *PDS* рэгулюе біосінтэз каротиноідаў, якія з'яўляюцца важным кампанентам фотасінтэтычнага апарата. Змяненні ў функцыі гена *PDS* прыводзяць да альбіноснага фенатыпу і аномаліям прызнакаў архітэктуры ў раслін [22]. Прадукт гена *PDS* ўдзельнічае ў рэакцыі двухступенчатай дэсатурацыі і пераўтварэнні фітоіна ў  $\zeta$ -каротін. Дэсатурацыя звязана з цепнымі акісліцельна-восстановіцельнымі рэакцыямі электрон-транспартнай цепи, якія ўдзельнічаюць у вытворчасці хинонаў, пластыдаў терминальнай аксідазы і молекулярнага кісларода [23, 24].

Тэрмінальная аксідаза іграе рашаючую ролю ў працэсе фарміравання зелянога колера расліны, і парушэнні яе функцыянальнай актыўнасці прыводзяць альбо да альбінізму, альбо да пестрога фенатыпу за лічбы абесцвечвання хлоропластаў у адсутнасці каротиноідаў [25]. Следзавальна, поўная абструкцыя функцыі гена *PDS*, затрагіваючая электрон-транспартную цепь і, як следзавальна, вызываючая ўсильнае высвободжэння свабодных радыкалаў, прыводзіць да паследуючай гібелі такіх мутантных раслін. Фенатыпічныя праяўленні функцыянальнай дэструкцыі гена *PDS* прадэманстраваны і ў другіх відах раслін, такіх як арбуз, лук, яблоня, рыс, соя, картофель, банан, вінаград, маниока [15, 16, 18, 21, 25–28].

Для падтвэржджэння збытій напавяленага мутагенеза гена *NtPDS*, індукіраванага сістэмай CRISPR/Cas9 ў геноме табак, намі вызначана нуклеатыдная паслядавальнасць гена-мішэні мэтадам секвеніравання па Сэнгеру. Аналіз нуклеатыднай паслядавальнасці, уключаючай абласць протоспейсэра, размерам 439 п. о. ў 5-м экзоне гена *NtPDS* выканан на слукайнай выборке, састаячай з 21 трансгеннага расліны пакалення  $T_0$  з разлічным фенатыпам – ад поўнаму альбіноснаму да дыкага тыпа. Рэзультацы секвеніравання паказалі, што ўсе трансфарманты



Рис. 3. Рэзультацы аналізу нуклеатыдных паслядавальнасцей гена-мішэні *NtPDS* трансфарманта табак з мозаічным фенатыпам

Fig. 3. Analysis results for the nucleotide sequences of the target *NtPDS* gene of the tobacco transformant of mosaic phenotype

с видимыми фенотипическими проявлениями имеют мутантные последовательности в гене *NtPDS*. У трансформантов с фенотипом дикого типа не обнаружено мутированных последовательностей в целевом гене, 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.

Т а б л и ц а 3. Анализ мутационных событий 5-го экзона гена *NtPDS* в трансгенных растениях табака в поколении  $T_0$

Table 3. Analysis of the mutational events in exon 5 of the *NtPDS* gene in the transgenic tobacco plants in the  $T_0$  generation

Кол-во растений	Кол-во нокаутных растений	Эффективность мутагенеза, %	Частота мутаций, %	Тетраллельный нокаут		Неполный аллельный нокаут	
				кол-во растений	%	кол-во растений	%
21	7	33	51–80	5	23,81	2	9,52

Пр и м е ч а н и е. Эффективность мутагенеза рассчитывали по соотношению мутированных ампликонов и общего количества случайно секвенированных ампликонов.

Из общей выборки проанализированных растений направленный мутагенез обнаружен у 7, при этом 5 из них с фенотипом альбиносов были нежизнеспособными (не образовывали корней и погибли), 2 растения имели мозаичный фенотип и были высажены в закрытом грунте. У всех 7 растений были отмечены indel (инсерционно-делеционные мутации небольшого размера –



Рис. 4. Результаты анализа нуклеотидных последовательностей гена-мишени *NtPDS* трансформанта табака с фенотипом альбиноса

Fig. 4. Analysis results for the nucleotide sequences of the target *NtPDS* gene of the tobacco transformant of albino phenotype

до 40 п. о.), примыкающие к области PAM. Так, нами наблюдалось три типа изменений в последовательности гена *NtPDS*: инсерция аденина в положении –3 от PAM у 6 растений, инсерция размером 3 и 2 нуклеотида в положении –3 от PAM у 1 растения (предположительно AG и AGG соответственно) и делеции различного размера (от 11 до 34 п. о.), находящиеся как на различном расстоянии от мотива PAM, так и захватывающие его (рис. 3, 4).

Из данных, представленных на рис. 3, видно, что 75 % indel – это инсерции аденина в –3 положении относительно PAM (рис. 3, *b*), остальные 4 % являются делециями различного размера (от 17 до 34 п. о.). При этом частота мутации инсерционно-делеционного типа составляет 79 % от общего числа проанализированных геномов (рис. 3, *a*).

Из данных, представленных на рис. 4, видно, что 75 % indel – это инсерции аденина в –3 положении относительно PAM (рис. 4, *b*), остальные 5 % являются делециями различного размера (от 11 до 34 п. о.). При этом частота мутации инсерционно-делеционного типа составляет 80 % от общего числа проанализированных геномов (рис. 4, *a*).

Мутационные события, индуцированные системой CRISPR/Cas9, в растительном геноме приводят к сдвигу рамки считывания в последовательности гена и, как следствие, к образованию стоп-кодонов. В случае с геном *PDS* образование мутаций вызывает прекращение синтеза белка PDS и, как следствие, фотообесцвечивание [13]. В наших исследованиях частота мутаций составляла 51–80 % (табл. 3), и большая их часть (37–77 %) приходилась на инсерции. У разных видов растений частота мутаций при использовании CRISPR/Cas9 системы составляет 50–85 %. Например, у кукурузы – 70 %, у риса – 85,4, у томатов и сои – 50–60, у банана – 59 % [14, 29–31].

**Заключение.** Результаты проведенного исследования продемонстрировали, что направленный мутагенез генома табака посредством эндонуклеазы Cas9 и направляющей гидовой РНК, комплементарной гену *NtPDS*, приводит к возникновению делеций и инсерций в области протоспейсера гена-мишени. Различные мутации инсерционно-делеционного типа наблюдались в сайте 5-го экзона гена *NtPDS N. tabacum* сорта *Petit Havana* с частотой 51,0–80,0 % в поколении T<sub>0</sub>, при этом эффективность направленного мутагенеза при использовании векторной генетической конструкции *pRGEB31 + gRNA5-pds* составила 33,33 %. Мутации, индуцированные системой CRISPR/Cas9, оказались специфичными и высокоэффективными в редактировании генома табака, доказательством чего является их фенотипическое проявление – альбинизм и пестролистность.

#### Список использованных источников

1. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox / A. Razzaq [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 16. – Art. 4045. <https://doi.org/10.3390/ijms20164045>
2. Applications of CRISPR/Cas9 technology for modification of the plant genome / S. Deb [et al.] // *Genetica.* – 2022. – Vol. 150. – P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00146-2>
3. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA / H. Nishimasu [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 156, N 5. – P. 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
4. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation / M. Jinek [et al.] // *Science.* – 2014. – Vol. 343, N 6176. – Art. 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>
5. Devkota, S. The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis / S. Devkota // *BMB Rep.* – 2018. – Vol. 51, N 9. – P. 437–443. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.9.187>
6. Jasin, M. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair / M. Jasin, J. E. Haber // *DNA Repair (Amst.)*. – 2016. – Vol. 44. – P. 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.001>
7. Shrivastav, M. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice / M. Shrivastav, L. P. De Haro, J. A. Nickoloff // *Cell Res.* – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 134–147. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>
8. Pfeiffer, P. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations / P. Pfeiffer, W. Goedecke, G. Obe // *Mutagenesis.* – 2000. – Vol. 15, N 4. – P. 289–302. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>
9. Norris, S. R. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastiquinone as an essential component of phytoene desaturation / S. R. Norris, T. R. Barrette, D. DellaPenna // *Plant Cell.* – 1995. – Vol. 7, N 12. – P. 2139–2149. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>
10. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. Rasthali genome / N. Kaur [et al.] // *Funct. Integr. Genomics.* – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 89–99. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>



11. Разработка CRISPR/Cas9 системы для геномного редактирования гена *NtPDS* табака (*Nicotiana tabacum*) / А. М. Шишлова-Соколовская, Е. П. Хмилевская, 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.]. – 2022. – Т. 33. – С. 47–57.
12. Tso, T. C. Tobacco research and its relevance to science, medicine and industry / T. C. Tso // Beitrage zur Tabakforschung International / Contrib. Tobacco Res. – 2006. – Vol. 23, N 3. – P. 133–146. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0848>
13. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in *Cassava* / J. Odipio [et al.] // Front. Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – P. 1780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01780>
14. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9 / F. Naim [et al.] // Transgen. Res. – 2018. – Vol. 5. – P. 451–460. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0083-0>
15. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics / A. Kenton [et al.] // Mol. Gen. Genet. – 1993. – Vol. 240, N 2. – P. 159–169. <https://doi.org/10.1007/BF00277053>
16. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae) / I. J. Leitch [et al.] // Ann. Botany. – 2008. – Vol. 101, N 6. – P. 805–814. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm326>
17. Genome editing in *PDS* genes of tomatoes by non-selection method and of *Nicotiana benthamiana* by one single guide RNA to edit two orthologs / H. Komatsu [et al.] // Plant Biotechnol. – 2020 – Vol. 37, N 2. – P. 213–221. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0527b>
18. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system / C. Nishitani [et al.] // Nat. Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 31481. <https://doi.org/10.1038/srep31481>
19. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system / P. Wang [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2018. – Vol. 16, N 1. – P. 137–150. <https://doi.org/10.1111/pbi.12755>
20. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis / G. Qin [et al.] // Cell Res. – 2007. – Vol. 15. – P. 471–482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
21. CRISPR/Cas9-mediated editing of *phytoene desaturase* gene in onion (*Allium cepa* L.) / P. Mainkar [et al.] // Front Plant Sci. – 2023. – Vol. 14. – Art. 1226911. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1226911>
22. Cazzonelli, C. I. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants / C. I. Cazzonelli, B. J. Pogson // Trends Plant Sci. – 2010. – Vol. 15, N 5. – P. 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>
23. Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX) / E. Allison [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta (BBA). – 2011. – Vol. 1807, N 8. – P. 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.024>
24. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response / D. Rumeau [et al.] // Plant Cell Environ. – 2007. – Vol. 30, N 9. – P. 1041–1051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01675.x>
25. Lu, Q. S. M. An efficient and specific CRISPR-Cas9 genome editing system targeting soybean phytoene desaturase genes / Q. S. M. Lu, L. Tian // BMC Biotechnol. – 2022. – Vol. 22, N 1. – Art. 7. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00737-7>
26. Comparison of CRISPR-Cas9/Cas12a ribonucleoprotein complexes for genome editing efficiency in the rice phytoene desaturase (*OsPDS*) gene / R. Banakar [et al.] // Rice (N. Y.). – 2020. – Vol. 13, N 1. – Art. 4. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0365-z>
27. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system / S. Wang [et al.] // Plant Cell Rep. – 2015. – Vol. 34. – P. 1473–1476. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1816-7>
28. Hooghvorst, I. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon / I. Hooghvorst, C. López-Cristoffanini, S. Nogués, // Sci. Reports. – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 17077. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53710-4>
29. An agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize / S. N. Char [et al.] // Plant Biotechnol. J. – 2017. – Vol. 15, N 2. – P. 257–268. <https://doi.org/10.1111/pbi.12611>
30. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system / C. Brooks [et al.] // Plant Physiol. – 2014. – Vol. 166, N 3. – P. 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>
31. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9 / T. B. Jacobs [et al.] // BMC Biotechnol. – 2015. – Vol. 15. – Art. 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>

## References

1. Razzaq A., Saleem F., Kanwal M., Mustafa G., Yousaf S., Imran Arshad H. M., Hameed M. K., Khan M. S., Joyia F. A. Modern trends in plant genome editing: an inclusive review of the CRISPR/Cas9 toolbox. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 16, art. 4045. <https://doi.org/10.3390/ijms20164045>
2. Deb S., Choudhury A., Kharbyngar B., Satyawada R. R. Applications of CRISPR/Cas9 technology for modification of the plant genome. *Genetica*, 2022, vol. 150, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10709-021-00146-2>
3. Nishimasu H., Ran F. A., Hsu P. D., Konomi S., Shehata S. I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, vol. 156, no. 5, pp. 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
4. Jinek M., Jiang F., Taylor D. W., Sternberg S. H., Kaya E., Ma E. [et al.]. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 2014, vol. 343, N 6176, art. 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>

5. Devkota S. The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis. *BMB Reports*, 2018, vol. 51, no. 9, pp. 437–443. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.9.187>
6. Jasin M., Haber J. E. The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. *DNA Repair*, 2016, vol. 44, pp. 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.001>
7. Shrivastav M., De Haro L. P., Nickloff J. A. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 2008, vol. 18, no. 1, pp. 134–1347. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.111>
8. Pfeiffer P., Goedecke W., Obe G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, 2000, vol. 15, no. 4, pp. 289–302. <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>
9. Norris S. R., Barrette T. R., DellaPenna D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in arabidopsis defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant Cell*, 1995, vol. 7, no. 12, pp. 2139–2149. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.12.2139>
10. Kaur N., Alok A., Shivani Kaur N., Pandey P., Awasthi P., Tiwari S. CRISPR/Cas9-mediated efficient editing in phytoene desaturase (PDS) demonstrates precise manipulation in banana cv. *Rasthali* genome. *Functional and Integrative Genomics*, 2018, vol. 18, no. 1, pp. 89–99. <https://doi.org/10.1007/s10142-017-0577-5>
11. Shyshlova-Sokolovskaya A. M., Khmylevskaya E. P., Urbanovich O. Yu. Development of a CRISPR/Cas9 system for genomic editing of the NtPDS gene in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika: sbornik nauchnykh trudov* [Molecular and applied genetics: collection of scientific papers], 2022, vol. 33, pp. 47–57 (in Russian).
12. Tso T. C. Tobacco research and its relevance to science, medicine and industry. *Beitrage zur Tabakforschung International / Contributions to Tobacco Research*, 2006, vol. 23, no. 3, pp. 133–146. <https://doi.org/10.2478/cttr-2013-0824>
13. Odipio J., Alicai T., Ingelbrecht I., Nusinow D. A., Bart R., Taylor N. J. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in *Cassava*. *Frontiers in Plant Science*, 2017, vol. 8, p. 1780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01780>
14. Naim F., Dugdale B., Kleidon J., Brinin A., Shand K., Waterhouse P., Dale J. Gene editing the phytoene desaturase alleles of Cavendish banana using CRISPR/Cas9. *Transgenic Research*, 2018, vol. 5, pp. 451–460. <https://doi.org/10.1007/s11248-018-0083-0>
15. Kenton A., Parokony A. S., Gleba Y. Y., Bennett M. D. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics MGG*, 1993, vol. 240, no. 2, pp. 159–169. <https://doi.org/10.1007/BF00277053>
16. Leitch I. J., Hanson L., Lim K. Y., Kovarik A., Chase M. W., Clarkson J. J., Leitch A. R. The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany*, 2008, vol. 101, no. 6, pp. 805–814. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm326>
17. Komatsu H., Abdellatif I. M. Y., Yuan S., Ono M., Nonaka S., Ezura H., Ariizumi T., Miura K. Genome editing in *PDS* genes of tomatoes by non-selection method and of *Nicotiana benthamiana* by one single guide RNA to edit two orthologs. *Plant Biotechnology*, 2020, vol. 37, no. 2, pp. 213–221. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.20.0527b>
18. Nishitani C., Hirai N., Komori S., Wada M., Okada K., Osakabe K., Yamamoto T., Osakabe Y. Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 2016, vol. 6, no. 131481. <https://doi.org/10.1038/srep31481>
19. Wang P., Zhang J., Sun L., Ma Y., Xu J., Liang S. [et al.]. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, vol. 16, no. 1, pp. 137–150. <https://doi.org/10.1111/pbi.12755>
20. Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X. W., Chen Z., Qu L. J. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 2007, vol. 5, pp. 471–482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>
21. Mainkar P., Manape T. K., Satheesh V., Anandhan S. CRISPR/Cas9-mediated editing of *phytoene desaturase* gene in onion (*Allium cepa* L.). *Frontiers in Plant Science*, 2023, vol. 14, art. 1226911. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1226911>
22. Cazzonelli C. I., Pogson B. J. Source to sink: regulation of carotenoid biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 2010, vol. 15, no. 5, pp. 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.02.003>
23. Allison E., McDonald A., Ivanov G., Bode R., Maxwell D. P., Rodermerl S. R., Norman P., Hüner A. Flexibility in photosynthetic electron transport: The physiological role of plastoquinol terminal oxidase (PTOX). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2011, vol. 1807, no. 8, pp. 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.024>
24. Rumeau D., Peltier G., Cournac L. Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant, Cell and Environment*, 2007, vol. 30, no. 9, pp. 1041–1051. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01675.x>
25. Lu Q. S. M., Tian L. An efficient and specific CRISPR-Cas9 genome editing system targeting soybean phytoene desaturase genes. *BMC Biotechnology*, 2022, vol. 22, no. 1, art. 7. <https://doi.org/10.1186/s12896-022-00737-7>
26. Banakar R., Schubert M., Collingwood M., Vakulskas C., Eggenberger A. L., Wang K. Comparison of CRISPR-Cas9/Cas12a ribonucleoprotein complexes for genome editing efficiency in the rice phytoene desaturase (*OsPDS*) gene. *Rice (N. Y.)*, 2020, vol. 13, no. 1, art. 4. <https://doi.org/10.1186/s12284-019-0365-z>
27. Wang S., Zhang S., Wang W., Xiong X., Meng F., Cui X. Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Reports*, 2015, vol. 34, pp. 1473–1476. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1816-7>
28. Hooghvorst I., López-Cristoffanini C., Nogués S. Efficient knockout of phytoene desaturase gene using CRISPR/Cas9 in melon. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, no. 1, p. 17077. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53710-4>

29. Char S. N., Neelakandan A. K., Nahampun H., Frame B., Main M., Spalding M. H. [et al.]. An agrobacterium-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnology Journal*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 257–268. <https://doi.org/10.1111/pbi.12611>

30. Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z. B., Van Eck J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiology*, 2014, vol. 166, no. 3, pp. 1292–1297. <https://doi.org/10.1104/pp.114.247577>

31. Jacobs T. B., LaFayette P. R., Schmitz R. J., Parrott W. A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnology*, 2015, vol. 15, art. 16. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2>

### Информация об авторах

*Шишлова-Соколовская Анастасия Михайловна* – ст. науч. сотрудник. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [s\\_anastasia78@mail.ru](mailto:s_anastasia78@mail.ru)

*Урбанович Оксана Юрьевна* – д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт генетики и цитологии НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 34, 220072, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [O.Urbanovich@igc.by](mailto:O.Urbanovich@igc.by)

### Information about the authors

*Anastasia M. Shyshlova-Sokolovskaya* – Senior Researcher. Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus (34, F. Skoryna Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [s\\_anastasia78@mail.ru](mailto:s_anastasia78@mail.ru)

*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. Skoryna Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [O.Urbanovich@igc.by](mailto:O.Urbanovich@igc.by)