

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ
БИОЛОГИИ имени А.Н. БЕЛОЗЕРСКОГО

На правах рукописи

Хромов Андрей Владимирович

**Бесплазмидное редактирование генома растений картофеля
системой CRISPR/Cas9**

03.01.03 - молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Калинина Наталья Олеговна

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
1. ВВЕДЕНИЕ	7
1.1 Актуальность проблемы.....	7
1.2 Степень разработанности темы.....	7
1.3 Цели и задачи исследования	7
1.4 Научная новизна работы	8
1.5 Практическая значимость исследования	8
1.6 Личный вклад автора.....	9
1.7 Методология и методы исследования.....	9
1.8 Положения, выносимые на защиту:	9
1.9 Степень достоверности и апробация результатов.....	10
1.10 Структура и объем диссертации.....	10
1.11 Список публикаций по теме диссертации:	10
1.11.1 Публикации по теме диссертации	10
1.11.2 Материалы конференций:	11
2.1 Использование системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к патогенам	12
2.2 CRISPR: прокариотическая иммунная система, инструмент для редактирования генома эукариот.....	14
2.2.1 История открытия коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) в ДНК прокариот	14
2.2.2 Системы CRISPR-Cas, участвующие в бактериальном иммунитете	15
2.2.3 CRISPR-Cas как новый инструмент для редактирования генома	19
2.2.4 Редактирование РНК на основе систем CRISPR/Cas	22
2.3 Использование системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к вирусам.	23
2.3.1 Получение растений, устойчивых к ДНК-содержащим вирусам, с использованием технологии CRISPR/ Cas9	23
2.3.2 Получение растений, устойчивых к РНК-вирусам, с использованием системы CRISPR/Cas	27
2.3.3 CRISPR-опосредованное редактирование генов растения-хозяина для защиты от вирусной инфекции	29
2.4 Системы доставки компонентов CRISPR/Cas	31

2.5 Хитозан как перспективная система доставки макромолекул	34
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
3.1 Материалы	38
3.2 Методы	39
3.2.1 Растительный материал.....	39
3.2.2 Получение меристем <i>Solanum tuberosum</i>	40
3.2.3 Бомбардмент меристем <i>Solanum tuberosum</i>	40
3.2.4 Инfiltrация меристем <i>Solanum tuberosum</i>	40
3.2.5 Регенерация растений <i>Solanum tuberosum</i>	41
3.2.6 Заражение растений Y вирусом картофеля	41
3.2.7 Изучение солевого стресса	41
3.2.8 Изучение гиперосмотического стресса	41
3.2.9 Получение частиц хитозана и их функционализация.	42
3.2.10 Оцeнтка эффективности загрузки методом флуоресцентной микроскопии42	
3.2.11 Инfiltrация функционализированных частиц хитозана в клетки растений.	42
3.2.12 Трансформация <i>E.coli</i>	43
3.2.13 Выделение плазмидной ДНК из <i>E.coli</i>	44
3.2.14 ПЦР	44
3.2.15 Полуколичественная ОТ-ПЦР	44
3.2.16 Количественная ПЦР в реальном времени.	44
3.2.17 Дизайн гидовых РНК и синтез матрицы для транскрипции.....	45
3.2.18 Транскрипция РНК	45
3.2.19 Осаждение РНК из транскрипционного раствора	45
3.2.20 In vitro тестирование эффективности разрезания Cas9.....	46
3.2.21 Генотипирование.....	46
3.2.22 Метод глубокого секвенирования NGS.....	46
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	48
4.1 Конструирование гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/Cas9	48
4.2 Разработка платформы на основе микрочастиц хитозана для безплазмидной доставки макромолекул в клетки растений.	53
4.3 Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для безплазмидного редактирования генома картофеля <i>Solanum tuberosum</i> 58	
4.4 Редактирование гена коилина в растениях картофеля <i>Solanum tuberosum</i>	64

4.5 Функциональный анализ роли коилина в устойчивости растений картофеля <i>Solanum tuberosum</i> к вирусной инфекции и абиотическим стрессам	70
5. ВЫВОДЫ	77
6. БЛАГОДАРНОСТИ	78
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	79

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BSCTV, Beet severe curly top virus: вирус суровой курчавости верхушек свеклы
BeYDV, Bean yellow dwarf virus: вирус желтой карликовости бобов
TYLCV, Tomato yellow leaf curl virus: вирус желтой курчавости листьев томатов
BCTV, Beet curly top virus: вирус курчавости верхушек свеклы
MeMV, Merremia mosaic virus: вирус мозаики мерремии
CLCuKoV, Cotton leaf curl Kokhran virus: кокрановский вирус курчавости листьев хлопка
CLCuMuV, Cotton leaf curl Multan virus: малтановский вирус курчавости листьев хлопка
CLCuV, Cotton leaf curl virus: вирус курчавости листьев хлопка
WDV, Wheat draft virus: вирус карликовости пшеницы
TYLCV, Tomato yellow leaf curl virus: вирус желтой курчавости листьев томатов
ACMV, African cassava mosaic virus: вирус мозаики африканской маниоки
BSV, Banana streak virus: вирус банановых прожилок
CaMV, Cauliflower mosaic virus: вирус мозаики цветной капусты
TMV, Tobacco mosaic virus: вирус табачной мозаики
CMV, Cucumber mosaic virus: вирус огуречной мозаики
TuMV, Turnip mosaic virus: вирус мозаики турнепса
SRBSDV, Southern rice black-streaked draftvirus: вирус южной черной штриховатой карликовости риса
RSMV, Rice stripe mosaic virus: вирус полосчатой мозаики риса
CIYVV, Clover yellow vein virus: вирус пожелтения жилок клевера
PVY, Potato virus Y: вирус картофеля Y, YBK
CVYV, Cucumber vein yellowing virus: вирус пожелтения жилок огурца
ZYMV, Zucchini yellow mosaic virus: вирус желтой мозаики цукини
PRSMV, Papaya ring spot mosaic virus: вирус кольцевой пятнистости папайи
TRV, Tobacco rattle virus: вирус погремковости табака
CRISPR, короткие палиндромные повторы, расположенные регулярными группами
(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
Cas, CRISPR-associated
кгРНК, короткая гидовая РНК
кРНК, CRISPR РНК
PDS, phytoene desaturase, фитоен десатураза
ГМО, генетически модифицированные организмы
TALEN, Transcription activator-like effector nucleases

ZFN, Zink finger nucleases
DR, прямые повторы
MTBC, Mycobacterium tuberculosis complex
SRSR, короткие регулярные повторы
РАМ, мотив, ассоциированный с протоспейсером
ТракрРНК, трансактивирующая кРНК
DSB, двуцепочечный разрыв
HEPN, higher eukaryotes and prokaryotes nucleotide-binding domain
SHERLOCK, Specific High-Sensitivity Enzymatic Reporter UnLOCKing
ТБ, транспортный белок
БО, белок оболочки
IR, межгенная область
НТО, нетранслируемая область
индель, инсерция/делеция
ТФП, триполифосфат
ДМСО, Диметилсульфоксид
ЭДТА, Этилендиаминтетрауксусная кислота
FITC, Fluorescein isothiocyanate
GFP, green fluorescent protein
DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole
ДТТ, дитиотрейтол
MMLV, Moloney Murine Leukemia Virus
БСА, бычий сывороточный альбумин
CTD, С-концевой домен
NHEJ, негомологичное соединение концов
ТК, тельца Кахаля
NGS, метод глубокого секвенирования

1. ВВЕДЕНИЕ

1.1 Актуальность проблемы

Известно, что вирусные инфекции являются причиной почти половины всех эпифитотий сельскохозяйственных культур. В настоящее время новые технологии редактирования генома открывают широкие возможности для генерации растений, устойчивых к различным инфекциям. Новейшей и самой передовой технологией редактирования генов, которая может быть использована для достижения этой цели, является технология CRISPR/Cas. Эта технология уже произвела революцию в различных областях наук о жизни, в частности в медицине и биотехнологии, и предлагает новый, мощный альтернативный (или дополнительный) подход к классической селекции растений для улучшения их характеристик. Учитывая, что вирусы растений могут вызывать огромные потери урожайности сельскохозяйственных культур, неудивительно, что в последние годы проявился интерес к использованию различных аспектов технологий CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к вирусным патогенам.

1.2 Степень разработанности темы.

Для достижения этой цели системы CRISPR/Cas можно использовать двумя основными способами: (1) путем прямого нацеливания на вирусные геномы и (2) путем внесения целевых мутаций в конкретные гены растений-хозяев, белки, кодируемые которыми, используются вирусом для успешной репликации и распространении в растении. Первый способ используется в настоящее время большинством исследователей, хотя использование генов растений представляется более универсальным. Практическое применение технологии CRISPR/Cas сталкивается с рядом «узких» мест, решение которых имеет принципиальное значение для редактирования генов растений, одним из которых является метод доставки компонентов редактирующего комплекса Cas9/короткая гидовая РНК в растения. Основным применяемый метод – доставка генов с использованием плазмидной ДНК и агробактериальной трансформации, что приводит к получению трансгенных растений, использование которых запрещено законодательством во многих странах. Предпочтительными являются методы прямой (бесплазмидной) доставки кгРНК и белка Cas9 без использования векторных систем, которые активно разрабатываются в последнее время.

1.3 Цели и задачи исследования

Целью настоящей работы является получение отредактированных линий картофеля, устойчивых к вирусной инфекции, с помощью технологии CRISPR/Cas с применением бесплазмидного способа доставки редактирующего комплекса.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать способ доставки в клетки растений *Nicotiana benthamiana* и *Solanum tuberosum* платформ на основе микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности флуоресцентно меченными модельными белками и короткими РНК методом инфильтрации в клетки растений.
2. Отработать условия доставки редактирующего комплекса (рекомбинантная эндонуклеаза Cas:кРНК) в клетки меристем растений картофеля *S.tuberosum* с использованием платформ на основе микрочастиц хитозана и микрочастиц золота.
3. С использованием бесплазмидных технологий доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки меристем растений картофеля провести редактирование двух генов – гена *PDS* и гена коилина.
4. Провести функциональный анализ гена коилина в устойчивости отредактированных линий растений картофеля к инфекции Y вирусом картофеля (YBK) и абиотическим стрессам.

1.4 Научная новизна работы

Предложен новый метод доставки редактирующего комплекса в клетки растений с использованием микрочастиц хитозана и метода вакуумной инфильтрации, защищенный патентом. В качестве клеток/тканей впервые использованы апикальные меристемы картофеля, ключевым преимуществом которой является простота их дальнейшей регенерации в целые растения, что широко используется в производстве безвирусного картофеля. С использованием бесплазмидных технологий доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки меристем растений картофеля проведено редактирование модельного гена – гена фитоен десатуразы и гена коилина, угнетение экспрессии которого по литературным данным, повышает устойчивость растений *N. benthamiana* к инфекции YBK и абиотическим стрессам. Впервые показано, что геномное редактирование клеток меристем приводит к появлению протяженных делеций (от 400 до 600 пн) в редактируемых генах. Редактированные по гену коилина линии растений картофеля демонстрировали повышенную устойчивость к инфекции YBK и абиотическим (солевому и осмотическому) стрессам. Редактированные растения с использованием технологии CRISPR/Cas, не относящиеся к ГМО, получены в нашей стране впервые.

1.5 Практическая значимость исследования

Новый метод доставки редактирующего комплекса в клетки меристем растений с

использованием микрочастиц хитозана и метода вакуумной инфильтрации перспективен для создания редактированных линий растений различных видов, не относящихся к ГМО. Ген коилина представляет собой перспективную мишень для получения линий и сортов сельскохозяйственных растений (прежде всего картофеля), устойчивых к биотическим и абиотическим стрессам.

1.6 Личный вклад автора.

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Автор принимал участие в подготовке статей к публикации и представлял результаты исследований на конференциях.

1.7 Методология и методы исследования.

Исследования выполнены с использованием современных методов молекулярной биологии, вирусологии, генной инженерии и клеточной биологии. Уровень экспрессии генов растений оценивали методом полуколичественной ПЦР, а также ПЦР в режиме реального времени. Для подавления экспрессии генов коилина и фитоен десатуразы использовали метод редактирования генома при помощи технологии CRISPR/Cas9. Исследования характеристик микрочастиц проводились при помощи флуоресцентной микроскопии. Для выявления изменений в ДНК проводилось секвенирование по Сенгеру и секвенирование нового поколения. Работа выполнена с использованием современного оборудования.

1.8 Положения, выносимые на защиту:

1. Дизайн коротких гидовых РНК (кгРНК) к консервативным участкам генов фитоен десатуразы и коилина растений картофеля *Solanum tuberosum* L. и оценка *in vitro* эффективности синтезированных кгРНК в разрезании целевого участка генов рекомбинантной эндонуклеазой Cas9 позволяет отобрать активные кгРНК для последующего редактирования генов.

2. Способ доставки в клетки растений *N. benthamiana* и *S. tuberosum* платформ на основе микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности флуоресцентно меченными модельными белками и короткими РНК с помощью инфильтрации комплексов в листья растений позволяет эффективно доставлять биомолекулы в клетки эпидермиса.

3. С использованием бесплазмидных технологий для доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки растений картофеля проведено редактирование двух генов – гена PDS и гена коилина.

4. Редактирование генов в клетках меристемы картофеля сопровождается образованием протяженных делеций.

5. Редактированные по гену коилина линии растений-регенерантов картофеля характеризуются повышенной устойчивостью к заражению Y-вирусом картофеля (YBK, род *Potyvirus*) и к абиотическим осмотическому и солевому стрессам в опытах *in vitro* и *in vivo* и полевых условиях.

1.9 Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов подтверждается их воспроизводимостью в повторных экспериментах, наличием положительных и отрицательных контролей. По теме диссертационной работы было опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в международных системах цитирования (Web of Science, Scopus, PubMed) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Результаты работы были представлены на 17 международном конгрессе по вирусологии (Сингапур, Сингапур, 2017), 42-43 конгрессах Федерации европейских биохимических обществ (Иерусалим, Израиль, 2017; Прага, Чехия, 2018), симпозиуме европейского общества по молекулярной биологии (EMBO) (Бишенхейм, Франция, 2018).

1.10 Структура и объем диссертации.

Материалы диссертации изложены на 91 странице машинописного текста и включают 28 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из разделов: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы (последний раздел содержит 177 источников).

1.11 Список публикаций по теме диссертации:

1.11.1 Публикации по теме диссертации

- Хромов А.В., Гуцин В.А., Тимербаев В.И., Калинина Н.О., Тальянский М.Э., Макаров В.В., (2018) Конструирование гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/Cas9. Доклады Академии наук, 479:3:343-347 IF = 1.058

- Хромов А.В., Махотенко А.В., Снигирь Е.В., Макарова С.С., Макаров В.В., Супрунова Т.П., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. (2018) Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля *Solanum tuberosum*. Биотехнология, 34:6 IF = 0.557

- Махотенко А.В., Хромов А.В., Снигирь Е.А., Макарова С.С., Макаров В.В., Супрунова Т.П., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. Функциональный анализ роли коилина в устойчивости растений картофеля *Solanum tuberosum* к вирусной инфекции и абиотическим стрессам с использованием системы редактирования CRISPR/Cas9. (2019) Доклады Академии наук, 484:6:772-776 IF = 1.058 (равный вклад двух первых авторов)

- Макарова С.С., Хромов А.В., Спеченкова Н.А., Тальянский М.Э., Калинина Н.О. (2018) Использование системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к патогенам. Биохимия, 84:1:24-37 IF = 2.178

- Kalinina N, Khromov A., Andrew J. Love, and Taliansky M. CRISPR Applications in Plant Virology: Virus Resistance and Beyond (2019). Phytopathology 110:1, 18-28 IF = 2.980

Патент РФ

патент RU2663347C1: Долгов С.В., Калинина Н.О., Макаров В.В., Макарова С.С., Махотенко А.В., Мирошниченко Д.Н., Снигирь Е.А., Супрунова Т.П., Тальянский М.Э., Тимирбаев В.Р., Хромов А.В. (2018). Способ доставки биологически активных макромолекул в клетки растений

1.11.2 Материалы конференций:

- Махотенко А.В., Снигирь Е.А., Макарова С.С., Макаров В.В., Хромов А.В., Супрунова Т.П., Калинина Н.О., Тальянский М.Э. (2018). Бесплазмидная доставка РНП-комплексов CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы растений картофеля *Solanum tuberosum*. CRISPR 2018, Новосибирск, Россия

- Khromov A.V., Makarov V.V., Makhotenko A.V., Taliansky M.E., Snigir E.A., Suprunova T.P., Kalinina N.O., Makarova S.S. (2018). Efficient DNA-free nanoparticle mediated genome editing of potato using CRISPR-Cas9 RNP complex. The 43rd FEBS Congress Prague, Prague, Чехия

- Хромов А.В., Махотенко А.В., Снигирь Е.А., Макарова С.С., Калинина Н.О., Макаров В.В., Тальянский М.Э. (2017). Технология с применением наночастиц для биолиственной доставки компонентов системы CRISPR/CAS9 в растения картофеля с целью редактирования генома. 12th International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry devoted to the Memory of Professor Ovchinnikov/Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия

- Snigir E.A., Makarova S.S., Taliansky M.E., Kalinina N.O., Makarov V.V., Khromov A.V., Makhotenko A.V. (2017). Optimization for guide RNA design for effective CRISPR/Cas9 gene editing. 42nd FEBS Congress "From molecules to cells and back", Иерусалим, Израиль

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Использование системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к патогенам

Урожай и качество сельскохозяйственных культур зависят не только от погодных условий, места выращивания и качества семенного материала, но также от степени заражения различными патогенными микроорганизмами и вирусами и активности их переносчиков. Вирусы наносят значительный ущерб растениеводству в дополнение к грибковым и бактериальным инфекциям. По некоторым оценкам, вирусные инфекции являются причиной почти половины всех эпифитотий сельскохозяйственных культур (Palukaitis et. al 2013), что соответствует потере примерно 60 миллиардов долларов США в год (FAO, WFP, IFAD 2012). Кроме того, заражение патогенами оказывает существенное влияние на вкусовые, товарные качества и срок хранения сельскохозяйственной продукции.

Учитывая ограниченную площадь сельскохозяйственных угодий и глобальные изменения климата, решение проблемы нехватки продовольствия в ближайшем будущем потребует увеличения урожайности. Эта проблема может быть решена с использованием новых технологий и генетических ресурсов для получения новых сортов сельскохозяйственных культур с более высокой устойчивостью как к биотическим, так и к абиотическим факторам окружающей среды.

В настоящее время в растениеводстве используются три основные стратегии для минимизации воздействия инфекций. Во-первых, новые сорта сельскохозяйственных культур, устойчивые к ряду патогенов, включая вирусы, создаются традиционными методами селекции. Основным подходом к созданию растений, устойчивых к вирусным инфекциям, является использование в программах селекции генов естественной устойчивости, как правило, из растений дикого типа. К числу очевидных препятствий успешной селекции можно отнести трудности скрещивания элитных линий с дикими видами растений, длительность процесса, и вероятность одновременного внесения нежелательных локусов, снижающих продовольственную ценность культуры. Кроме того, этот тип устойчивости является специфичным и не является долговременным, поскольку способен преодолеваться патогеном. Во-вторых, в последние три десятилетия активно разрабатывалась стратегия достижения устойчивости к вирусам путем создания трансгенных растений, экспрессирующих гены некоторых вирусных белков, фрагменты этих генов или некодирующие вирусные последовательности (Sudarshana et al 2007; Reddy et al 2009). Однако есть только несколько примеров трансгенных культур,

демонстрирующих высокую устойчивость к соответствующим вирусам, например, создание растений картофеля, устойчивых к нескольким экономически важным вирусам (Palukaitis 2012; Arif et al 2012). Эта стратегия также имеет ограничения, связанные, в частности, с тем фактом, что приобретенная устойчивость обычно является специфической и может быть преодолена вирусами с течением времени. Другой подход заключается в создании устойчивых растений путем трансгенной экспрессии растительных генов, включая природные гены устойчивости. Однако запреты регуляторов на генетически модифицированные организмы (ГМО) ограничивают использование трансгенных растений во многих странах. Наконец, страны с высокоразвитым сельским хозяйством применяют санитарные меры для постоянного мониторинга распространения вирусов и их переносчиков, а также сертифицируют семенной материал на основе диагностики и оздоровления от вирусов (получение оздоровленных безвирусных сортов). Эти меры требуют интенсивной работы специализированных лабораторий и наличия квалифицированного персонала и достаточно дороги.

В долгосрочной перспективе получение устойчивых к патогенам культур представляются предпочтительными. В настоящее время новые технологии редактирования генома открывают широкие возможности для генерации растений, устойчивых к различным инфекциям. Технология точного нацеливания на модификацию специфических генов растений имеет большой потенциал для выяснения функций генов, а также для улучшения характеристик сельскохозяйственных культур. Новейшая и самая передовая технология редактирования генов, которая может быть использована для достижения этой цели, основана на обнаруженных в геноме прокариот и архей коротких палиндромных повторов, расположенных регулярными группами и разделенных уникальными последовательностями - спейсерами (clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR) и CRISPR-связанных генов (Cas), которая проще, эффективнее и универсальнее, чем другие методы редактирования, которые используют нуклеазы с доменами цинковых пальцев (ZFN) и эффекторные нуклеазы (TALEN). Технология CRISPR/Cas уже произвела революцию в различных областях наук о жизни, в частности в медицине и биотехнологии, и предлагает новый, мощный альтернативный (или дополнительный) подход к классической селекции растений для улучшения их характеристик. Учитывая, что вирусы растений могут вызывать огромные потери урожайности сельскохозяйственных культур, неудивительно, что в последние годы проявился интерес к использованию различных аспектов технологий CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к вирусным патогенам (Borrelli et al. 2018; Green and Hu 2017; Makarova et al. 2018; Wolter and Puchta 2018; Zhang et al. 2018)

Для повышения устойчивости сельскохозяйственных культур к вирусам растений системы CRISPR/Cas можно использовать двумя основными способами. Во-первых, CRISPR/Cas можно использовать для внесения целевых мутаций в конкретные гены растений-хозяев, чтобы помешать их способности действовать как часть механизма, обеспечивающего успешную репликацию и распространение вируса в растении. Во-вторых, системы CRISPR/Cas могут быть сконструированы таким образом, чтобы они могли эффективно функционировать для прямого нацеливания на вирусные геномы. Например, система CRISPR/Cas9, может прямо нацеливаться на геномную ДНК ДНК-содержащих вирусов, тогда как другие системы CRISPR/Cas, которые могут специфически расщеплять РНК, такие как Cas9 из *Franciscella novicida* (FnCas9) (Price et al. 2015) или Cas13a (ранее известный как C2c2) (Abudayyeh et al. 2016), могут защищать от вирусов с РНК геномами (Green and Hu 2017; Wolter and Puchta 2018).

2.2 CRISPR: прокариотическая иммунная система, инструмент для редактирования генома эукариот

2.2.1 История открытия коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR) в ДНК прокариот

Палиндромные ДНК-повторы, которые позже стали известны как CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), были впервые обнаружены в 1987 году группой Atsuo Nakata в Японии (Ishino et al., 1987). Эти регулярно расположенные мотивы были сгруппированы рядом с геном *iap*, который кодирует аминокептидазу в *Escherichia coli* K12. Второй массив был обнаружен в том же геноме два года спустя, и анализы с помощью гибридизации показали наличие подобных последовательностей у близкородственных *E.coli* видов бактерий *Shigella* и *Salmonella* (Nakata et al., 1989). В 1991 г. расположенные группами прямые повторы (DR) были идентифицированы в штаммах эволюционно удаленной группы бактерий - *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) (Hermans et al., 1991). Последовательности между DR, известные как спейсеры, различались между изолятами и, таким образом, использовались для типирования штаммов (Jeffreys et al., 1991; Groenen et al., 1993). Использование локусов DR в качестве генетических маркеров для дифференциации штаммов в MTBC начало широко применяться в течение 1990-х годов, и все еще используются для этой цели сегодня (Botelho et al., 2015).

После первых описаний CRISPR у грамотрицательных (*E. coli*) (Ishino et al., 1987; Nakata et al., 1989) и грамположительных бактерий (MTBC) (Hermans et al., 1991; Jeffreys

et al., 1991; Groenen et al., 1993) исследовательская группа Francisco Rodríguez-Valera в Испании обнаружила кластеры с повторяющимися спейсерами у архей (Mojica et al., 1993). Авторы обнаружили протяженные участки этих элементов в хромосомных и плазмидных областях ДНК штаммов, относящихся к некоторым видам *Haloferax* и *Haloarcula* (Mojica et al., 1995). В то время как анализ на бактериальных системах не проводился в течение довольно долгого времени, исследования на археях были продолжены. В 1993-1995 гг. была изучена транскрипция с повторяющихся локусов (Mojica et al., 1993) и проведены первые исследования по определению биологической роли CRISPR (Mojica et al., 1995). В 1996-1999 гг. аналогичные повторяющиеся элементы были обнаружены у других архей и бактерий, а в 2000 году эти и дополнительные последовательности были собраны в базах данных ДНК, чтобы обозначить недавно идентифицированный тип прокариотических коротких повторов, который был назван короткими регулярными повторами (SRSR) (Mojica et al., 2000). В то время находящийся в начале своего развития биоинформатический анализ, примененный к этим элементам SRSR, показал, что они являются частично палиндромными и встречаются в кластерах, регулярно перемежающихся уникальными спейсерными последовательностями постоянной длины, аналогичными повторяющимся. Этот первый анализ большого количества таких SRSR у неродственных микроорганизмов, и особенности их геномной структуры позволили предположить их важную, но пока неизвестную биологическую функцию (Mojica et al., 2000).

При изучении локусов SRSR многих архей и бактерий удалось обнаружить набор из четырех близкорасположенных генов (*cas1-cas4*), которые кодировали белки, возможно связанные с кластерными повторами (Jansen et al., 2002). В этой публикации 2002 года (Jansen et al., 2002), подготовленной группой микробиологов из Нидерландов, приводится предложение группы Francisco J.M. Mojica объединить разнообразие названия, используемых в литературе для этих повторяющихся элементов ДНК, под термином «коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами» с аббревиатурой CRISPR. Этот термин был с готовностью принят в зарождающейся области и быстро стал популярным.

2.2.2 Системы CRISPR-Cas, участвующие в бактериальном иммунитете

До 2005 года не было четких доказательств биологической функции или основного механизма, связанного с массивами CRISPR. Первое предположение о предполагаемой связи между CRISPR и прокариотическим иммунитетом возникло из открытия, что

некоторые из спейсеров гомологичны последовательностям ДНК из бактериофагов или плазмид (Mojica et al., 2005). Действительно, было известно, что некоторые бактерии, несущие массивы CRISPR, устойчивы к фагам, которые, как было показано, несут эти последовательности (Mojica et al., 2005). Это фундаментальное наблюдение, независимо подтвержденное другими лабораториями (Pourcel et al., 2005; Bolotin et al., 2005), решительно поддерживало идею о том, что элементы CRISPR связаны с какой-то системой защиты бактерий. Исследователями был предложен вероятный механизм действия (Mojica et al., 2005), включающий распознавание мишени комплексами CRISPR-РНК (Mojica et al., 1993; Mojica et al., 1995; Mojica et al., 2000; Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005; Bolotin et al., 2005; Tang et al., 2002), напоминающий механизм РНК-интерференции у эукариот (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005; Bolotin et al., 2005; Tang et al., 2002; Makarova et al., 2006). В одном из этих исследований 2005 г. (Bolotin et al., 2005) впервые был выявлен короткий фрагмент консервативной последовательности ДНК рядом с протоспейсерами (исходная последовательность в вирусах и других чужеродных генетических элементах, источник спейсеров) (Horvath et al., 2008), который позже будет назван мотивом, ассоциированным с протоспейсером (PAM) (Mojica et al., 2009).

Участие элементов CRISPR в бактериальном иммунитете было экспериментально подтверждено в 2007 году Rodolphe Barrangou и Philippe Horvath с сотрудниками (Barrangou et al., 2007). Эта знаменательная публикация продемонстрировала, что устойчивость к инфекции бактериофагами может вырабатываться чувствительным бактериальным штаммом путем приобретения спейсеров, соответствующих вирусному геному (Barrangou et al., 2007). Ранее было обнаружено, что массивы CRISPR у прокариот продуцируют множество малых РНК (Mojica et al., 1993; Tang et al., 2002; Lillestøl et al., 2006). В 2008 году Brouns et al. (Brouns et al., 2008) показали, что эти CRISPR РНК (кРНК) играют решающую роль в обеспечении противовирусной защиты. Более того, их результаты показали, что ДНК была целью действия CRISPR. Впоследствии, Luciano Marraffini и Erik Sontheimer сообщили, что CRISPR может эффективно препятствовать горизонтальному переносу плазмидных последовательностей посредством нацеливания на их ДНК (Marraffini, Sontheimer 2008). Наблюдение за тем, что существует динамическое взаимодействие между спейсерами в массивах CRISPR и потенциальными мишенями в естественных микробных сообществах, дополнительно подтвердило связь между генотипом CRISPR и иммунитетом хозяина (Andersson, Banfield 2008). Эти открытия показали, что CRISPR-Cas являются универсальным генетическим барьером для горизонтально переносимой ДНК и эффективной адаптивной иммунной системой у

прокариот (Marraffini 2015).

В последующие годы эти основополагающие открытия позволили дополнительно детально охарактеризовать механизм действия CRISPR. Последовательности PAM оказались важными для интерференции (Deveau et al., 2008). Эти мотивы были выявлены в качестве общей характеристики во многих системах (Horvath et al., 2008; Mojica et al., 2009), дополнительно подтверждая их функциональную значимость. Затем механизм интерференции / защиты был определен как расщепление белком Cas (являющимся эндонуклеазой) целевой ДНК рядом с PAM (Garneau et al., 2010).

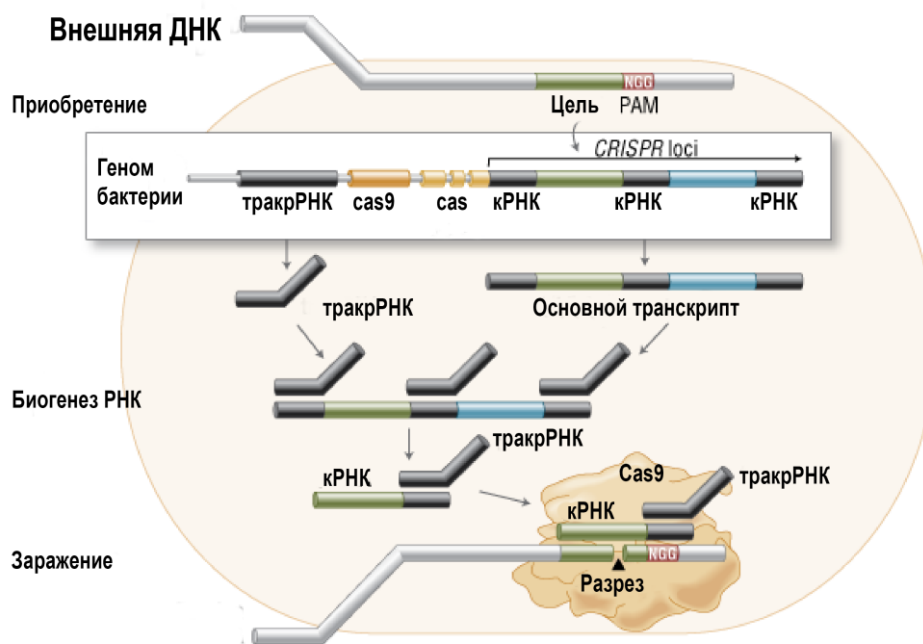


Рисунок 1. Схема механизма молекулярного иммунитета прокариот, основанная на системе CRISPR/Cas9. На этапе адаптации фрагменты чужеродной ДНК включаются в бактериальный геном в локусах CRISPR. При повторном проникновении инфекционного агента с этих локусов транскрибируется пре-кРНК, которая «созревает» в кРНК. Эндонуклеаза Cas9 в комплексе с кРНК и тракрРНК расщепляет чужеродную ДНК, в участке комплементарном последовательности кРНК (последовательность протоспейсера, примыкающая к PAM-сайту). (по Reis et al 2017)

Еще одна важная информация о CRISPR-Cas была получена в 2011 году (Deltcheva et al., 2011), а именно, было показано существование в определенных системах дополнительной малой молекулы РНК, трансактивирующей кРНК (тракрРНК), необходимой для генерации зрелых молекул кРНК (рис. 1). ТракрРНК входят в системы класса 2, где, помимо их участия в созревании кРНК, они также участвуют в связывании кРНК и белка Cas (Jinek et al., 2012). К этому времени многие системы CRISPR-Cas были идентифицированы (Haft et al., 2005) и частично охарактеризованы у архей и бактерий (Horvath, Barrangou 2010).

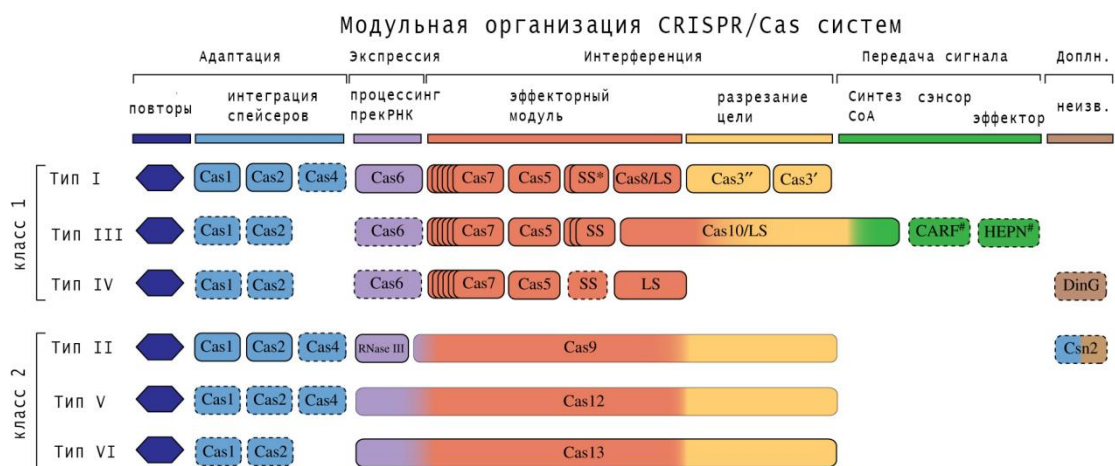


Рисунок 2. Системы CRISPR-Cas класса 1 и класса 2. Основные строительные блоки типов систем CRISPR-Cas. Звездочкой обозначена предполагаемая малая субъединица (SS), которая может быть слита с большой субъединицей в нескольких подтипах типа I. Знак # рядом с метками доменов CARF и HEPN указывает на то, что другие неизвестные сенсорные и эффекторные домены могут участвовать в пути передачи сигнала. «Необязательные» гены обозначены пунктирной линией. (по Koonin and Makarova, 2019)

Этот большой объем информации о системах CRISPR-Cas привел к первой попытке классифицировать (рис. 2) их с эволюционной точки зрения на отдельные функциональные и структурные типы (Тип I, II и III) и подтипы (Makarova et al., 2011). Классификация высшего уровня, категория класса (то есть класс 1, включающий типы I, III и IV, и класс 2, включая типы II, V и VI), также была принята исследователями (Makarova et al., 2015). В отличие от класса 1, системы класса 2 требуют только одного белка Cas (Cas9 в случае систем типа II вместо мультибелкового комплекса, как в классе 1 для распознавания и расщепления ДНК мишени (van der Oost et al., 2014). Эти свойства систем класса 2 объясняют, почему тип II был выбран среди охарактеризованных систем CRISPR-Cas для разработки будущих приложений на основе целевого расщепления ДНК (рис. 3).

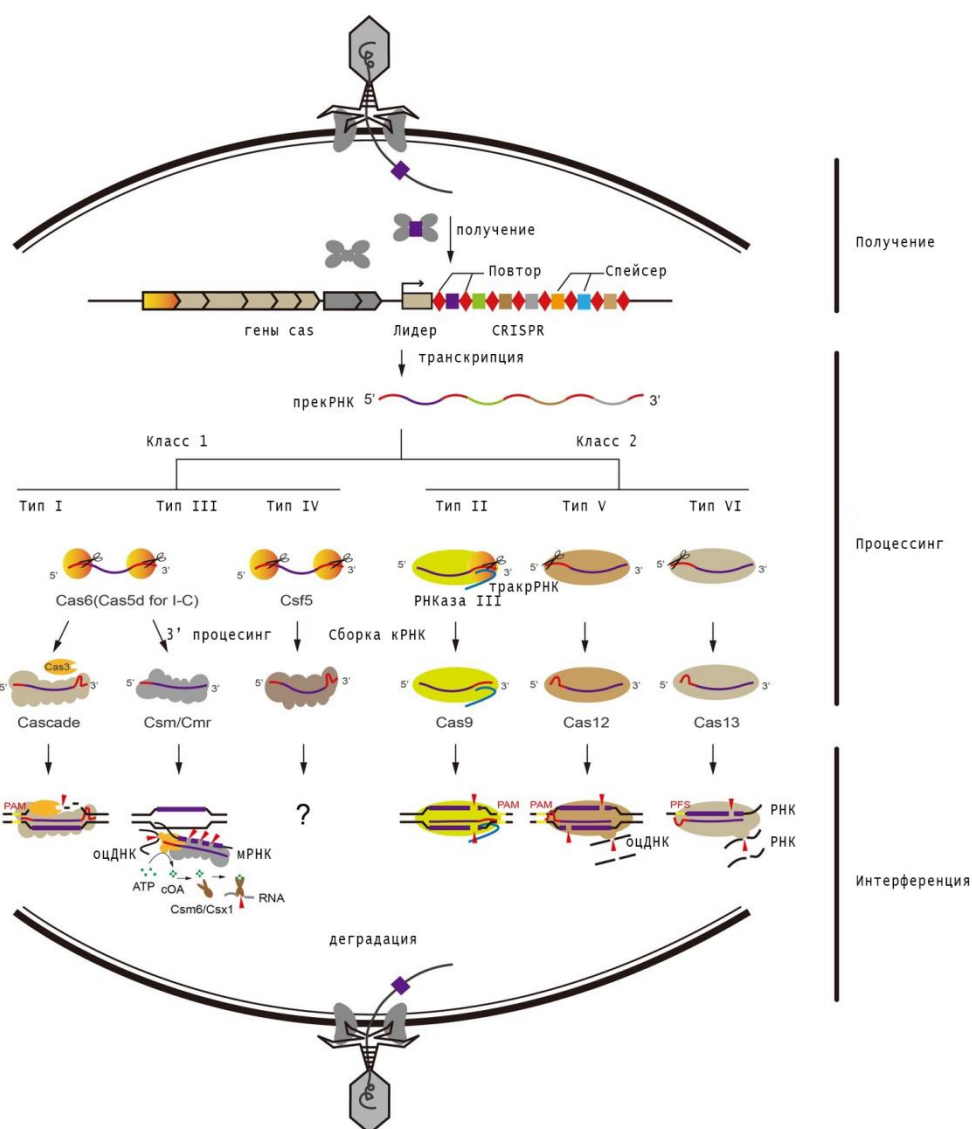


Рисунок 3. Схема адаптивного иммунитета систем CRISPR-Cas. Адаптивный иммунитет систем CRISPR-Cas состоит из трех этапов: адаптации, обработки и вмешательства. Существуют общие пути для систем CRISPR-Cas класса 1 и класса 2. (1) Короткие фрагменты вторгающихся нуклеиновых кислот вставляются в виде новых спейсеров в локус CRISPR адаптационными белками. (2) Локус CRISPR транскрибируется в пре-кРНК. В системах класса 1 пре-кРНК преобразуется в зрелые кРНК с помощью CRISPR-ассоциированной нуклеазы (Cas6 для типов I и III, Cas5d для типов I-C, Csf5 для типа IV). В системах класса 2 Cas9 связывает и стабилизирует дуплекс тракрРНК: кРНК и дополнительно привлекает РНКазу III для процессинга кРНК. Эффекторные белки типов V и VI сами осуществляют нуклеазную активность для созревания кРНК. (3) Зрелые кРНК направляют эффекторные комплексы CRISPR-Cas для расщепления чужеродных нуклеиновых кислот посредством соответствующего механизма на основе комплементарности последовательностей между кРНК и целевой последовательностью. (по Li and Peng 2019)

2.2.3 CRISPR-Cas как новый инструмент для редактирования генома

Летом 2012 года две независимые команды сообщили о биохимических свойствах частично восстановленных систем CRISPR-Cas *in vitro* и вышли за рамки современных тогда знаний, предположив, что их элементы могут использоваться в качестве

инструментов редактирования генома (Jinek et al., 2012; Gasiunas et al., 2012). Совместными усилиями лаборатории Jennifer Doudna в США и Emmanuelle Charpentier в Швеции воссоздали *in vitro* и продемонстрировали функцию трех из шести элементов системы CRISPR-Cas9 *Streptococcus pyogenes* (тракрРНК, кРНК и белка Cas9), которые нацеливаются на специфическую последовательность ДНК, гомологичную спейсерной области кРНК и разрезают её, создавая двуцепочечный разрыв (DSB) (Jinek et al., 2012). В том же исследовании было показано, как тракрРНК и кРНК могут быть слиты в кгРНК (короткая гидовая РНК), химерную синтетическую молекулу РНК, которая сохраняет все свойства двух исходных малых РНК (рис. 4). Это замечательное достижение еще больше упростило и без того очень простой способ использования РНК-направленной ДНК-эндонуклеазы (Cas) в качестве инструмента для программируемого редактирования генома (Jinek et al., 2012).

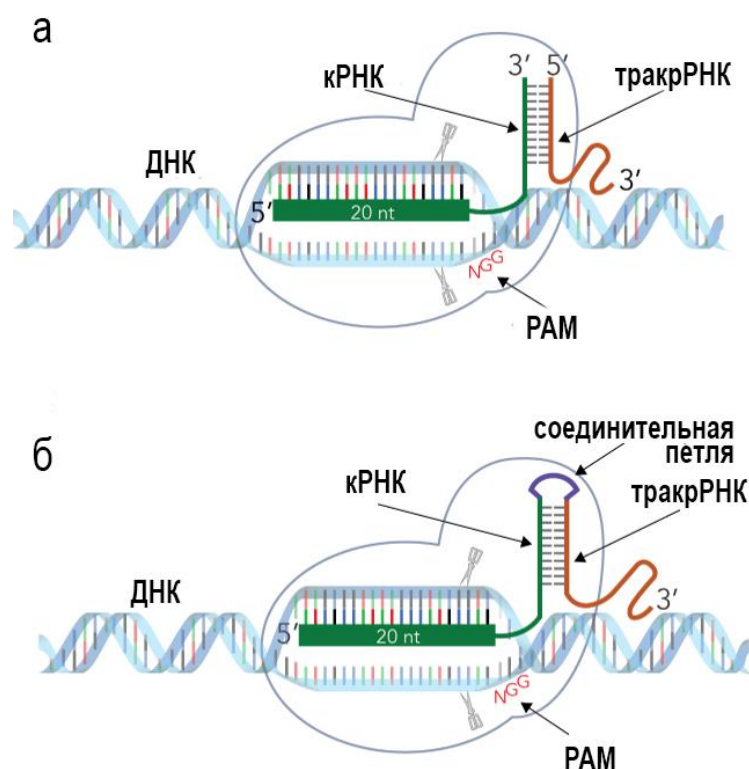


Рисунок 4. **Схема комплекса CRISPR/Cas9:РНК:ДНК.** А - схема нативного комплекса с кРНК и тракрРНК, Б - схема комплекса с синтетической кгРНК. (по Packier 2016)

Параллельно с исследованием Doudna и Charpentier (Jinek et al., 2012; Lander 2016) группа Siksnys в сотрудничестве с Barrangou и Horvath провела оценку функции системы *Streptococcus thermophilus* типа II *in vitro* (Gasiunas et al., 2012). Их результаты были

сходными и продемонстрировали решающую роль комплексов кРНК и Cas9 во внесении DSB в последовательности ДНК, на которые нацелены кРНК. Они также поняли важность этих открытий и предположили, что универсальные программируемые РНК-управляемые ДНК-эндонуклеазы могут быть сконструированы как уникальные молекулярные инструменты для РНК-управляемой ДНК-хирургии (Gasiunas et al., 2012). Эти две пионерские публикации побудили несколько лабораторий оценить предполагаемые возможности редактирования генома с использованием этих недавно охарактеризованных бактериальных РНК-программируемых ДНК-эндонуклеаз (Barrangou 2012).

Менее чем 6 месяцев потребовалось на экспериментальное подтверждение предсказаний, сделанных в этих первоначальных публикациях основателями зарождающейся технологии геномного редактирования с применением системы CRISPR-Cas9. К январю 2013 года три независимые группы из США, одна во главе с Luciano Marraffini (Jiang et al., 2013), другая - Feng Zhang (Cong et al., 2013) в сотрудничестве с Luciano Marraffini, а третья - George Church (Mali et al., 2013), сообщили об успешном редактировании геномов бактерий (Jiang et al., 2013) и млекопитающих (Cong et al., 2013; Mali, P. et al., 2013) с использованием Cas9. Инструменты CRISPR-Cas9, полученные из *S. pyogenes*, были усовершенствованы, а ген *cas9* адаптирован для млекопитающих с помощью оптимизации кодонов (человека) для эффективной модификации генома различных типов клеток млекопитающих от мышей и людей (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013), включая плюрипотентные клетки. Позже в том же месяце в независимом исследовании также было сообщено об образовании DSB в конкретном локусе в клетках человека с использованием метода CRISPR-Cas9 (Jinek et al., 2013). С этих публикаций начался настоящий бум исследований фундаментальных и прикладных с использованием технологии CRISPR-Cas в различных областях наук о жизни и редактирования генома у эукариот (Doudna, Charpentier 2014; Hsu et al., 2014; Gasiunas, Siksnys 2013) и прокариот (Gasiunas, Siksnys 2013; Selle, Barrangou 2015).

Прошло еще несколько месяцев и появились первые публикации, в которых сообщалось об аналогичных исследованиях *in vivo* на позвоночных. Группа ученых из Китая представила предварительные результаты по редактированию генома у эмбрионов мышей и рыбок данио, хотя в работе отсутствовала информация о передаче мутаций в зародышевую линию, отредактированную с помощью системы CRISPR-Cas генома (Shen et al., 2013). CRISPR-Cas9 был официально представлен как новейший инструмент для улучшенного целевого трансгенеза у млекопитающих в мае 2013 года, когда лаборатория Rudolf Jaenisch в сотрудничестве с Feng Zhang опубликовала свое впечатляющее исследование, в котором за один шаг были введены множественные мутации в

определенные гены, а также было проведено редактирование двух генов путем прямой доставки реагентов CRISPR-Cas9 в эмбрионы мыши или в эмбриональные стволовые клетки (Wang et al., 2013). Позже в том же году та же лаборатория дополнительно задокументировала универсальность подходов CRISPR-Cas9 к редактированию генома мышей, продемонстрировав его применение в создании нок-ин (knock in) репортера и мутантных аллелей, проявление которых зависит от внешних условий (Yang et al., 2013). Эти четыре новаторские статьи (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013; Wang et al., 2013; Yang et al., 2013) вместе с размещением и эффективным академическим распространением всех описанных реагентов CRISPR-Cas9 через некоммерческий репозиторий плазмид Addgene (Joung et al., 2015) положили начало многочисленным исследованиям *in vitro* на многих типах клеток и экспериментам *in vivo* на многих видах млекопитающих (Doudna, Charpentier, 2014; Hsu et al. 2014; Sander, Joung, 2014).

2.2.4 Редактирование РНК на основе систем CRISPR/Cas

Новый поворот в развитии технологий CRISPR/Cas связан с открытием эндонуклеаз Cas, нацеленных на молекулы РНК. Одним из наиболее известных является белок Cas13 класса 2, тип VI (включая Cas13a и Cas13b). В отличие от большинства систем CRISPR/Cas, у Cas13 отсутствует мотив ДНКазы, но вместо этого он содержит два домена РНКаз (HEPN). Cas13 расщепляет исключительно молекулы РНК-мишени (Abudayyeh et al. 2016) и способен расщеплять молекулы одноцепочечной РНК (оцРНК), содержащие сайты, гомологичные кРНК. Интересно, что, как и Cas12a, Cas13 не нуждается в тракрРНК и зависит только от кРНК (рис. 1) (Abudayyeh et al. 2017; Cox et al. 2017). Учитывая, что большинство вирусов растений содержат РНК геномы, эти исследования открывают новые технологические возможности для борьбы с вирусами растений, которые будут обсуждены ниже.

Интересно, что в то время как комплекс Cas13:кРНК опосредует высокоспецифичное нацеливание и расщепление РНК у эукариот, он ведет себя иначе у прокариот и *in vitro*, в частности, он обладает способностью неспецифически атаковать другие оцРНК, будучи однажды активированный посредством начального специфического расщепления (East-Seletsky et al. 2016). Этот побочный эффект может быть использован для разработки высокочувствительных методов диагностики вирусов, в которых используется так называемый подход с высокочувствительным ферментативным разблокированием репортера (SHERLOCK), разработанный Gootenberg et al. (2017) для точного определения нуклеиновых кислот.

Другой широко используемой нуклеазой для редактирования РНК является FnCas9 из *F.novicida* (Price et al. 2015). Этот фермент также работает совместно с направляющей

РНК, и нацеливается на эндогенную РНК *in vivo*. Однако в отличие от Cas13, этот белок не содержит доменов HEPN. Было высказано предположение, что FnCas9 может либо рекрутировать эндогенные РНКазы для расщепления целевой РНК, либо обладать альтернативными доменами с эндонуклеолитической активностью (Ma et al. 2016). Как и Cas13, FnCas9 была перепрограммирована для нацеливания и ингибирования РНК-содержащих вирусов человека и растений путем блокирования трансляции и репликации вирусной РНК (Price et al. 2015; Zhang et al. 2018).

2.3 Использование системы CRISPR/Cas для создания растений, устойчивых к вирусам.

2.3.1 Получение растений, устойчивых к ДНК-содержащим вирусам, с использованием технологии CRISPR/ Cas9

Как упоминалось выше, технология CRISPR предоставляет новые инструменты для создания устойчивости растений к вирусам. К ним относятся подходы прямого подавления вирусов или придания устойчивости к вирусам у растений-хозяев путем мутации их генов «восприимчивости» (Таблица 1).

Большинство исследований прямого использования системы CRISPR/Cas было выполнено на вирусах, принадлежащих к семейству *Geminiviridae* (таблица 1), которое состоит из девяти родов. Эпифитотии геминивирусных заболеваний вызывают значительные потери урожая некоторых экономически важных культур во всем мире, что увеличивает глобальный спрос на стратегии устойчивости к этим вирусам. Геминивирусы - икосаэдрические вирусы с одним или двумя кольцевыми оцДНК геномами. дцДНК образуется при репликации этих вирусов (Hanley-Bowdoin et al. 2013) и, следовательно, может являться непосредственной мишенью для CRISPR.

Таблица 1. Устойчивые к ДНК вирусам растения, созданные с использованием технологии CRISPR/Cas

Вирус	Растение	Эффекторный белок	Последовательность	Тип доставки / экспрессии	Ссылки
Прямое взаимодействие с ДНК вирусами					
BSCTV	<i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	SpCas9	БО, гены Rep; межгенные участки (IR)	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК-трансгенные растения	Ji et al. 2015
BeYDV	<i>N. benthamiana</i>	SpCas9	Rep/RepA; длинные межгенные участки (LIR)	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК-трансгенные растения	Baltes et al. 2015
TYLCV BCTV MeMV CLCuKoV	<i>N. benthamiana</i>	SpCas9	БО, гены Rep; IR	<i>Agrobacterium</i> ; Доставка кгРНК при помощи TRV	Ali et al, 2015 Ali et al. 2016

CLCuMuV	<i>N. benthamiana</i>	SpCas9	C1 Гены Rep и IR	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения	Yin et al. 2019
CLCuV	<i>N. benthamiana</i>	SpdCas9	IR	<i>Agrobacterium</i> ; dCas9/кгРНК транзистентная экспрессия	Khan et al. 2019
WDV	<i>Hordeum vulgare</i> (ячмень)	SpCas9	ТП/БО, Rep/RepA и LIR	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения	Kis et al. 2019
TYLCV	<i>Solanum lycopersicum</i> (томат) <i>N. benthamiana</i>	SpCas9	БО, гены Rep	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения	Tashkandi et al. 2018
ACMV	<i>Manihot esculenta</i> (кассава)	SpCas9	Гены AC2 и AC3 кодирующие вирусные белки TrAP и Rep соответственно	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения	Mehta et al. 2019
CaMV	<i>A. thaliana</i>	SpCas9	БО	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения	Liu et al. 2018
BSV (eBSV)	<i>Musa spp</i> (банан)	SpCas9	Вирусные ORF1, ORF2, ORF3 интегрирован- ные в геном растения	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения	Tripathy et al. 2019

Первые эксперименты по созданию CRISPR-опосредованной устойчивости к геминивирусам были проведены на вирусе суровой курчавости верхушек свеклы (BSCTV, род *Curtovirus*) и на вирусе желтой карликовости бобов (BeYDV, род *Mastervirus*) в растениях *Nicotiana benthamiana* и *Arabidopsis thaliana* (таблица 1) (Baltes et al. 2015; Ji et al. др. 2015). Конструкции CRISPR/Cas9 (включая кгРНК и Cas9) были нацелены на разрезание кодирующих (таких как ген белка, связанного с репликацией [Rep]) и некодирующих областей в вирусных геномах (таких как сайты связывания Rep и инвариантная некодирующая последовательность - нанонуклеотид [TAATATTAC], общая для всех геминивирусов, содержащаяся в межгенной области [IR]). Растения были трансформированы полученными конструкциями, и было показано, что трансгенные растения демонстрируют высокий уровень устойчивости к целевому вирусу, что проявляется в снижении (до 87%) накопления вируса и уменьшения проявления симптомов (Baltes et al. 2015; Ji et al. 2015).

В другом подходе Ali et al. (2015) сконструировали молекулы кгРНК, специфически нацеленные на кодирующие и некодирующие последовательности другого геминивируса, вируса желтой курчавости листьев томатов (TYLCV, род *Begomovirus*),

включая ген белка оболочки, мотив RCRII (сайт, участвующий в сборке белков и расщеплении ДНК), мотив гена *Rep* и консервативную некодирующую петлю в межгенной области IR. Трансгенные растения *N.benthamiana*, экспрессирующие Cas9, заражали вирусным вектором на основе вируса погрелковости табака (TRV), с которого синтезировались кгРНК. Все использованные конструкции придавали растениям устойчивость к инфицированию TYLCV, но самый сильный ингибирующий эффект наблюдался в случае кгРНК, нацеленной на последовательность петли в IR. Таким образом, можно предположить, что все другие геминивирuses, содержащие тот же участок (петля в IR), также могут быть мишенью для этой системы CRISPR/Cas9. В соответствии с этим предположением, было показано, что одна и та же кгРНК (при доставке в трансгенные растения *N. benthamiana* с гиперэкспрессией Cas9), придает устойчивость растений к смешанной инфекции геминивирuses - вирусу курчавости верхушек свеклы (BCTV, род *Curtovirus*) с однокомпонентным геномом и вирусу мозаики мерремии (MeMV, род *Begomovirus*) с двухкомпонентным геномом, имеющими идентичные консервативные последовательности петли в IR (Ali et al. 2015).

Ali et al. (2016) был описан другой интересный эффект CRISPR/Cas9 на геминивирусную инфекцию. Хотя система CRISPR/Cas9 эффективна при использовании кгРНК, комплементарных кодирующим и некодирующим последовательностям в вирусном геноме, однако в первом случае при репарации разрывов ДНК по механизму NHEJ выявлена высокая вероятность образования вариантов вирусного генома, способных к репликации и дальнему транспорту по растению, т.е. способных избегать редактирования и даже приводить к появлению более жизнеспособных вариантов вируса. Напротив, использование кгРНК против некодирующих межгенных последовательностей обеспечивает противовирусную активность и значительно снижает вероятность появления вариантов вируса, способных к репликации. Хотя причина этих различий остается неясной, некодирующие вирусные последовательности, по-видимому, могут быть лучшей целью для достижения CRISPR/Cas-опосредованной устойчивости. Кроме того, использование межгенной области вирусного генома в качестве целевой последовательности позволяет получить растения, устойчивые к нескольким геминивирuses, и, следовательно, может рассматриваться как перспективная стратегия для создания надежной и долговременной защиты растений от нескольких родственных вирусов. Интересно, что в отличие от небольших инделей, детектируемых при использовании кгРНК против кодирующих областей, в случае кгРНК против области IR вирусов CLCuKoV и TYLCV были выявлены только длинные делеции размером от 61 до 360 нуклеотидов (Ali et al. 2016).

В другом подходе для увеличения эффективности и продолжительности CRISPR-опосредованной устойчивости Yin et al. (2019) использовали трансгенные растения *N. benthamiana*, экспрессирующие Cas9 и двойные кгРНК, которые были одновременно нацелены на две разные последовательности (*Rep* и *IR*) в геноме другого однокомпонентного геминивируса, малтановского вируса курчавости листьев хлопка (CLCuMuV, род *Begomovirus*). В результате растения были полностью устойчивы к CLCuMuV.

Интересно, что мутационная инактивация доменов каталитической эндонуклеазы Cas9 не полностью предотвращает ее способность подавлять геминивирусные инфекции (Khan et al. 2019). Показано, что каталитически неактивный Cas9 (dCas9) все еще способен частично ингибировать репликацию и накопление однокомпонентного геминивируса, вируса курчавости листьев хлопка (CLCuV, род *Begomovirus*), при использовании кгРНК, нацеленной на консервативную нанонуклеотидную последовательность, участвующую в инициации репликации вируса (Khan et al. 2019). Это указывает на то, что связывание Cas9 с ДНК само по себе (без дальнейшего разрезания) может привести к ингибированию репликации вируса, хотя дальнейшее разрезание может значительно повысить эффективность подавления вирусной инфекции.

Хотя большинство исследований CRISPR-опосредованной устойчивости к геминивирусам проводилось на модельных растениях, недавно было начат перенос этих исследований на культурные растения. В частности, Kis et al. (2019) получили растения ячменя с устойчивостью к вирусу карликовости пшеницы (WDV, однокомпонентному вирусу, принадлежащему к роду *Begomovirus*), в то время как Tashkandi et al. (2018) получили растения томата с устойчивостью к TYLCV. Хотя целевые сайты в этих исследованиях находятся в кодирующих областях вирусного генома, об индукции новых форм вируса не сообщалось. Однако, другие попытки создать устойчивость к геминивирусам с использованием систем CRISPR, нацеленных на кодирующие области, были не столь успешными (Mehta et al. 2019). Авторам не удалось вызвать устойчивость к вирусу мозаики африканской маниоки (ACMV, двухкомпонентный вирус, род *Begomovirus*) у трансгенных растений маниоки с гиперэкспрессией Cas9 и кгРНК, нацеленной на ген *AC2*, кодирующий белок активатора транскрипции, и ген *AC3*, кодирующий белок энхансера репликации. Вместо этого они обнаружили, что редактирование привело к образованию новых (устойчивых к CRISPR) вариантов ACMV, которые, вероятно, были созданы в результате репарации после расщепления (NHEJ). Эти события могут вызвать быструю эволюцию вируса, потенциально ведущую к развитию новых патогенных форм вируса (Mehta et al. 2019), как обсуждалось выше.

Помимо геминивирусов, CRISPR/Cas также применялся против вируса мозаики цветной капусты (CaMV, семейство *Caulimoviridae*, род *Caulimovirus*), который представляет собой параретровирус с дцДНК. Liu et al. (2018) сообщили, что трансгенная экспрессия Cas9 вместе с множественными кгРНК, нацеленными на ген белка оболочки CaMV, приводила к проявлению значительной устойчивости к CaMV у растений. Однако, кроме этого, они также обнаружили некоторые формы вируса с мутациями, которые могут ускользать от нуклеазной системы и распространяться в системно.

Некоторые параретровирусы, такие как вирус полосатости банана (BSV, семейство *Caulimoviridae*, род *Badnavirus*), могут интегрировать свою ДНК в геном растения-хозяина, образуя эндогенный вирус (eBSV), который может активироваться в условиях стресса (Harper et al. 1999). Для того чтобы удалить патогенный вирус из генома хозяина, Tripathi et al. (2019) получили трансгенные растения банана, экспрессирующие Cas9 и кгРНК, нацеленные на кодирующие области в геноме eBSV. Полученные трансгенные растения содержали мутации в целевых сайтах, которые нарушали потенциальную кодирующую способность eBSV, и были устойчивы к реактивации латентного вируса в условиях водного стресса по сравнению с контрольными нетрансгенными растениями.

2.3.2 Получение растений, устойчивых к РНК-вирусам, с использованием системы CRISPR/Cas

РНК-содержащие вирусы - наиболее распространенные вирусы растений, которые приводят к разрушительным потерям урожая у широкого спектра важных сельскохозяйственных культур. Открытие эндонуклеаз Cas (FnCas9 и Cas13), способных к нацеливанию и расщеплению РНК, может привести к новым подходам для борьбы с инфекциями вирусов растений с РНК геномами (рис. 5). В первом исследовании CRISPR-опосредованной устойчивости к РНК-вирусам растений Zhang et al. (2018) трансгенно экспрессировали FnCas9 и кгРНК, нацеленные на различные области в геноме РНК вируса табачной мозаики (TMV, семейство *Virgaviridae*, род *Tobamovirus*) и вирусу огуречной мозаики (CMV, семейство *Bromoviridae*, род *Cucumovirus*) в растениях *N. benthamiana* и *A. thaliana*. Обнаружено, что накопление вирусов в трансгенных растениях заметно снижается (от 40 до 80%) по сравнению с контролями (растения дикого типа). Интересно, что мутационная инактивация известных нуклеазных доменов в FnCas9 не влияла на ее ингибирующую активность (таблица 2) (Zhang et al. 2018).

Таблица 2. Устойчивые к РНК вирусам растения, созданные с использованием технологии CRISPR/Cas

Вирус	Растение	Эффек- торный белок	Последователь- ность	Тип доставки / экспрессии	Ссылки
-------	----------	------------------------	-------------------------	------------------------------	--------

Прямое взаимодействие с РНК вирусами					
TMV CMV	<i>N. benthamiana</i> <i>A. thaliana</i>	FnCas9;	ORF1, ORF2, ORF3, БО и 3'НТО	<i>Agrobacterium</i> ; FnCas9 или FndCas9 /кгРНК- трансгенные растения	Zhang et al. 2018
TuMV	<i>N. benthamiana</i>	LshCas13a	HC-Pro, БО; GFP	<i>Agrobacterium</i> ; Cas13a трансгенные растения. Доставка кгРНК при помощи TRV	Aman et al. 2018
TMV	<i>N. benthamiana</i>	LshCas13a	Вирусные последователь- ности в геноме TMV	<i>Agrobacterium</i> ; Cas13a/кгРНК- транзистентная экспрессия	Zhang et al. 2019
SRBSDV RSMV	<i>Oriza sativa</i> (рис)	LshCas13a	Вирусные последователь- ности в геноме SRBSDV и RSMV	<i>Agrobacterium</i> ; Cas13a/кгРНК- трансгенные растения	Zhang et al. 2019
PVY	<i>Solanum tuberosum</i> (картофель)	LshCas13a	P3, CI, Nib, БО	<i>Agrobacterium</i> ; Cas13a/кгРНК- трансгенные растения	Zhan et al. 2019

Это может указывать на то, что FnCas9 либо обладает другим нераспознанным доменом РНКазы, либо ее эндонуклеазная функция не требуется для ингибирования накопления вируса; возможно, что простое связывание вирусной РНК с помощью FnCas9 может привести к ингибированию репликации или трансляции вирусной РНК.

Другая эндонуклеаза, Cas13, также была использована для создания устойчивости к вирусной инфекции у растений (Amanet al. 2018). Например, растения *N. benthamiana*, временно (транзистентно) или трансгенно гиперэкспрессирующие гены Cas13a и кгРНК (таблица 1) (Amanet al. 2018), нацеленные на гены вируса мозаики репы TuMV (род *Potyvirus*) или вируса табачной мозаики (Zhang et al. 2019), были заметно более устойчивы к инфекции соответствующими вирусам. Подобные подходы были успешно использованы для создания устойчивости сельскохозяйственных культур картофеля и риса против оцРНК вируса картофеля Y (PVY) (семейство *Potyviridae*, род *Potyvirus*) (Zhan et al. 2019) и рабдовирусов (семейство *Rhabdoviridae*), вируса южной черной штриховатой карликовости риса SRBSDV (род *Fijivirus*) и вируса штриховатой мозаики риса (RSMV, род *Cytorhabdovirus*) у риса (Zhang et al. 2019).

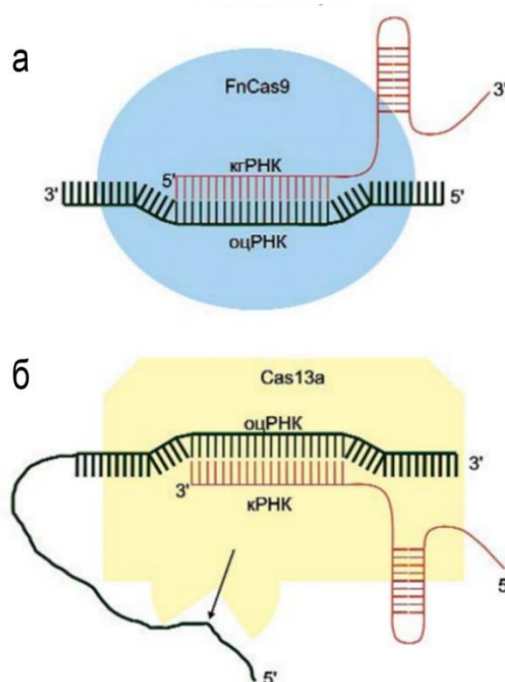


Рисунок 5. Схематическое изображение различных систем CRISPR/Cas для редактирования РНК-мишеней. Представлены эффекторы CRISPR/Cas в комплексе с направляющими их короткими РНК. а – эндонуклеаза FnCas9 в комплексе с кРНК и одноцепочечной (оц) РНК-мишенью. Связывание комплекса с оцРНК ингибирует репликацию/трансляцию вирусной РНК; б – эндонуклеаза Cas13a в комплексе с кРНК и оцРНК-мишенью. Место разрезания оцРНК обозначено стрелкой

В совокупности эти данные показывают, что эндонуклеазы Cas, которые непосредственно нацелены на вирусную РНК (например, FnCas9 или Cas13, рис. 3), являются потенциально мощным инструментом в разработке устойчивости растений к РНК-вирусам. Однако такие противовирусные подходы требуют постоянной экспрессии компонентов CRISPR/Cas системы, которая в настоящее время достигается только в трансгенных растениях. Таким образом, практическое применение подобных подходов прямого действия может быть ограничено, поскольку рассматриваемые растения являются трансгенными и могут подвергаться воздействию жестких правил в отношении генетически модифицированных организмов (ГМО), и преодоление этих нормативных ограничений будет сложной задачей для будущих исследований.

2.3.3 CRISPR-опосредованное редактирование генов растения-хозяина для защиты от вирусной инфекции

Платформа CRISPR/Cas9 может использоваться для изменения уровней экспрессии генов хозяина, регулирующих устойчивость растений или чувствительность к вирусным инфекциям. Известно, что трансляция РНК-содержащих потивирусов требует взаимодействия фактора инициации трансляции эукариот 4E (eIF4E или его изоформы eIF (iso) 4E) с белком VPg, ковалентно связанным с 5'-концом вирусной геномной РНК.

Естественная устойчивость к потивирусам обычно связана с мутацией в белке eIF4E / eIF (iso) 4E, которая препятствует его взаимодействию с VPg (Robaglia and Caranta 2006; Estevan et al. 2014). Chandrasekaran et al. использовали конструкции на основе бинарного вектора pRCS, экспрессирующего ген *cas9* под контролем промотора 35S, и кгРНК, нацеленных на 5'- и 3'-концы гена *eIF4E* под контролем промотора AtU6 (Chandrasekaran et al. 2016). Были получены трансгенные растения огурца, в которых экспрессия этой системы Cas9 / кгРНК индуцировала делеции в гене *eIF4E*. Дальнейшее скрещивание этих растений с растениями дикого типа генерировало потомство, несущее делеции в гене *eIF4E*, но без чужеродных последовательностей гена Cas9 или кгРНК. Эти растения были устойчивы к потивирусам, таким как вирус пожелтения вен огурца (CVYV), вирус желтой мозаики цуккини (ZYMV) и вирус мозаики кольцевых пятен папайи (PRSV) (Chandrasekaran et al. 2016). Аналогично, используя бинарный вектор pDE-Cas9, Pyott et al. получил конструкцию pDE-Cas9-sgAtelF (iso) 4E, экспрессирующую ген эндонуклеазы Cas9, с промотором PcUbi4-2 и кгРНК, нацеленную на 5'-конец гена *eIF(iso)4E A.thaliana* (регион +15 – +35 от сайта инициации трансляции) под промотором AtU6-26. Используя эти конструкции, были получены трансгенные растения арабидопсиса, и их ДНК была проанализирована с помощью ферментативного теста T7E1, который показал наличие делеций в целевой области гена *eIF(iso)4E*. После скрещивания их с сортом дикого типа, были получены растения, устойчивые к вирусу мозаики репы (TuMV) (род *Potyvirus*), но не экспрессирующие ген Cas9 и кгРНК (Pyott et al. 2016) (Таблица 3).

Таблица 3. Устойчивые к вирусам растения, созданные с использованием технологии CRISPR/Cas, посредством модификации генома растений

Вирус	Растение	Эффекторный белок	Последовательность	Тип доставки / экспрессии	Ссылки
Устойчивость к вирусу, опосредованная модификацией генома растения					
CVYV ZYMV PRSMV	<i>Cucumis sativus</i> (огурец)	SpCas9	eIF4E	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения (с последующим удалением трансгена)	Chandrasekaran et al. 2016
TuMV	<i>A. thaliana</i>	SpCas9	eIF(iso)4E	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения (с последующим удалением трансгена)	Pyott et al. 2016
RTSV	<i>O. sativa</i> (рис)	SpCas9	eIF4G	<i>Agrobacterium</i> ; Cas9/кгРНК- трансгенные растения	Macovei et al. 2018
CIYVV	<i>A. thaliana</i>	Sp-nCas9-	eIF4E	<i>Agrobacterium</i> ;	Bastet et al.

		Цитидин деаминаза	gene	nCas9/кгРНК- трансгенные растения (с последующим удалением трансгена)	2019
PVY	<i>S. tuberosum</i> (картофель)	SpCas9	коилин	РНП(Cas9/кгРНК); Вакуумная инфильтрация или бомбардмент	Makhotenk o et al. 2019

Обе лаборатории создали трансгенные растения, которые потеряли гетерологичные последовательности для гена *Cas9* и кгРНК при скрещивании с растениями дикого типа. Полученные растения были устойчивы к выбранным вирусам. Следовательно, можно получить нетрансгенные растения с требуемыми характеристиками, используя методы редактирования генома. Однако вопрос о том, следует ли считать растения, полученные с использованием технологии CRISPR/Cas, ГМО, остается открытым (Jones 2015; Sprink et al. 2016).

Следует отметить, что скрещивание с видами дикого типа для получения растений с необходимыми свойствами, но с отсутствием гетерологичных последовательностей (метод «избавления от трансгенов»), возможно не для всех видов. Этот подход сложен или даже невозможен для растений с длительным жизненным циклом, многолетних растений и растений с вегетативным размножением. В последнем случае метод приводит к утрате сортовых особенностей.

2.4 Системы доставки компонентов CRISPR/Cas

Растительные клетки окружены толстой клеточной стенкой, что исключает применение липофекции, микроинъекции или электропорации, обычно используемых для редактирования генома в клетках человека и животных. Для доставки в растительные клетки CRISPR/Cas может быть «упакован» в различные формы: (1) ДНК-плазида (-ы), кодирующая белок Cas и кгРНК, (2) мРНК Cas (которая будет транслироваться с образованием белка Cas *in planta*) при условии наличия системы экспрессирующей кгРНК и (3) РНП-комплексами, состоящими из белка Cas и кгРНК (Ran et al. 2017). Современные способы введения реагентов CRISPR/Cas в клетки растений включают в себя агробактериально-опосредованный перенос генов, трансфекцию протопластов, доставку, опосредованную вектором на основе вируса растений, биобаллистическую доставку с использованием наночастиц как платформ (Ran et al. 2017).

Агробактериально-опосредованный перенос генов может быть использован для временной или трансгенной экспрессии обоих компонентов системы CRISPR/Cas: генов белка Cas и кгРНК. Это наиболее широко используемый метод доставки для

редактирования геномов широкого спектра модельных растений и сельскохозяйственных культур (Ran et al. 2017, см. также таблицу 1). Однако у него есть некоторые недостатки, в том числе: (1) зависимость от вида растений и сорта, так как некоторые растения, в частности однодольные, сложны для трансформации и / или регенерации всего растения, (2) внедрение чужеродной ДНК в клетки растения, которая может включаться в геном растения, что препятствует коммерциализации трансгенных (генетически модифицированных) растений и (3) длительная экспрессия CRISPR/Cas, что может увеличить частоту нецелевого редактирования.

Вирус-опосредованная доставка. В течение более двадцати лет растительные вирусы использовались в качестве автономно реплицирующихся векторов для экспрессии чужеродных белков и РНК (Zaidi and Mansoor 2017; Cody and Scholthof 2019). Недавно вирусные векторы также были описаны в качестве «средств» для эффективной доставки компонентов редактирования генов в растительные клетки. Примечательно, что как ДНК-векторы, а именно вирус желтой карликовости бобов (BeYDV); вирус скручивания листьев капусты (CaLCuV) и вирус карликовости пшеницы (WDV), так и РНК-векторы: вирус погресковости табака (TRV) оказались эффективными системами для доставки реагентов CRISPR/Cas в модельные растения и культуры (Baltes et al. 2014; Čermák et al. 2015; Ali et al. 2015; Ran et al. 2017; Zaidi and Mansoor 2017).

TRV (вирус погресковости табака) – вирус с оцРНК геномом положительной полярности, на основе которого был сконструирован эффективный вирусный вектор, главным образом, для анализа функции генов путем сайленсинга (Ratcliff et al. 2001). Он также использовался для доставки кгРНК-компонента системы CRISPR/Cas (Ali et al. 2015). Однако из-за неспособности вектора TRV экспрессировать последовательности, кодирующие высокомолекулярные белки, такие как Cas, его следует инокулировать в трансгенные растения, которые экспрессируют ген белка Cas.

Чтобы преодолеть технические препятствия, на пути успешной экспрессии гена *Cas9* с использованием вирусных векторов, Kaya et al. (2017) использовали подход с разделением белка на части. Показано, что два фрагмента белка Cas9, которые временно экспрессировались с использованием вектора на основе вируса мозаики томата (ToMV) и агробактерии, соответственно, были способны собираться с образованием активного белка Cas9 и индуцировать целевой мутагенез в клетках растений. Таким образом, подход split-Cas9 может представлять новый мощный инструмент для редактирования генома растений без интеграции ДНК, избегая необходимости получения трансгенных растений. Однако последующее избавление от вируса может стать серьезной проблемой, затрудняющей практическое применение систем редактирования на основе вирусов

растений. Это препятствие может быть преодолено во время культивирования ткани апикальных меристем, поскольку хорошо известно, что это приводит к потере вируса в инфицированном материале.

Трансфекция протопластов. Трансфекция протопластов была продемонстрирована как эффективный метод доставки реагентов CRISPR/Cas в некоторые растительные системы (Ran et al. 2017). Более того, протопласты могут быть трансформированы не только ДНК, которая экспрессирует гены кгРНК и эндонуклеазы Cas, но также и РНП-комплексов (кгРНК и мРНК Cas). Кроме того, предварительно образованные РНП-комплексы кгРНК:Cas могут быть доставлены в протопласты с помощью трансфекции или биобаллистики, что продемонстрировано для растений табака, арабидопсиса, салата, петунии, кукурузы, пшеницы и картофеля (Arif et al, 2012; Weeks et al. 2016; Mohanta et al 2017; Dominguez et al. 2016; Barrangou et al. 2007; Chaparro-Garcia et al. 2015). Эта технология исключает возможность интеграции чужеродной ДНК в геном растения (таким образом, регенерированные растения полностью свободны от трансгенов). Вместе с тем, несмотря на успешное редактирование протопластов кукурузы и пшеницы (Weeks et al. 2016; Mohanta et al 2017) для большинства однодольных растений, к которым относятся основные продовольственные культуры, регенерация растений из протопластов остается технически сложной и малоэффективной. Однако надо отметить, что потенциальным узким местом этого подхода может быть регенерация протопластов в жизнеспособные растения, поскольку это длительный кропотливый процесс, который часто требует оптимизации в зависимости от вида растения и сорта культуры. Для большинства однодольных растений, к которым относятся основные продовольственные культуры, регенерация растений из протопластов остается технически сложной и малоэффективной (Zaidi et al. 2016).

Доставка с использованием функционализированных нано/микрочастиц. Использование нано/микрочастиц для доставки генов и компонентов редактирующего комплекса в клетки растений имеет значительные преимущества по сравнению с традиционно используемыми методами генетической трансформации растений. Во-первых, подходы с использованием наночастиц применимы как к однодольным, так и к двудольным растениям, независимо от типа ткани или органа. Во-вторых, наночастицы легко функционализируются биологически активными макромолекулами и комплексами для дальнейшего повышения эффективности трансформации. Наконец, использование наночастиц упрощает так называемую мультигенную трансформацию растений. Эти ключевые свойства делают наночастицы удобными и эффективными средствами доставки активных компонентов для генетической инженерии сельскохозяйственных культур.

Показано, что наночастицы оксида цинка и углеродные нанотрубки проникают в ткани семян томатов (*Lycopersicon esculentum*) и корни растений, что указывает на то, что новые системы доставки питательных веществ могут быть разработаны путем использования наноразмерных пор на поверхности растений. В настоящее время наиболее широко применяемым является метод биобаллистики или биолистики, который позволяет трансфекцию клеток путем бомбардировки их микроносителями (такими как микрочастицы золота или вольфрама), покрытыми ДНК (Ran et al. 2017). ДНК доставляется в клетку с помощью генной пушки, которая облегчает проникновение через клеточную стенку растения. Этот метод успешно использован для доставки плазмид, кодирующих кгРНК, а также белки Cas, в *Brachypodium* (коротконожка), рис, сою и пшеницу. После интеграции ДНК в геном растения жизнеспособные растения могут быть регенерированы из обработанных тканей (метод зависит от вида растения). Более того, Tornu et al продемонстрировали доставку ДНК в клетки растения с помощью наночастиц кремнезема в отсутствие специализированного оборудования. Martin et al. (2012) сообщили о совместной доставке белка и ДНК в растительные клетки с помощью биолистического метода с использованием наночастиц мезопористого диоксида кремния. Недавно для "редактирования без ДНК" (ДНК-фри) *in vitro* транскрипты или предварительно сформированные комплексы кгРНК:Cas9 были биобаллистически доставлены в клетки кукурузы и пшеницы, которые впоследствии были успешно регенерированы в цельные растения (Svitashev et al. 2016; Ran et al. 2017). Таким образом были получены свободные от трансгенов растения с модифицированными генами. Так Svitashev et al. (2016) успешно отредактировали четыре гена интереса в клетках эмбриона кукурузы, с помощью бесплазмидной доставки. Золотые микрочастицы, покрытые комплексом рекомбинантного белка Cas9 и кгРНК, транскрибированной *in vitro*, использовали для бомбардировки клеток с помощью гелиевой генной пушки. Процент регенерантов с мутациями, по крайней мере, в одном аллеле целевой геномной области составил от 2,4 до 9,7%, с биаллельными мутациями - от 0,3 до 3%. Нецелевое редактирование в одном из генов было 0%; в другом гене было 2% (мутация, по крайней мере, в одном аллеле) и 0,4% (мутации в двух аллелях), что было значительно ниже по сравнению с плазмидным ДНК-опосредованным редактированием (Svitashev et al. 2016).

2.5 Хитозан как перспективная система доставки макромолекул

В последнее время как перспективный реагент при создании полимерных матриц/платформ для доставки биологически активных макромолекул рассматривается хитозан. Хитозан, в составе которого преобладают остатки глюкозамина, — природный полимер (рис. 6), обладающий широким спектром биологических свойств, в том числе

биосовместимостью. Хитозан является одним из наиболее широко используемых полимеров в области доставки лекарственных препаратов и ДНК в клетки животных. Его привлекательность основана на его полезных структурных и биологических свойствах (Sinha et al. 2004; Rodrigues et al. 2012), которые включают катионный характер, растворимость в водных кислых средах и способности к биологическому разложению (биodeградируемость). Хитозан имеет низкую растворимость при физиологическом pH 7,4, поскольку он является слабым основанием (pKa 6,2–7). Хитозан синтезируется путем удаления ацетатного фрагмента из природного хитина посредством гидролиза амида в щелочных условиях (концентрированный NaOH) или ферментативного гидролиза в присутствии деацетилазы хитина (Suh and Matthew 2000). Аминные группы хитозана легко образуют комплекс с различными противоположно заряженными полимерами (Sonia and Sharma 2011). Коммерческие препараты хитозана позволяют значительно варьировать его характеристики в зависимости от поставленной задачи, поскольку он доступен в широком диапазоне молекулярных масс (50–1400 кДа) и степеней ацетилирования. Аминная группа хитозана также легко поддается химическим модификациям.

Потенциал использования биodeградируемого хитозана для доставки генов подтверждается его способностью протонировать в кислотном растворе и образовывать комплекс с ДНК в результате электростатических взаимодействий (Ducerre and Tabrizian 2010). Кроме того, некоторые сообщения свидетельствуют о том, что комплексы полимер/ДНК более стабильны, чем комплексы с катионными липидами, и могут защитить ДНК от деградации нуклеазами (Borchard 2001). Наночастицы хитозана / ДНК могут быть легко образованы путем коацервации между положительно заряженными аминными группами хитозана и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК. Эффективность трансфекции зависит от молекулярной массы хитозана, степени деацетилирования, pH используемой для трансфекции среды и типа клеток (Mao et al. 2010). pH 6,8–7,0 является критическим для трансфекции (Sailaja et al. 2013). Степень деацетилирования хитозана также играет важную роль в формировании наночастиц хитозан/ДНК, поскольку влияет на эффективность связывания, высвобождения и, следовательно, трансфекции ДНК *in vitro* и *in vivo* (Kiang et al. 2004).

Таким образом, созданные на основе хитозана системы доставки ДНК в клетки животных имеют ряд преимуществ: на поверхность этих платформ можно ковалентно присоединить лиганды, которые обеспечивают высоко специфическое взаимодействие с клеточными рецепторами; можно ввести в клетку не одну, а несколько ДНК-плазмид в одной наночастице или нанокапсуле; можно защитить нуклеиновую кислоту от расщепления

ферментами; ДНК-плазмиды приобретают компактный вид, что предотвращает их механический разрыв и облегчает проникновение через мембраны клеток; такие наночастицы можно лиофильно высушить и длительно хранить в такой форме без потери активности (Köping-Höggård et al 2004).

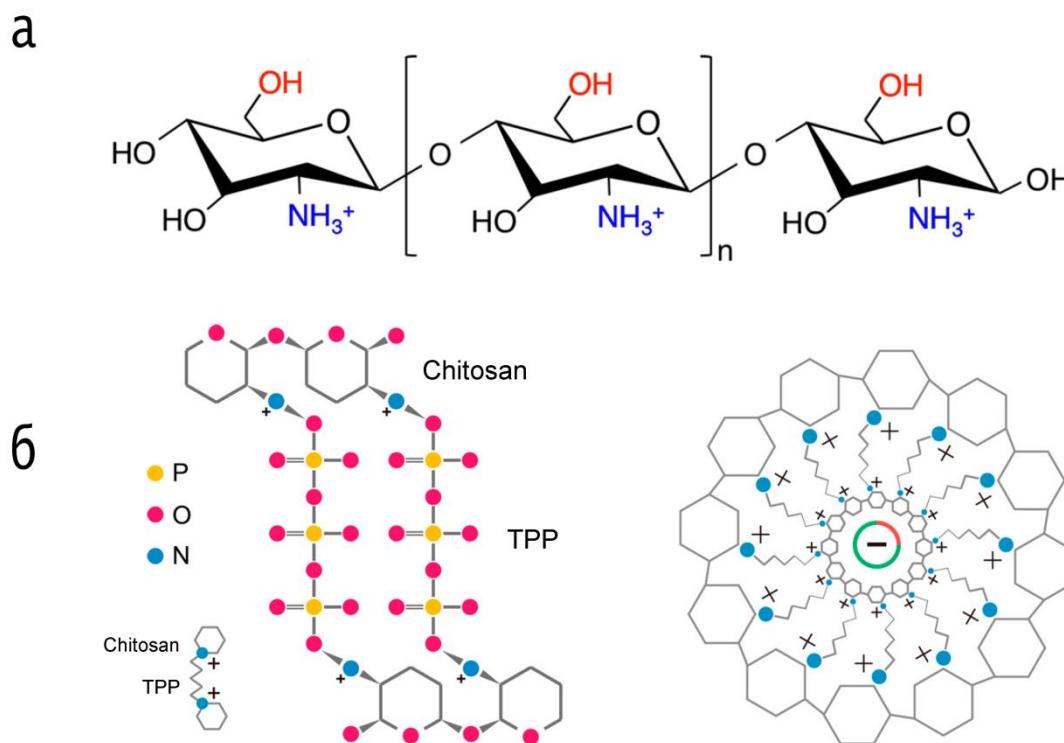


Рисунок 6. **Схема получения наночастиц хитозана, функционализированных нуклеиновой кислотой.** (а) Схематическое изображение структуры хитозана. Функциональные группы C2-NH₂ и C6-OH и представлены синим и красным цветом соответственно. (б) Молекулярная структура сшивок хитозан-триполифосфат (ТПФ) и схема наночастиц хитозана, электростатически взаимодействующих с нуклеиновой кислотой. (по Wu et al. 2020)

Хитозан давно и широко применяют в сельском хозяйстве при разработке средств защиты растений. Хитозан стал одним из наиболее перспективных полимеров для эффективной доставки агрохимикатов и микроэлементов в составе наночастиц. Показано, что капсулирование активных ингредиентов (таких как удобрений, гербицидов, фунгицидов, инсектицидов и микроэлементов) в наночастицах повышает эффективность химических

ингредиентов, снижает их «улетучивание», токсичность и, следовательно, загрязнение окружающей среды (Cota-Arriola et al. 2013). Наночастицы хитозана были всесторонне охарактеризованы в качестве носителя для доставки активного ингредиента для различных применений благодаря их биосовместимости, биоразлагаемости, высокой проницаемости, экономичности, нетоксичности и превосходной пленкообразующей способности (Shukla et al. 2013). Кроме того, показано, что хитозан обладает целым рядом полезных биологических свойств, являясь эффективным стимулятором системной приобретенной устойчивости растений к патогенам (Chirkov 2002; Sharp 2013; Katiyar et al. 2014; Xing et al. 2014; No et al. 2007), усилителем и регулятором роста, развития и урожайности растений (Wang et al. 2015; Gornik et al. 2008; Cabrera et al. 2013), модулятором ответа растений на абиотические стрессы (Mahdavi and Rahimi 2013; Zhang et al. 2011; Ruan and Xue 2002).

Хитозан легко впитывается в поверхность растений (например, листья и стебли), что помогает продлить время контакта между агрохимикатами и целевой поглощающей поверхностью. Известно, что наночастицы хитозана способствуют поглощению активной молекулы или соединения через клеточную мембрану. Усиливающее поглощение действие наночастиц хитозана улучшает молекулярную биодоступность активных ингредиентов, содержащихся в наночастицах (Tiyaaboonchai 2003). Препараты хитозана эффективны и могут использоваться различными способами для снижения уровня заболеваний и повышения продуктивности сельскохозяйственных культур экологически чистым и устойчивым способом.

Эти преимущества указывают на то, что хитозан перспективен как система доставки биологически активных макромолекул, в том числе компонентов редактирующей системы CRISPR/Cas, для получения растений с заданными свойствами. Вместе с тем, к настоящему времени способов применения хитозана для эффективной доставки макромолекул в растительные клетки разработано не было.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1 Материалы

Оборудование

Работы были выполнены на оборудовании: амплификатор T100 (Bio Rad), "Терцик" (ДНК-технологии), Real-time CFX96 Touch (Bio Rad) и термостат "Гном" (ДНК-технология), спектрофотометр NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher), приборы для горизонтального электрофорезов, источник тока (BioRad). Центрифуги 5418 R с охлаждением (Eppendorf) и Minispin (Eppendorf) для пробирок объемом 1,5-2 мл. Вортекс Microspin FV-2400, термостатируемая качалка ES-20, мойка Elmasonic s300h, орбитальный шейкер PSU-10i и магнитная мешалка MS 3000 (BioSan). Также были использованы биобалистическая пушка PDS-1000/He™ System (Bio Rad), гомогенизатор Precellys 24 (Bertin Instruments), pH метр HI 83141 (Hanna Instruments), трансиллюминатор ECX-F15.M (Vilber Lourmat), весы аналитические Pioneer PA (OHAUS), фильтры Millex на 0.22 мкл (Merck Millipore), а также автоматические дозаторы переменного объема на 10, 100 и 1000 мкл (Eppendorf).

Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: микрочастицы золота (Sigma Aldrich), хитозан (Sigma Aldrich), TPP (Sigma Aldrich), агароза (QIAGEN), ацетат натрия (Хеликон), глицерин (Хеликон), хлорид лития (Хеликон), ДМСО (Хеликон), дрожжевой экстракт (Хеликон), SDS (ДСН), ИПТГ (Хеликон), мочевиная (Хеликон), персульфат аммония (Хеликон), ПМСФ (Хеликон), триптон (Хеликон), трисаминометан (Трис), ЭДТА, хлорид магния, Су-3, 6-FITC, GFP, DAPI, хлорид магния, ДТТ (дитиотрейтол), тетрациклин, хлорид калия, соли KCl (Лаверна Стройинжиниринг), дигидрофосфат натрия (PanReas Applichem), гидроксид натрия и калия (Лаверна Стройинжиниринг), этиловый спирт (Мосреактив), β-меркаптоэтанол (Хеликон), хлороформ (Мосреактив), ледяная уксусная кислота (Мосреактив), соляная кислота (Мосреактив), изопропанол (Мосреактив), бычий сывороточный альбумин (Sigma Aldrich), Tween-20 (Serva), полиэтиленгликоль (ПЭГ), трифосфат натрия (PanReas Applichem), ампицилин (PanReas Applichem), бромистый этидий (PanReas Applichem), дигидрофосфат калия (PanReas Applichem), гидрофосфат калия (PanReas Applichem).

Растворы

Растворы для выделения плазмидной ДНК: лизирующий раствор II: 1% ДСН, 0.2М NaOH; лизирующий раствор III: 8,7% ледяная уксусная кислота, 3М ацетат калия (pH 4.5)

TBE (10x): 108 г/л Трис, 55 г/л борной кислоты, 7.44 г/л ЭДТА

Калий-фосфатный буфер: 22.8г/л K_2HPO_4 , 13.6 г/л KH_2PO_4 (pH 7.5)

Loading Dye: 10мМ Трис (pH 7.6), 0.03% бромфенолового синего, 0.03% ксиленцианола, 60% глицерина, 60 мМ ЭДТА

Буфер для растворения хитозана (10x): на 1 л, ацетат натрия 20 г, уксусная кислота 13,78 г.

Реакционный буфер для Cas9 - NEBuffer 3.1: 100 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, 10 мМ $MgCl_2$, 100 мк/мл БСА, (pH 7.9 @ 25°C)

Питательная среда Мурасиге и Скуга: нитрат аммония 1650 мг/л, хлорид кальция 440 мг/л, сульфат магния 370 мг/л, гидрофосфат калия 170 мг/л, нитрат калия 1900 мг/л, борная кислота 6,2 мг/л, хлорид кобальта 0,025 мг/л, сульфат меди(II) 0,025 мг/л, сульфат марганца(II) 22,3 мг/л, йодид калия 0.83 мг/л, молибдат натрия 0,25 мг/л, сульфат цинка 8,6 мг/л, натрий железная соль ЭДТА 5 мл/л, мезоинозит витамин B8 100 мг/л, никотиновая кислота витамин PP 0,5 мг/л, пиридоксин · HCl витамин b6 0,5 мг/л, тиамин · HCl витамин B1 0,1 мг/л, глицин 2 мг/л

Коммерческие наборы

В работе, связанной с редактирование ДНК, использовался фермент Cas9 (EnGen® Spy Cas9, New England Biolab), для работ по транскрипции использовался набор “HiScribe™ T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit” (New England Biolab) и набор “HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit” (New England Biolab). Для работ по выделению ДНК из бактерий и агарозного геля (или ПЦР реакции) использовались наборы “Plasmid Miniprep”, “Clean up mini” и “ExtractRNA” (Evrogen) соответственно. Также использовались для ПЦР наборы ScreenMix (Evrogen) и Encyclo (Evrogen). Для количественной ПЦР в реальном времени использовались наборы “MMLV RV kit” (для синтеза первой цепи) и “qPCRmix-HS SYBR”.

3.2 Методы

3.2.1 Растительный материал

В данной работе были использованы нетрансгенные растения *Solanum tuberosum* cv. «Чикаго». Растения картофеля содержали в условиях теплицы при 16-ти часовом световом дне с минимальной дневной температурой 26°C и минимальной температурой ночью 22°C.

Растения получали путем микроклонального размножения *in vitro*, адаптировали к почвенным условиям и выращивали в климатических камерах при 16-ти часовом световом дне с температурой 22°C. Для создания условий теплового стресса растения картофеля выращивали при температуре 28°C. Сорта и селекционные линии картофеля получены из коллекции ООО «Дока-Генные Технологии» (Рогачево, Россия).

3.2.2 Получение меристем *Solanum tuberosum*

Для геномного редактирования использовали апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов картофеля, размером около 100–200 мкм. Апикальные меристемы выделяли из зеленых ростков пазушных почек растений *in vitro* картофеля *Solanum tuberosum* cv. Chicago (сорт «Чикаго», тетраплоид). Перед вычленением с верхушки ростка удаляли верхние покровные листочки, оставляя апикальную зону с примордиальными листочками. Вычленение меристем проводилось в стерильных условиях под бинокулярным микроскопом (Stemi DV4, Zeiss) с 24-кратным увеличением. После вычленения меристемы переносили в чашки Петри (по 30 меристем на 1 чашку) на поверхность питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) без обавления гормонов.

3.2.3 Бомбардмент меристем *Solanum tuberosum*

К 80 мкл суспензии микрочастиц золота, предварительно обработанных в ультразвуковой бане в течение 5 минут, добавляли 20 мкл РНП-комплекса Cas9:кгРНК и полученную смесь высушивали на специальных мембранах при 37 °C. Биолистический бомбардмент апикальных меристем картофеля проводили с использованием разрывных дисков 6,2 МПа на расстоянии 9 см до объекта с помощью генной пушки PDS-1000/He (Bio-Rad).

3.2.4 Инфильтрация меристем *Solanum tuberosum*

Инфильтрацию в клетки апикальных меристем микрочастиц хитозана, функционализированных РНП-комплексом Cas9–кг:РНК, проводили в стерильных условиях в вакуумной камере генной пушки PDS-1000/He (Bio-Rad) при ~ 90 кПа в течение 1 мин. Каждую из меристем погружали полностью в жидкость, после процедуры она удалялась.

3.2.5 Регенерация растений *Solanum tuberosum*

Обработанные РНП-комплексом Cas9:кгРНК меристемы переносили в чашки Петри с питательной средой МС (Мурасиге и Скуга) с добавлением следующих фитогормонов, мг/л: 6-бензиламинопурин – 2, гиббереллиновая кислота – 0,5 и цефотаксима – 500. Чашки Петри с выделенными меристемами инкубировали в световом модуле в контролируемых условиях с освещенностью 5 тыс. лк, фотопериодом 16/8 ч и температурой 21–22 °С в течение 3–4 недель. Регенерированные растения достигали стадии 3–4 междоузлий за 4–5 недель, причем до 80% меристем развивались в нормальные растения.

3.2.6 Заражение растений *Y* вирусом картофеля

Листья растений табака, зараженного YBK⁰, растирали в жидком азоте до состояния пудры, используя ступку и пестик. Затем добавляли калий-фосфатный буфер в соотношении 1:3. Полученную смесь центрифугировали в течение 5 минут при 4°C на 8000 об/мин. Супернатант использовали для заражения растений. Для этого 2-3 листа растения опудривали целлитом, добавляли 100 мкл свежеприготовленного вирусного инокулюма или фосфатного буфера (в случае контрольных растений), и аккуратно распределяли раствор по всей площади листовой пластинки. Инокулированные листья дважды промывали дистиллированной водой.

3.2.7 Изучение солевого стресса

Для изучения фенотипического проявления эффекта солевого стресса взрослые растения картофеля контрольной и редактированных линий F25 и D15, выращенные до стадии 5–6 листьев в горшках с объемом почвы около 0,4 л, поливали ежедневно 50 мл раствора 300 мМ NaCl в течение 18 дней. Ответ на солевой стресс оценивали визуально по числу листьев с хлорозами и пониженным тургором, а также по размеру листовой пластинки

3.2.8 Изучение гиперосмотического стресса

Влияние гиперосмотического стресса изучали у пробирочных растений контрольной линии и редактированных линий F25 и D15. С этой целью растения каждой группы выращивали на среде МС, не содержащей сорбитола или содержащей 0,2 М сорбитола, в течение 14 дней в одинаковых условиях температуры и освещенности. Оценивали следующие параметры: сырой вес целого растения, надземного побега и корня, а также длину и общее число корней.

3.2.9 Получение частиц хитозана и их функционализация.

Хитозан (Sigma, CAS Number 9012-76-4) в концентрации 1,75 мг/мл растворяли в 30 мМ Na-ацетатном буфере pH 4,5 (буфер готовили, подводя pH раствора 30 мМ CH₃COONa до 4,5 10% раствором CH₃COOH) при постоянном встряхивании до полного растворения хитозана. Затем к раствору добавляли водный раствор триполифосфата натрия (ТПФ, Галреакхим) в концентрации 1 мг/мл в соотношении хитозан:ТПФ, равном 5:2. Данные условия приводили в формированию гомогенного препарата частиц хитозана с диаметром 600-800 нм. Для некоторых методик исходный раствор частиц хитозана с pH 4,5 нейтролизовали добавлением 10% раствора NaOH до pH 6,5. К полученному раствору частиц хитозана добавляли растворы белка, РНК или ДНК, перемешивали и озвучивали (обрабатывали ультразвуком с частотой 50/60 Hz) при температуре 25°C в течение 10 минут с использованием ультразвуковой мойки Elmasonic s300h (Германия).

3.2.10 Оценка эффективности загрузки методом флуоресцентной микроскопии

Эффективность загрузки наноплатформ оценивалась методом флуоресцентной микроскопии, основываясь на количестве флуоресцирующих частиц по отношению к общему количеству частиц, видимых в световом поле. Сигналы флуоресцентных красителей (FITC и Cy-3), которыми с использованием стандартных методик были мечены соответственно белки и РНК, регистрировали с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M (Carl Zeiss, Германия), управляемого программным комплексом Axiovision 4.5 (Carl Zeiss MicroImaging, Германия) и оборудованного объективами Plan-Neofluar с увеличениями 10x и 20x. Сигналы детектировали в зеленом и красном каналах. Параллельно регистрировали фазово-контрастное изображение каждого поля зрения. Для регистрации изображения использовали цифровую камеру ORCA II ERG-2 (Hamamatsu Photonics, Япония). Дополнительно флуоресцентно-меченные белки и РНК в клетках растений детектировались при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа, модель Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). В клетках проводилась детекция зеленого флуоресцирующего белка (GFP). Для возбуждения свечения использовался аргоновый лазер с длиной волн 488 нм.

3.2.11 Инфильтрация функционализированных частиц хитозана в клетки растений.

Инфильтрацию проводили частицами хитозана, функционализированными белком/РНК/ДНК/РНП или частицами хитозана (0,5% раствор) с добавлением раствора

золотых частиц (BioRad, Microcarrier Gold размером 0,6 мкм), функционализированными белком/РНК/ДНК/РНП. Полученные суспензии/растворы частиц предварительно озвучивали при температуре 25°C в течение 10 мин. с частотой 50/60 Гц с использованием ультразвуковой мойки Elmasonic s300h (Германия). Для инфильтрации тканей растений использовали методы механической и вакуумной инфильтрации. Механическую инфильтрацию проводили макроинъекцией с использованием инъекционного стерильного шприца. Препарат частиц хитозана, функционализированных белком/РНК/ДНК или комплексом белок-РНК, белок-ДНК, инфильтрировали в нижнюю поверхность листа через небольшое повреждение наружного эпидермиса. Площадь инфильтрации составляла не менее 1 см в диаметре. Вакуумную инфильтрацию проводили с использованием PDS-1000/He пушки (BioRad). Для растительных образцов использовано давление 28-30 дюймов рт.ст., в соответствии с инструкцией производителя. Образцы (высечки листовой пластинки размером 5x5 мм, апикальные меристемы (около 10 меристем) или пазушные почки) помещали в камеру PDS-1000/He пушки, на образец наносили до 100 мкл приготовленного препарата, поднимали давление в камере до рекомендованного уровня, выдерживали в течение 60 сек, а затем снижали давление до нормального уровня. Инфильтрированные функционализированными частицами хитозана клетки/ткани растения выдерживали в климатической камере или при комнатной температуре. Оценку результатов проводили на 2-3 день после инфильтрации методами флуоресцентной микроскопии и лазерной конфокальной микроскопии.

3.2.12 Трансформация *E.coli*.

Для трансформации плазмидами или лигазной смесью, компетентный штамм *E.coli* брали из низкотемпературной морозильной камеры (-70°C) и клали на лёд на 10 минут для лёгкого размораживания. Далее в пробирку, содержащую *E.coli* добавляли 1-5 мкл плазмидной ДНК (в количестве 1 пкг - 100 нг), пробирку осторожно взбалтывали несколько раз (без вортекса!) и перемещали обратно на лёд на 30 минут. После проводили тепловой шок при температуре 42°C в твердотельном термостате в течение 30 секунд с последующим охлаждением на льду в течение 5 минут (не перемешивать). Далее в культуру добавляли 950 мл питательной среды SOC комнатной температуры и перемещали пробирку на орбитальный шейкер 37°C на 60 минут (250 об/мин). Далее подготовленные ранее чашки Петри с селективной средой подогревали до 37°C, содержимое пробирок хорошо перемешивали и серийно разбавляли питательной средой SOC разбавляли и распластывали по 50-100 мкл на чашку Петри и инкубировали в течение ночи при 37°C.

3.2.13 Выделение плазмидной ДНК из *E.coli*

Ночная культура *E.coli* осаждали при 5 тыс оборотах в центрифуге в течение 1 минуты и из неё выделяли плазмидную ДНК при помощи набора Plasmid Miniprep (Евроген) согласно протоколу производителя.

3.2.14 ПЦР

Дизайн большинства праймеров для работы проводили таким образом, чтобы рассчитанная температуры отжига составляла 60°C. Для различных целей использовались такие наборы как ScreenMix-HS (Евроген) и Encyclo полимеразы (Евроген). Реагенты, праймеры и ДНК смешивали согласно протоколу производителя. Денатурацию проводили при 95°C в течение 15-30 секунд, отжиг праймеров в течение 30 секунд, элонгация - при 72°C в течение времени, которое зависит от длины целевого фрагмента.

3.2.15 Полуколичественная ОТ-ПЦР

Из образцов растений-регенерантов выделяли тотальную РНК при помощи ExtractRNA (Евроген), производили ферментативное удаление ДНК с помощью ДНКазы I, (Thermo Fisher Scientific). После измерения концентрации на микроспектрофотометре NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) и выравнивания концентрации РНК, проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора MMLVRT (Евроген). В качестве гена сравнения использовался ген L23, кодирующий один из белков 60S субъединицы рибосомы. Фрагмент размером 80 пн амплифицировали с соответствующими праймерами – StL23_300_F и StL23_300_R. В качестве ампликона целевого гена использовался фрагмент первого экзона гена PDS размером 186 пн, который амплифицировали с соответствующими праймерами – прямым (PDS_Se_F) и обратным (PDS_Se_R). Уровень экспрессии целевого гена оценивали после выравнивания образцов по уровню экспрессии гена L23 методом электрофореза в агарозном геле.

3.2.16 Количественная ПЦР в реальном времени.

Образцы РНК экстрагировали с помощью набора ExtractRNA (Евроген) в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР в реальном времени проводили на амплификаторе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad,) с набором qPCRmix-HS SYBR (Евроген) и праймерными парами, специфичными для указанных генов (Евроген).

Реакцию смешивали и ставили условия согласно протоколу производителя. В качестве генов сравнения использовали ген белка L23 60S субъединицы рибосомы. Данные анализировали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen 2001).

3.2.17 Дизайн гидовых РНК и синтез матрицы для транскрипции

В базе данных GeneBank находилась последовательность ДНК и при помощи биоинформатического веб-сервиса <https://zlab.bio/guide-design-resources> отбирались целевые последовательности для гидовых РНК. Эта последовательность вставлялась в заготовку T7_gRNA_F (*in silica*) и полученная конструкция синтезировалась (Evrogen). После получения синтезированной ДНК, два олигонуклеотида (T7_gRNA_F и scaffold) отжигались друг на друга в амплификаторе T100 (Bio Rad), достраивались до дцДНК при помощи Taq-полимеразы (ScreenMix, Evrogen). После очистки, ДНК (ScreenMix, Evrogen) использовалась как матрица для транскрипции гидовой РНК.

3.2.18 Транскрипция РНК

Для транскрипции набором HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit e2040 (New England Biolab) компоненты набора размораживали, центрифугировались на малых оборотах и клались на лёд. Далее реактивы смешивали согласно протоколу производителя. Раствор хорошо перемешивали, после чего откручивали на микроцентрифуге. Далее, в зависимости от длины продукта и количества желаемой РНК состав инкубировался при 37°C в течение от 2 до 16 часов. Далее проводили обработку ДНКазой I (Thermo Fisher) для удаления ДНК-матрицы, согласно протоколу производителя.

3.2.19 Осаждение РНК из транскрипционного раствора

Для переосаждения РНК использовали следующий состав - 1 объём смеси РНК, 1/10 объёма 1М ацетата натрия, 3 объёма 96% этанола, 1/20 объёма 3М хлорида магния. После добавления необходимых реагентов раствор хорошо перемешивали и держали 20 минут в жидком азоте или час при -80°C в морозильной камере.

Далее, в охлаждённой до +4°C центрифуге при максимальной скорости смесь центрифугировали в течение 60 минут. После удаления супернатанта, добавляли 500 мкл 75% охлаждённого этилового спирта и центрифугировали ещё раз в течение 15 минут, после супернатант удаляли, осадок РНК сушили при комнатной температуре и растворяли в свободном от нуклеаз Tris буфере.

3.2.20 *In vitro* тестирование эффективности разрезания Cas9

Для тестирования эффективности разрезания, в стерильную пробирку добавляли 3 мкл ранее синтеризованной *in vitro* и охарактеризованной кгРНК (300 нМ), 1 мкл Cas9 (1мкМб EnGen® Cas9 NLS, S. Pyogenes, NewEnglandBioLabs), 3 мкл реакционного буфера и доводили объём водой, свободной от нуклеаз, до 27 мкл. Смесь хорошо перемешивали, капли сбрасывали на микроцентрифуге и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. После этого в пробирку добавляли 3 мкл целевой ДНК (30 нМ). Содержимое пробирки перемешивали и переносили на 37°C на 15-60 минут. Далее в смесь добавляли протеиназу К, хорошо перемешивали и инкубировали при комнатной температуре 10 минут, после чего проводили фрагментный анализ образца в агарозном геле

3.2.21 Генотипирование

Генотипирование проводили в программном обеспечении UGENE. Выравнивание и сравнение нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи алгоритмов MUSCLE и ClustalO

3.2.22 Метод глубокого секвенирования NGS

Фрагмент ДНК размером от 1100 до 1500 пн, включающий предполагаемый участок связывания кгРНК, амплифицировали двумя раундами ПЦР. В первом раунде были использованы праймеры, фланкирующие этот фрагмент. Для второго раунда амплификации в пробы вносили прямой и обратный баркоды к концам ПЦР-продукта для создания библиотеки. Равные количества ПЦР-продуктов смешивали, и полученные образцы подготавливали специальными коммерческими наборами и использовали для секвенирования на MiSeq-секвенаторе (Illumina Inc) . Анализ проводился в Институте Джеймса Хаттона (Великобритания)

Таблица 1. Праймеры и олигонуклеотиды, использованные в работе

NGS_Cas9_iH20_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATGAGGATTGATGTTCCC TTCTGCTGTAGGTTGGGAA
NGS_Cas9_iChit_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGCATGATTGATGTTCCC TTCTGCTGTAGGTTGGGAA
NGS_Cas9_bH20_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGACGATTGATGTTCCC TTCTGCTGTAGGTTGGGAA
NGS_Cas9_bAu_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTATCGGATTGATGTTCCC TTCTGCTGTAGGTTGGGAA
NGS_Cas9_P1_R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGCGTGGTTTTGTATTGAGAAGAGTC ATA
NGSst4_coi_2_R	GCAACTTAAGTTCACTCGAAATATGCATAAATATAGATCAC
NGSst4_coi_1_R	CCACGCATAGGAGTGAGTCAATTTTAC

NGSst4_coi_2_F	GAGGATGAGTCTTCAAAGCAACCAGATAG
NGSst4_coi_1_F	TGAGTCTTCAAAGCAACCAGATAGCTCTA
coilin_600_R	CAGGAACTGGGGTTTCAGTTTTCTTT
coilin_600_F	GAAGGTCTTGTGATTGCATACCGG
PDS_600-2v_FAM_R	CCTTCGAAATAAAGCAAAATGAATGCTACAAATATCAC
coilin_600_FAM_R	CAGGAACTGGGGTTTCAGTTTTCTTT
PDS_600_F	AGGACGGTAAAGCTAGAATCTTTTTTACTTTTTGTAT
coiN_6FAM_R	GTGAAACGGAGTTGTTGGCAAAT
T7_gRNA_F	TAATACGACTCACTATAGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAG AGCTAGAAATAGCAAG
scaffold	CAAGCTTTTTAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA CGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC
T7_St.coi.gRNA3_F	TAATACGACTCACTATAGGTTATAATGAAGACGGATCTCGTTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG
T7_St.PDS.gRNA_F	TAATACGACTCACTATAGGGTTCGAGATGGTTGCTTGCAAGTTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG
RTcut_F	GAGGATGAGTCTTCAAAGCAACCAGA
RTcut_R	AGACGAACTTCAAGAAGTGCTGAAAATT
sqPCR_coi_S	GTTGGGAAAATATCGTCGTATAATTCTGAAGCA
qPCR_coi_A	CTCATCCTCGGTAGAAATGACTGGAAAT
RT2_StL23_F	ATGAGATTTGGTCGTGGCCG
RT2_StL23_R	GCAGCACCAACATCACGA
StL23_300_F	AGATAAAAAGGGTTTTGGAGTCCCTCTAC
StL23_300_R	TCTCTGACCGATTCTTCCATCTTTCT
PVY_qPCR_9060_R	ATATACGCTTCTGCAACATCTGAGA
PVY_qPCR_9060_R	ATATACGCTTCTGCAACATCTGAGA
St_coi_sgRNA3-6-GBamHI-P	GATCCTCTATTTATAATGAAGACGGATCTCTGGGGGGGGAATT
St_coi_sgRNA3-6-GXbaI-M	CTAGAATTCCCCCCCCAGAGATCCGTCTTCATTATAAATAGAG
PDS_Se_F	TGAGAGTCCAAGGTAGTTCAGCT
PDS_Se_R	AAGGCCCCAAGTCCT-TAACC

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Конструирование гидовых РНК для редактирования генома картофеля с использованием системы CRISPR/Cas9

Технология CRISPR/Cas9 обеспечивает эффективную и точную модификацию генома, вызывая целевые разрывы ДНК, которые активируют клеточные механизмы репарации клеточной ДНК по механизмам нехомологичного соединения концов (NHEJ) или гомологичной репарации (HDR). Ключевую роль в успешном создании приложений на основе этой технологии является рациональный дизайн коротких гидовых РНК (кгРНК). Обычно дизайн потенциально возможных кгРНК осуществляется с помощью биоинформатических сервисов (<https://crispr.mit.edu/>). Однако на практике далеко не все из предсказанных кгРНК обладают высокой активностью. Таким образом, подбор кгРНК к уникальной последовательности в геноме играет важное значение и зависит от пока не до конца понятных факторов. Кроме того, при подборе кгРНК следует исключить возможность нецелевого редактирования генома (off-target эффект), которая может являться следствием взаимодействия кгРНК с другими нуклеотидными последовательностями в геноме данного вида, имеющими некоторую гомологию с целевой последовательностью.

Нами был проведен анализ особенностей функциональной активности кгРНК в контексте внесения разрывов эндонуклеазой Cas9 в различные участки ДНК двух генов картофеля: гена фитоеен десатуразы (phytoene desaturase, ген *PDS*) и гена основного структурного белка субъядерных телец Кахалья - коилина. Фитоеен десатураза – это фермент, вовлеченный в процессы биосинтеза каротиноидов, дефицит которого приводит к депигментации растений, и, таким образом, может служить удобной модельной системой для визуализации и оценки эффективности методов геномного редактирования растений, в том числе и картофеля (Tian et al, 2017). Дефицит коилина в растениях может повышать устойчивость растений к некоторым вирусным инфекциям и абиотическому (солевому) стрессу (Love et al. 2016; Shaw et al, 2014), что делает ген коилина привлекательной мишенью для геномного редактирования.

Поскольку ключевыми параметрами для дизайна кгРНК являются положение РАМ-сайта, комплементарность спейсерной последовательности кгРНК протоспейсеру и возможность спаривания с нецелевыми участками ДНК в геноме, мы провели сравнительный анализ активности молекул кгРНК, сконструированных для внесения разрывов в различные участки генов фитоеен десатуразы и коилина картофеля. Кроме того, мы исследовали влияние неспаренных оснований в составе кгРНК и изучили роль

3'-прилежащих к РАМ-сайту нуклеотидных последовательностей, вовлеченных во взаимодействия между белком Cas9 и ДНК, на активность кгРНК *in vitro*.

Для сравнения эффективности внесения разрывов в различные участки ДНК генов коилина и фитоен десатуразы с помощью Cas9, к каждому из этих генов с помощью биоинформатического вэб-сервиса (<http://crispr.mit.edu/>) было отобрано по 6 последовательностей, комплементарных потенциальному сайту редактирования, которые затем были синтезированы в виде олигонуклеотидов, клонированы в экспрессионные генно-инженерные конструкции, содержащие остальные необходимые элементы кгРНК и накоплены с помощью *in vitro* транскрипции (см. Материалы и Методы). Положение кгРНК относительно генов белков показано на схеме, приведенной на рис. 1.

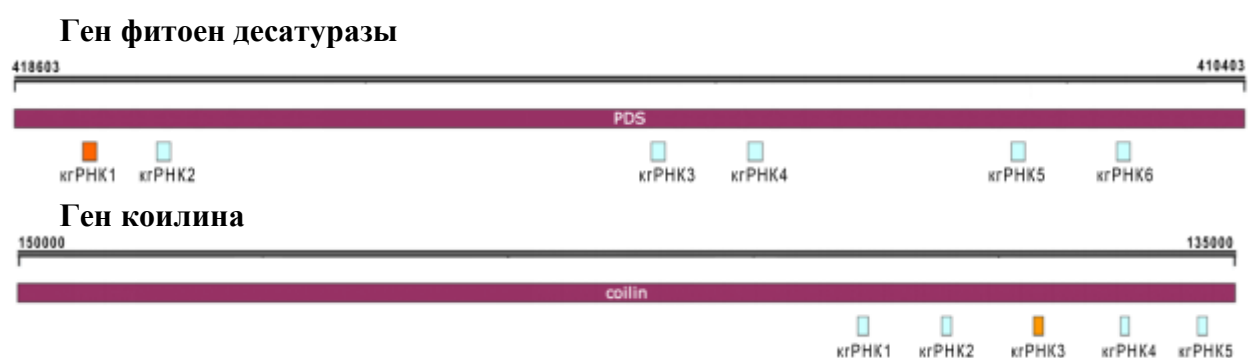


Рисунок 1. Схема расположения кгРНК на кодирующей последовательности генов фитоен десатуразы и коилина. Оранжевым отмечены кгРНК, которые в дальнейшем были использованы в работе. Позиции нуклеотидов на матричной цепи ДНК соответствуют приведенным в базе данных (PDS - идентификационный номер

Активность синтезированных кгРНК определялась *in vitro* согласно стандартной методике (Larson et al, 2013) с использованием генно-инженерных конструкций, содержащих вставки фрагментов генов фитоен десатуразы и коилина картофеля, к которым были подобраны кгРНК. Эти конструкции были линейаризованы с помощью рестриктаз и обрабатывались комплексом рекомбинантного белка Cas9 и синтезированных кгРНК, а результат реакции фиксировался методом электрофореза в агарозном геле. Оказалось, что 5 из 6 кгРНК для гена фитоен-десатуразы были активны и могли *in vitro* эффективно направлять Cas9 для расщепления целевого участка ДНК, в то время как в случае коилина проявляла активность только одна из пяти кгРНК. На рис. 2 представлен результат фрагментного анализа для шести кгРНК фитоен десатуразы и единственной активной кгРНК для гена коилина - кгРНК3. Размеры получившихся после разрезания фрагментов соответствовали ожидаемым, что указывало на специфичность разрезания целевой ДНК. Специфический характер разрезания также был подтвержден с помощью сэнгеровского секвенирования образовавшихся фрагментов (данные не

показаны). Интересно, что наши попытки синтезировать активную кгРНК к области гена, кодирующего N-концевой домен коилина, не были успешными. Следует отметить, что биоинформатический анализ не выявил каких-либо закономерностей, объясняющих присутствие или отсутствие активности кгРНК в зависимости от последовательности целевого участка генома картофеля, тем самым предполагая существование и других факторов, контролирующих активность кгРНК. Одним из таких факторов может являться структура хроматина.

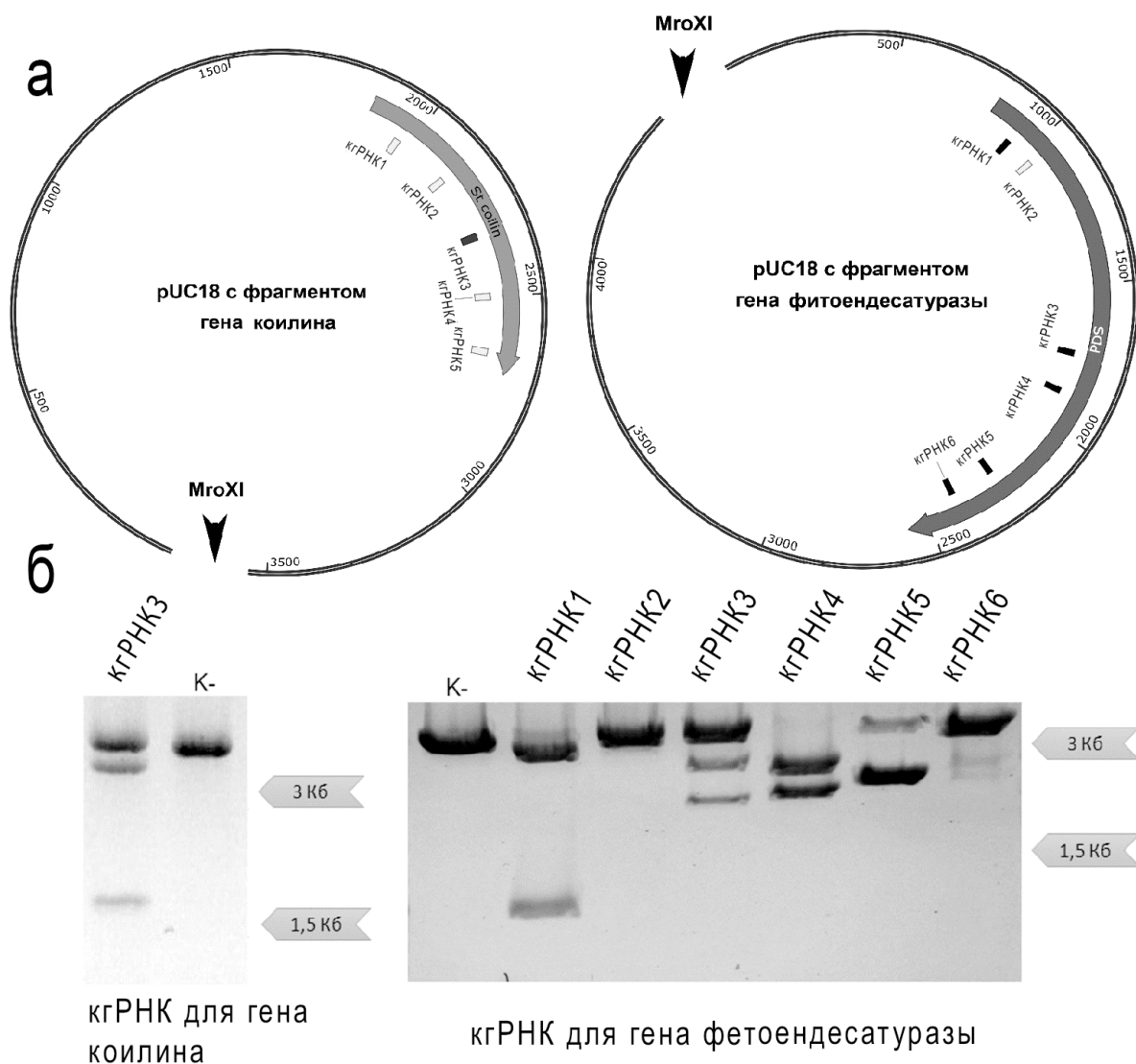


Рисунок 2. *In vitro* активность комплекса Cas9-кгРНК в отношении целевого ДНК субстрата – генов коилина и гена фитоен десатуразы *S.tuberosum*. а - Схема расположения кгРНК на целевых фрагментах генов коилина и фитоен десатуразы в составе генно-инженерных конструкций. Черными прямоугольниками отмечены активные кгРНК. Стрелками отмечены сайты линейаризации. б - Визуализация реакции разрезания с помощью фрагментного анализа в агарозном геле. В качестве отрицательного контроля использовались исходные генно-инженерные конструкции, содержащие фрагменты гена коилина и фитоен десатуразы. В случае фрагмента гена коилина приведены данные только для активной кгРНК.

Для дальнейшей работы нами была отобрана активная кгРНК3 для гена коилина. Поскольку она не обеспечивала полного разрезания матрицы, имелась возможность повышения эффективности ее действия в отношении разрезанию ДНК посредством оптимизации ее последовательности. В последовательность взаимодействующего с протоспейсером участка кгРНК вносились вырожденные нуклеотидные замены: на стадии синтеза олигонуклеотида по 2 нуклеотида, начиная с первого, последовательно заменялись на случайные. Синтез кгРНК для оценки влияния вырожденных нуклеотидных замен на ее активность осуществлялся так же, как было описано выше. Активность синтезированных кгРНК *in vitro* в отношении разрезания фрагмента гена коилина оценивалась количественно методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с использованием пары праймеров, прилежащих к участку разрезания. В случае, когда матрица была разрезана с помощью комплекса Cas9-кгРНК, реакция ПЦР блокировалась и эффективность амплификации соответствующего фрагмента снижалась. В результате эксперимента была проанализирована активность десяти различных кгРНК, содержащих вырожденные нуклеотидные замены (рис. 3). Ряд вырожденных замен (нуклеотиды: 3-4 (д2), 5-6 (д3), 15-16 (д8), 17-18 (д9) и 19-20 (д10) приводили к падению активности. Более того замена 7 и 8 нуклеотидов (д4) приводила к полному подавлению активности соответствующей кгРНК. С другой стороны, вырожденная замена нуклеотидов 1-2 (д1), 9-10 (д5), 11-12 (д6) не оказывала влияния на активность кгРНК, а замена нуклеотидов 13-14 (д7) повышала эффективность разрезания. Данные результаты указывают, что полная комплементарность между кгРНК и целевым участком ДНК не является фактором, необходимым для внесения разрывов в ДНК нуклеазой. Более того, отсутствие полного спаривания между кгРНК и ДНК может приводить к повышению эффективности разрезания.

Анализ структуры комплекса Cas9-кгРНК с целевым участком ДНК, методом рентгеноструктурного анализа (Hirano et al. 2016), показал, что во взаимодействие с белком Cas9 вовлечены как минимум 6 нуклеотидов, следующие за РАМ-сайтом. Таким образом, было естественно предположить, что эта последовательность может являться одним из факторов, влияющих на активность комплекса Cas9-кгРНК. Для экспериментальной проверки этого предположения были получены 4 мутантных варианта потенциального участка редактирования гена коилина, в которых шесть 3'-прилежащих к РАМ-сайту нуклеотидов были заменены на 6 цитозинов (мутант 6С), 6 гуанинов (мутант 6Г), 6 аденинов (мутант 6А) и 6 тиминов (мутант 6Т), соответственно. Интересно, что анализ эффективности разрезания целевых ДНК, проведенный с

помощью ПЦР-РВ, не выявил статистически достоверных различий между эффективностью разрезания ДНК мишеней как дикого типа, так и всех остальных мутантных вариантов (рис. 3б). Эти данные предполагают, что хотя 6 нуклеотидов 3' проксимальных к РАМ-сайту участвуют в непосредственном взаимодействии с Cas9, их состав и последовательность заметной роли в определении специфичности этого взаимодействия не играют.

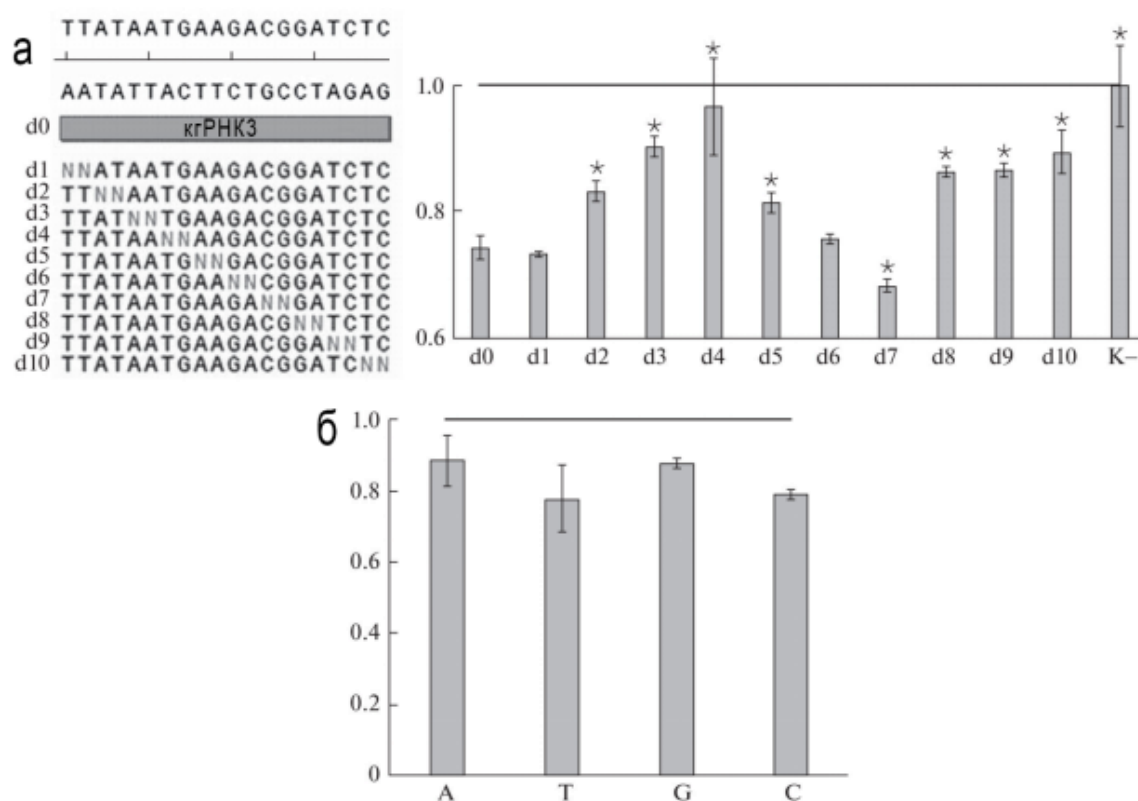


Рисунок 3. Влияние на активность Cas9-krRNA *in vitro* вырожденных нуклеотидных замен в составе krRNA и 3'-прилежащего к РАМ-сайту целевого участка ДНК. а - Влияние на активность krRNA вырожденных нуклеотидных замен. Слева показана схема организации гидовых РНК, содержащих вырожденные нуклеотидные замены, справа - разрезание целевого ДНК-субстрата с помощью Cas9 и krRNA, содержащих вырожденные нуклеотидные замены; количественная оценка проводилась с помощью ПЦР-РВ. б - Влияние на эффективность работы комплекса Cas9-krRNA последовательности 3'-прилежащего к РАМ-сайту целевого участка ДНК. На рисунке показана активность комплекса Cas9-krRNA в отношении ДНК субстратов, содержащих после РАМ-сайта 6А, 6Т, 6G или 6С; количественная оценка проводилась с помощью ПЦР-РВ. Данные ПЦР-РВ были нормализованы по концентрации исходной матрицы (исходного ДНК-субстрата; черная линия) и представлены в виде отношения количества “нерасщепленной” после реакции ДНК к общему количеству ДНК, внесенной в реакционную смесь.

В заключение следует отметить, что данные, полученные при тестировании активности krRNA *in vitro*, не позволили выявить особенности их структуры,

определяющие способность или неспособность ассоциированной с кгРНК эндонуклеазы Cas9 вносить разрывы в геномную ДНК картофеля. Эти данные предполагают необходимость обязательного предварительного *in vitro* тестирования кгРНК, предсказанных биоинформатически.

В результате данной работы были отобраны и оптимизированы активные кгРНК для последующего редактирования генов коилина и фитоен десатуразы картофеля.

Также, используя вырожденные нуклеотидные замены, при которых в определенной позиции равновероятно может находиться любой из четырех нуклеотидов, нами было показано, что неспаренные нуклеотиды в спейсерном участке кгРНК могут не только снижать, но и повышать эффективность действия комплекса Cas9-кгРНК. Данное обстоятельство расширяет возможности неспецифической доставки Cas9 к частично комплементарным участкам генома, повышая риск его нецелевой модификации, и, следовательно, должно учитываться при предварительном биоинформатическом поиске целевых сайтов для геномного редактирования.

Рациональный подбор кгРНК к уникальной последовательности в геноме обеспечивает высокую специфичность редактирования. В настоящий момент, существует ряд принципов рационального дизайна кгРНК (Doench et al. 2014). Известно, что наиболее значимым для проявления специфической активности кгРНК является так называемый “seed” регион гидовой РНК (10-12 нуклеотидов проксимальных к РАМ-сайту) (Doench et al. 2014), причем кгРНК, имеющие низкое содержание G/C обычно существенно менее активны (Doench et al. 2014; Doench et al. 2016). Однако данные наблюдения справедливы только для больших выборок и не могут предсказать будет ли активной конкретная кгРНК. Так, например, в случае подобранных нами кгРНК не наблюдалось каких-либо закономерностей (в том числе и вышеописанных) в последовательностях активных и неактивных кгРНК.

4.2 Разработка платформы на основе микрочастиц хитозана для бесплазмидной доставки макромолекул в клетки растений.

Хотя системы CRISPR / Cas обладают большим потенциалом в контроле вирусных инфекций и улучшении характеристик сельскохозяйственных культур, их внедрение имеет серьезное «узкое место», а именно низкую эффективность, с которой реагенты CRISPR / Cas могут быть доставлены в клетки растений (Baltes et al. 2014). Чтобы преодолеть эти ограничения, важно иметь в виду, как и в какой форме реагенты CRISPR / Cas могут быть доставлены в ткани растений для разработки соответствующих протоколов с целью обеспечения оптимального и экологически безопасного

использования данной технологии.

Как было описано в обзоре литературы, в последние годы активно разрабатываются бесплазмидные методы для доставки белка Cas9 и кгРНК в клетки растений, исключая интеграцию чужеродной ДНК в геном растения. Эти подходы включают прямую доставку в растительные клетки предварительно собранных ферментативных рибонуклеопротеидных (РНП) комплексов Cas9-кгРНК. К числу этих методов относятся трансфекция протопластов, биобаллистика незрелых клеток эмбрионов растений, клеток каллуса и клеток эпидермиса функционализированными микрочастицами золота или вольфрама или наночастицами мезопористого кремнезема (Andersson et al. 2018; Svitashv et al. 2016; Martin-Ortigosa et al. 2014; Woo et al. 2015; Liang et al. 2016). Преимущество этих технологий без использования ДНК (DNA-free) заключается в отсутствии молекулы ДНК, которая может интегрироваться в непредсказуемую область генома и отсутствие конститутивной экспрессии гена *Cas9*, что может приводить с определенной вероятностью к нецелевым эффектам. К другим преимуществам относятся быстрое редактирование генома и быстрая деградация комплекса в клетках, что также снижает вероятность нежелательных побочных эффектов (Kanchiswamy 2016; Kanchiswamy et al. 2015). Бесплазмидные методы доставки редактирующего комплекса являются перспективными и предпочтительными, поскольку они позволяют получать отредактированные растения с желаемыми свойствами, избегая ограничений, касающихся ГМО.

В качестве методов доставки в настоящей работе были применены два варианта: доставка редактирующего комплекса, иммобилизованного на микрочастицах золота, методом бомбардмента (биобаллистики) (известный и апробированный в литературе метод) и доставка редактирующего комплекса, иммобилизованного на микрочастицах хитозана, методом вакуумной инфльтрации (оригинальный метод, разработанный нами при выполнении этой работы и защищенный патентом).

В качестве реагента для создания частиц-носителей (платформ) биологических макромолекул и доставки их в растительную клетку нами был использован хитозан, который, благодаря своей поликатионной природе, способен образовывать полиэлектролитные комплексы с отрицательно заряженными полимерами, такими как нуклеиновые кислоты, белки и нуклеопротеиды (Il'ina and Varlamov 2005; Danielsen et al 2004). Условия получения микрочастиц хитозана детально описаны в Материалах и Методах. Хитозан растворяли в Na-ацетатном буфере при pH 4,5 и к раствору добавляли водный раствор сшивающего реагента - триполифосфата натрия в весовом соотношении хитозан:ТПФ, равном 5:2. Данные условия приводили в формированию гомогенного

препарата частиц хитозана с диаметром 600-800 нм (фазово-контрастное изображение, полученное с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M, рис. 4а). К полученному раствору частиц хитозана добавляли растворы белка или РНК перемешивали и озвучивали (обрабатывали ультразвуком с частотой 50/60 Hz) при температуре 25°C в течение 10 минут с использованием ультразвуковой мойки Elmasonic s300h.

Эффективность загрузки наноплатформ оценивалась методом флуоресцентной микроскопии, основываясь на количестве флуоресцирующих частиц по отношению к общему количеству частиц, видимых в световом поле. Сигналы флуоресцентных красителей (FITC и Cy-3), которыми с использованием стандартных методик были мечены соответственно белки (бычий сывороточный альбумин, БСА) и РНК (тРНК), регистрировали с помощью моторизованного инвертированного флуоресцентного микроскопа Axiovert 200M. Сигналы детектировали в зеленом и красном каналах. Параллельно регистрировали фазово-контрастное изображение каждого поля зрения. Дополнительно флуоресцентно-меченные белки и РНК в клетках растений детектировались при помощи конфокального лазерного сканирующего микроскопа, модель Leica TCS SP5.

Оценка показала, что микрочастицы хитозана в условиях эксперимента эффективно связывают флуоресцентно меченные белок/РНК за счет электростатической адсорбции. Меченные флуоресцентными красителями белки и РНК, связанные с микрочастицами хитозана, показаны на рис. 4б,в. Полученные платформы сохраняли стабильность и функциональность в растворе в течение 24-48 час.

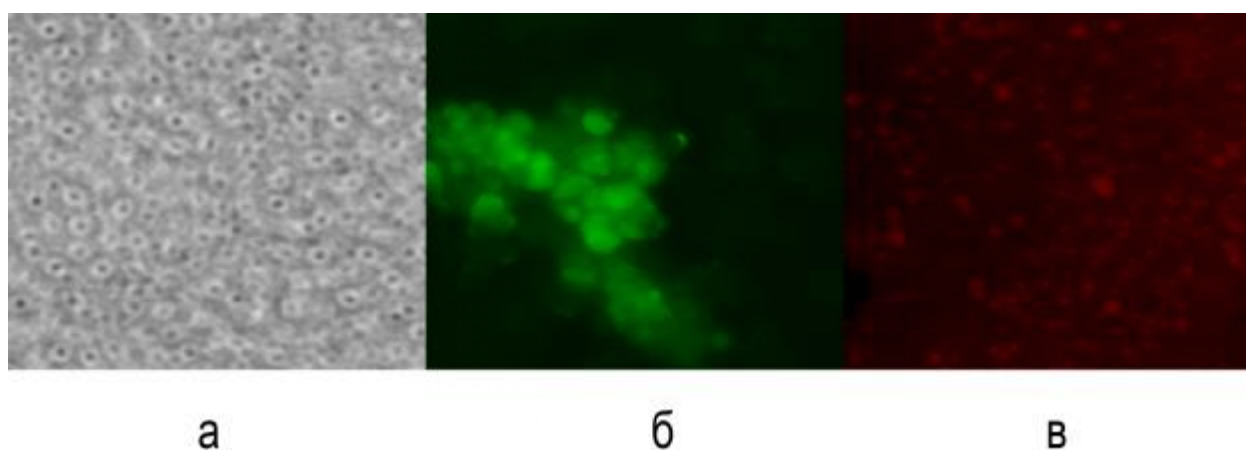


Рисунок 4. Фазово-контрастное изображение частиц хитозана и флуоресцентная микроскопия частиц хитозана, функционализированных БСА или тРНК, меченных флуоресцентными метками. а – микрочастицы хитозана (фазово-контрастное изображение). б – МЧХ, функционализированные БСА, меченным флуоресцеин изотиацианатом (ФИТИЦ). в – МЧХ, функционализированные препаратом тРНК, меченным флуоресцентной меткой Cy-3.

Инфильтрацию растительных клеток проводили микрочастицами хитозана, функционализированными белком/РНК/РНП. Полученные суспензии/растворы частиц предварительно озвучивали при температуре 25°C в течение 10 мин. с частотой 50/60 Hz с использованием ультразвуковой мойки Elmasonic s300h (Германия). Для инфильтрации тканей растений использовали методы механической и вакуумной инфильтрации. Механическую инфильтрацию проводили макроинъекцией с использованием инъекционного стерильного шприца без иглы. Препарат микрочастиц хитозана, функционализированных белком/РНК или комплексом белок-РНК, инфильтрировали в нижнюю поверхность листа через небольшое повреждение наружного эпидермиса. Площадь инфильтрации составляла не менее 1 см в диаметре. Вакуумную инфильтрацию проводили с использованием PDS-1000/He пушки (BioRad). Образцы (высечки листовой пластинки размером 5x5 мм, апикальные меристемы (около 10 меристем) или пазушные почки) помещали в камеру PDS-1000/He пушки, на образец наносили до 100 мкл приготовленного препарата, поднимали давление в камере до рекомендованного уровня, выдерживали в течение 60 сек, а затем снижали давление до нормального уровня. Инфильтрированные функционализированными микрочастицами хитозана клетки/ткани растения выдерживали в климатической камере или при комнатной температуре. Оценку результатов проводили на 2-3 день после инфильтрации методами флуоресцентной микроскопии или лазерной конфокальной микроскопии.

В экспериментах по доставке малых РНК в клетки растений *Nicotiana benthamiana*. использовали препараты тРНК или синтезированной *in vitro*, как описано выше, кгРНК. Предварительно проводили мечение малых РНК флуоресцентным красителем Cy3 (Jena Bioscience) с использованием стандартной методики. Пробу для инфильтрации получали, смешивая раствор микрочастиц хитозана в соотношении 100 мкл к 40 мкл и 30 мкл раствора гидовой РНК (концентрация 15 мМ) или препарата тРНК (концентрация 1 мг/мл). Пробу инкубировали в течение 5 мин. при температуре 4°C при постоянном перемешивании. Доставку платформ в клетки растений осуществляли путём механической или вакуумной инфильтрации.

Полученные результаты показывают, что разработанный способ доставки биологических макромолекул в клетки растений, основанный на инфильтрации (механической или вакуумной) препарата микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности макромолекулами, обеспечивает эффективную доставку полученных наноплатформ, что подтверждается по выявлению меченных флуоресцентными метками белков и нуклеиновых кислот в клетках растений, прежде всего клетках эпидермиса (рис. 5-7), а также результатами прямого секвенирования нового поколения в случае доставки

в клетки специфичных CRISPR/Cas9 рибонуклеопротеидных комплексов (см. следующие разделы).

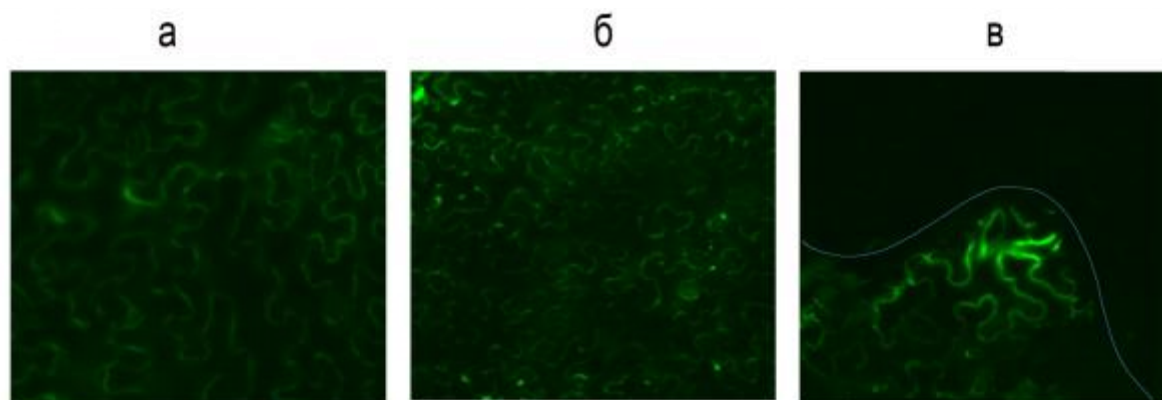


Рисунок 5. Доставка зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ), иммобилизованного на микрочастицах хитозана, в клетки растений *Nicotiana benthamiana* (а) и *Solanum tuberosum* (в последнем варианте в присутствии микрочастиц золота) (б) методом инфильтрации. На изображении справа (в) показана граница зоны инфильтрации.

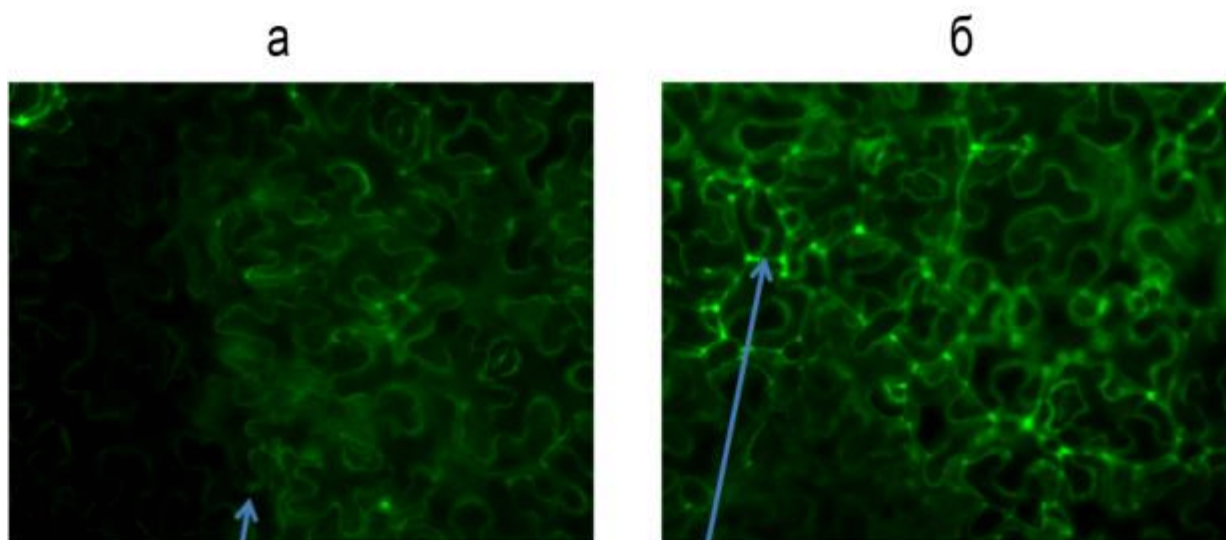


Рисунок 6. Доставка методом инфильтрации меченного БСА-ФИТЦ, иммобилизованного на микрочастицах хитозана, в клетки растений *Nicotiana benthamiana* в отсутствии микрочастиц золота (а) и в присутствии микрочастиц золота (б). На рис. 6а стрелкой показана граница зоны инфильтрации. На рис. 6б стрелка указывает на клетки губчатого мезофилла.

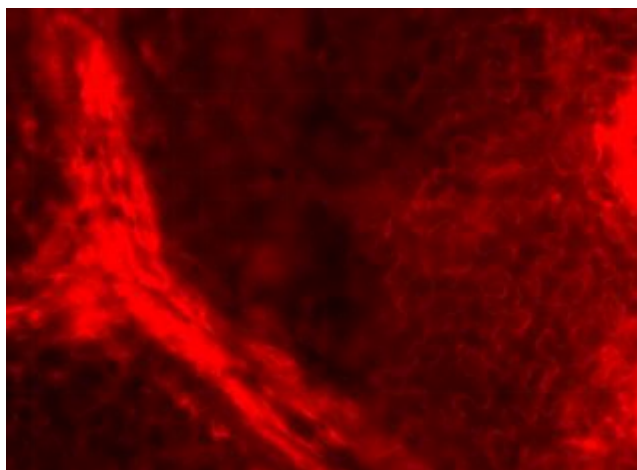


Рисунок 7. Доставка методом инфильтрации в клетки растений *Nicotiana benthamiana* тРНК, меченной флуоресцентным красителем Cy3 и иммобилизованной на микрочастицах хитозана. Ярко окрашены клетки проводящего пучка.

4.3 Доставка рибонуклеопротеидного комплекса CRISPR/Cas9 в клетки апикальной меристемы для бесплазмидного редактирования генома картофеля *Solanum tuberosum*

Для отработки метода бесплазмидной доставки системы CRISPR/Cas9 (РНП-комплексов) в клетки растений картофеля и тестирования ее активности как редактора генома мы использовали в качестве модельного гена - ген картофеля, кодирующий фермент фитоен десатуразу. Фитоен десатураза (phytoene desaturase, PDS) катализирует ключевой этап биосинтеза каротиноидов, защищающих хлорофилл от фотоокисления; таким образом, выключение (нокаут) этого гена приводит к появлению белых пятен на листьях растения. Использование этого гена в качестве маркера позволяет выполнять визуальный отбор отредактированных клеток или тканей. В работе мы использовали кгРНК1 к участку гена, кодирующему N-концевую область белка PDS (рис. 8), которая была отобрана на основании экспериментов, описанных в разделе 1 (рис. 1а, 2б). Коммерческий препарат эндонуклеазы Cas9 инкубировали с кгРНК1 для получения редактирующего РНП-комплекса.

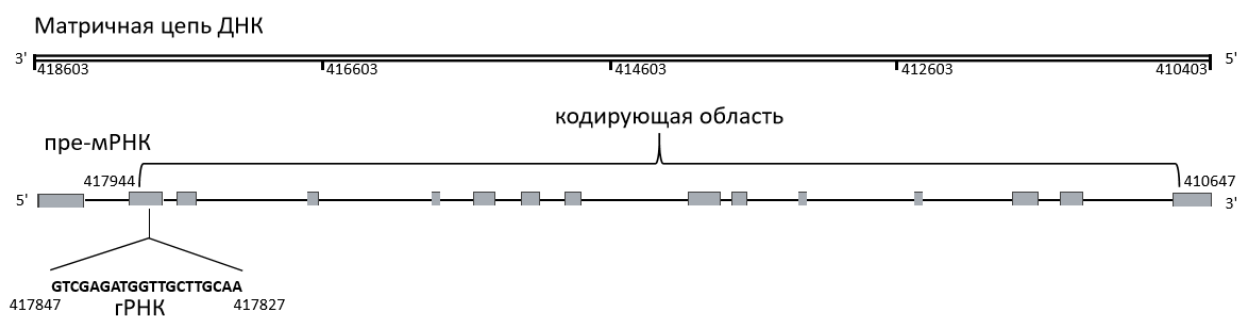


Рисунок 8. Структура гена фитоеен десатуразы картофеля с целевым участком, комплементарным короткой гидовой РНК (кгРНК1). Позиции нуклеотидов на матричной цепи ДНК соответствуют приведенным в базе данных (идентификационный номер NW_006238964, GenBank). Экзоны показаны как прямоугольники, интроны показаны сплошной линией. Кодировущая область и участок гена, на который нацелена короткая гидовая РНК (кгРНК) отмечены.

В качестве клеток, в которые доставляются предварительно собранные комплексы Cas9/кгРНК мы предложили использовать клетки апикальной меристемы картофеля *Solanum tuberosum* L., технология получения которых и последующей регенерации рутинно используется при оздоровлении растений картофеля от вирусов. Меристемы (апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов картофеля сорта Чикаго) переносили в чашки Петри на поверхность питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) без добавления гормонов и подвергали бомбардменту (метод биобаллистики) микрочастицами золота (0,6 мкм), или использовали разработанный нами оригинальный метод инфльтрации микрочастиц хитозана (0,6-0,8 мкм), с сорбированными на микрочастицах РНП-комплексами Cas9-кгРНК с использованием генной гелевой пушки. Меристемы, подвергнутые биобаллистике или инфльтрации микрочастицами, покрытыми только белком Cas9, использовали в качестве отрицательного контроля. Обработанные РНП-комплексом Cas9-кгРНК меристемы переносили в чашки Петри с питательной средой МС с добавлением фитогормонов и инкубировали в световом модуле для получения растений-регенерантов.

Визуальная оценка полученных растений-регенерантов показала, что эффективность редактирования (побеление листьев растений) при доставке редактора РНП-комплекса CRISPR/Cas9 методом биобаллистики функционализированными микрочастицами золота составила 2 линии из 90, а методом инфльтрации - 13 линий из 115. На рис. 9 приведен внешний вид растений-регенерантов отредактированных линий. Наши попытки определить факт редактирования наиболее широко используемым способом, выявляющим одиночные индели в редактируемой последовательности, - методом фрагментного анализа, не дали результатов: одиночные индели выявлены не были. Для оценки факта редактирования было проведено генотипирование линий, отобранных на основании визуального текста.

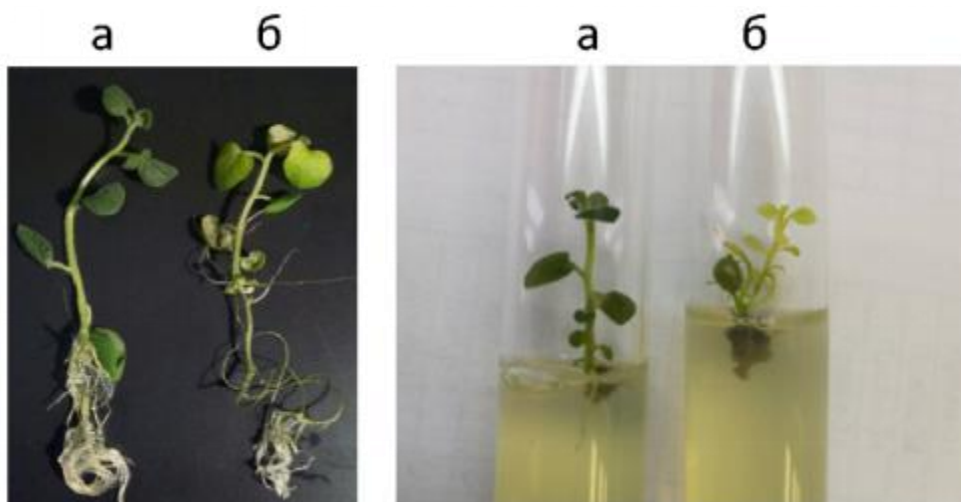


Рисунок 9. Внешний вид растений картофеля *S. tuberosum*, имеющих отредактированные аллели по гену фитоен десатуразы. а – контрольные растения, б – отредактированные растения

Из растений-регенерантов отобранных линий выделяли суммарный препарат ДНК, далее фрагмент целевой последовательности размером 100-150 пн амплифицировали и клонировали в *E.coli*. Для контрольной и каждой из редактированных линий получали не менее 30 колоний, из которых выделяли ДНК, проводили амплификацию фрагмента последовательности гена *PDS*, которая подвергалась редактированию, и полученный ПЦР-продукт секвенировали. На рис. 10 приведены результаты анализа для контрольной (растение, обработанное микрочастицами, функционализированными только белком Cas9) и двух отобранных линий, обработанных РНП-комплексами. Прежде всего, в обработанных РНП-комплексами (редактированных) и контрольных растениях были идентифицированы 4 аллеля, обозначенные как A1, A2, A3 и A4 (рис. 10а). Однако в отличие от контрольных растений в обеих редактированных линиях В10 (биоллистика) и J83 (инфильтрация) (рис. 10б,в) обнаруживаются только три из четырех аллелей: в линии В10 - аллели A1, A2 и A4, а в линии J83 - аллели A1, A2 и A3. Более того, в случае линии В10 аллель A1 обнаруживается только в 1 из 30 клонов (аллель A*) (рис. 10б). Наиболее вероятным объяснением этих данных является то, что протяженные нуклеотидные последовательности в аллеле A3 в линии В10 и в аллеле A4 в линии J83 делетированы в составе фрагмента, связывающего гидовую РНК, вследствие чего они не амплифицируются при проведении ПЦР.

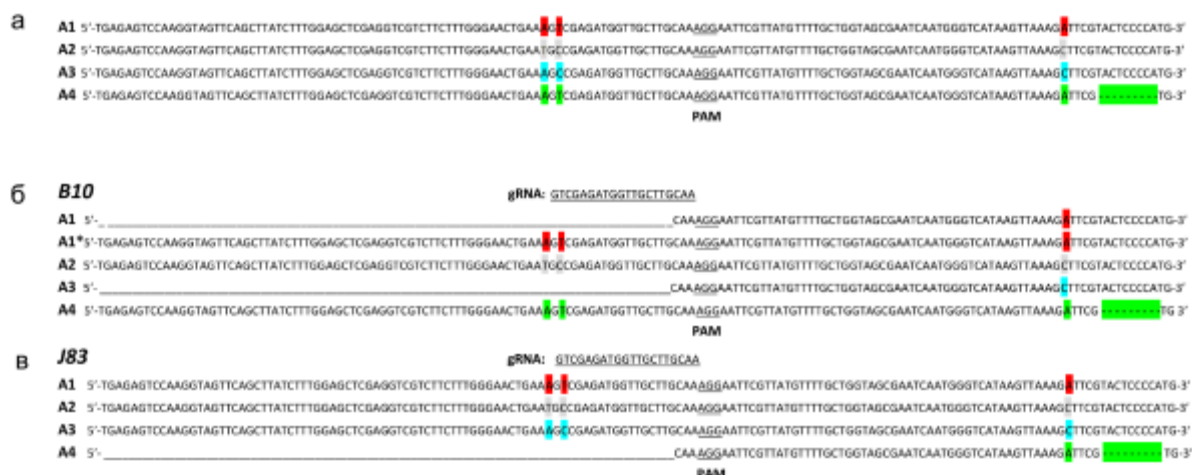


Рисунок 10. Нуклеотидная последовательность целевого фрагмента в гене *PDS* контрольного нередктированного растения (а) и редактированных линий B10 (б) и J83 (в). Выявленные аллели обозначены как A1, A2, A3 и A4; цветом показаны нуклеотидные замены, характерные для выявленных аллелей, и делеция в аллеле A4; сплошная линия – делетированные нуклеотиды. Подчеркнута последовательность гена, на которую нацелена кГРНК. РАМ-сайт отмечен шрифтом с подчеркиванием.

Для поиска длинных делеций в редактируемом гене был использован метод глубокого секвенирования (NGS) области ДНК размером около 1500 пн, которая включает участок, комплементарный гидовой РНК. В результате в редактируемой последовательности были выявлены делеции, начинающихся за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающие участок связывания кГРНК размером 489 и 497 пн в двух аллелях у линии B10 (аллели A1, A3) и размером 574 пн в одном аллеле (аллель A4) у линии J83, редактированных РНП-комплексом Cas9-кГРНК (рис. 11). В контрольных необработанных растениях такие делеции выявлены не были.



Рисунок 11. **Положение протяженных делеций в аллелях гена фетоеен десатуразы линий В10 и J83.** Последовательности аллелей в целевом фрагменте гена коилина обозначены как A1, A2 и A3. Прямоугольники соответствуют экзонам. Делеции нуклеотидов показаны пунктирной линией. Размер делеции указан в нт, в скобках даны позиции первого и последнего нуклеотида в ориентации, соответствующей базе данных (идентификационный номер NW_006238964, GenBank). Положение кгРНК показано прямой линией слева от РАМ-сайта, который отмечен жирным шрифтом.

Обычно геномное редактирование ДНК системой CRISPR/Cas9 приводит к появлению вставок и/или делеций (так называемых инделей) размером менее 20 нт (Koike-Yusa et al. 2014; van Overbeek et al. 2016; Tan et al. 2015). Тем не менее, более протяженные делеции (до 1500 пн) также были описаны при редактировании генома системой CRISPR/Cas9 (Ghezzaoui et al. 2014; Hendel et al. 2015; Shin et al. 2016; Kosicki et al. 2018). Следует отметить, что все обнаруженные нами делеции частично затрагивают два 5'-концевых экзона и полностью элиминируют интрон между ними, что приводит к значительному снижению экспрессии гена PDS в линиях В10 и J83 по сравнению с контрольным (нередктированным) растением (показано методом ОТ-ПЦР; рис. 12). Наблюдаемое снижение экспрессии, возможно, объясняется изменением нормального процесса сплайсинга мРНК. В целом, редактирование гена PDS затрагивает не более 2 аллелей (как в случае линии В10), что может объяснить полученные нами результаты визуального наблюдения редактированных линий: побеление листьев наблюдается на ранних этапах развития растения (до 7-8 листка проростка) (рис. 9) и исчезает при его дальнейшем росте. Очень низкая частота аллеля A1 (A1*) в линии В10 может указывать на химерную природу редактированного растения. Однако большинство клеток, видимо, химерами не являются.

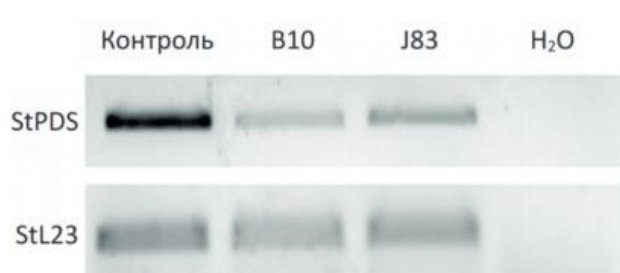


Рисунок 12. **Уровень экспрессии гена PDS в контрольном растении и редактированных линиях растений-регенерантов,** определенный методом полуколичественной ОТ-ПЦР, в сравнении с уровнем экспрессии гена белка L23 большой субъединицы рибосомы

В работах по редактированию генома картофеля, который является тетраплоидом, исследователи использовали метод трансфекции плазмидной ДНК (Andersson et al., 2017)

или бесплазмидную доставку РНП-комплекса CRISPR/Cas9 (Andersson et al., 2018) в изолированные протопласты картофеля. В этом случае удалось отредактировать все четыре аллеля целевого гена. Вместе с тем известно, что получение протопластов картофеля является трудоемкой задачей, а регенерация протопластов занимает от 6 до 9 месяцев. В настоящей работе для разработки значительно менее трудоемкого метода редактирования генома картофеля с помощью доставки РНП-комплекса CRISPR/Cas9 мы использовали клетки апикальной меристемы растения. Ключевым преимуществом апикальной меристемы является простота ее дальнейшей регенерации в целые растения, которая широко используется в производстве безвирусного картофеля и таким образом не требует дополнительной технологической адаптации. Кроме того, процесс получения сформировавшихся растений занимает не более 2-х месяцев. Для доставки РНП-комплекса CRISPR/Cas9 мы применили достаточно широко используемый метод биобаллистики клеток РНП-комплексами, иммобилизованными на микрочастицах золота (Martin-Ortigosa et al. 2014), и новый ранее не применявшийся метод инфильтрации РНП-комплексов, иммобилизованных на микрочастицах хитозана. Генетический анализ показал, что нам удалось отредактировать 1 аллель гена *PDS* при использовании метода инфильтрации и 2 аллеля этого гена при использовании метода биобаллистики. Генетические данные подтверждены ингибированием экспрессии целевого гена в случае обеих линий и временным побелением отредактированных растений. Мы не обнаружили одиночные индели в редактируемой последовательности, которые ранее были описаны при трансформации протопластов картофеля (Andersson et al., 2017), но выявили протяженные делеции в одном аллеле (линия J83) или двух аллелях (линия B10), начинающиеся за 3 нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающие участок связывания кРНК (рис. 11). Интересно, что протяженные делеции (до 1500 нт) при редактировании системой CRISPR/Cas9 были описаны ранее (Ghezzaoui et al., 2014; Hendel et al., 2015; Shin et al., 2016). Более того, недавно было показано, что индукция таких протяженных делеций при действии системы CRISPR/Cas не является редким событием, а представляет собой характерную отличительную особенность активно транскрибируемых локусов ДНК и ДНК клеток с повышенной митотической активностью (Kosicki et al., 2018). Наши данные полностью согласуются с этим наблюдением, поскольку клетки апикальной меристемы являются низко дифференцированными быстро делящимися клетками. Насколько нам известно, обнаружение длинных делеций при редактировании генома растений ранее описано не было.

4.4 Редактирование гена коилина в растениях картофеля *Solanum tuberosum*.

Коилин – это главный структурный белок, контролирующий формирование, состав и активность субъядерных телец Кахаля (ТК), физически и функционально ассоциированных с ядрышками. ТК участвуют в метаболизме РНК и сборке разнообразных рибонуклеопротеидных (РНП) комплексов, включая созревание некоторых ядерных РНК и сборку, модификацию и транспорт различных классов РНП-частиц. Растущее число данных свидетельствует о том, что ядрышки и ТК также принимают участие во многих других важных клеточных функциях таких как клеточный рост, гибель, клеточный цикл и ответы на стресс (Bassett 2012; Boulon et al. 2010; Love et al. 2017). Ранее используя модельную систему растений *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana benthamiana*, было показано, что коилин и ТК также влияют на взаимодействия между растениями-хозяевами и вирусами (Shaw et al, 2014). Трансгенные растения, в которых экспрессия гена коилина была подавлена с помощью механизма РНК-интерференции, отвечали по-разному на заражение вирусами, принадлежащими к различным таксономическим группам. Так в отсутствие коилина наблюдалось значительное угнетение инфекции растений РНК-содержащим Y вирусом картофеля (YBK, род *Potyvirus*) (Shaw et al, 2014), одним из наиболее опасных и экономически важных патогенов картофеля. Кроме того, было показано, что коилин вовлечен в ответ растения на абиотический солевой стресс (Love et al. 2017). Механизмы участия коилина в защитных ответах растения на стрессы разной природы остаются малоизученными. Растительный ген коилина рассматривался нами как перспективная мишень для редактирования с целью получения линий картофеля, устойчивых к заражению YBK и абиотическим стрессам. В связи с этим мы редактировали ген коилина в растениях картофеля *Solanum tuberosum* L. сорт Чикаго, используя технологию CRISPR–Cas9 и метод бесплазмидной доставки редактирующего комплекса в клетки меристемы.

Коилины и коилин-подобные белки растений не имеют строгой эволюционной консервативности в аминокислотной последовательности, однако структура их молекул, видимо, построена на основании общих принципов (Makarov et al. 2013). Молекула коилина арабидопсиса состоит из трех основных доменов: N-концевого глобулярного домена, центрального высоко неупорядоченного домена и C-концевого домена (CTD), включающего предполагаемую Тюдор-подобную структуру и неупорядоченный C-конец (Makarov et al. 2013). Для редактирования были выбраны районы гена коилина картофеля, кодирующие N-концевой и C-концевой домены (CTD), последний вовлечен во взаимодействия с белками клетки, важными для функции ТК (Xu et al. 2005; Toyota et

al. 2010). Нам не удалось синтезировать активную *in vitro* кгРНК к последовательностям, кодирующим N-концевой домен, а из пяти кгРНК к последовательностям, кодирующим CTD, была активна только одна – кгРНК3 (рис. 12). Синтез *in vitro* и анализ активности этой кгРНК описаны в разделе 1 (рис.1, 2б).

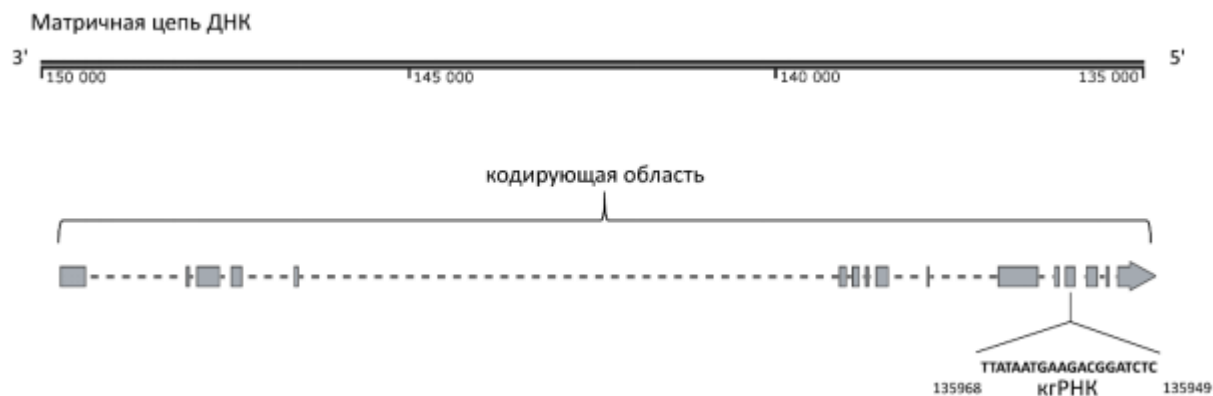


Рисунок 12. Структура гена коилина картофеля с целевым участком, комплементарным короткой гидовой РНК (кгРНК3). Позиции нуклеотидов на матричной цепи ДНК соответствуют приведенным в базе данных (идентификационный номер NW_006239172, GenBank). Экзоны показаны как прямоугольники, интроны показаны пунктирной линией. Кодировущая область и участок гена, на который нацелена короткая гидовая РНК (кгРНК) отмечены.

Последующие этапы, были аналогичны описанным при редактировании гена *PDS* картофеля (раздел 3). Меристемы (апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов картофеля сорта Чикаго) переносили в чашки Петри на поверхность питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) без добавления гормонов и подвергали или биобаллистике золотыми микрочастицами (0,6 мкм), или инфильтрации микрочастицами хитозана (0,6-0,8 мкм), с сорбированными на них предварительно образованными РНП-комплексами Cas9-кгРНК. Обработанные РНП-комплексом Cas9-кгРНК меристемы переносили в чашки Петри с питательной средой МС с добавлением фитогормонов и инкубировали в световом модуле для получения растений-регенерантов.

Поскольку метод фрагментного анализа не выявил инделей в редактируемой последовательности гена, как и в предыдущем случае при редактировании гена *PDS*, мы проанализировали уровень экспрессии гена коилина в полученных растениях-регенерантах методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). На рис. 14а представлены типичные результаты анализа нескольких линий, на основании которых были отобраны две линии D15 и F25 со сниженным по сравнению с контрольными растениями уровнем экспрессии гена, полученные при доставке РНП-комплекса Cas9/кгРНК путем бомбардировки меристем золотыми микрочастицами или вакуумной

инфильтрации микрочастиц хитозана с сорбированным комплексом, соответственно. Дальнейший анализ путем генотипирования редактированных линий по фрагменту целевой последовательности гена коилина размером 150 пн показал полное отсутствие последовательности одного из аллелей у каждой из линий, которые отличались у разных линий, что позволило предположить наличие более протяженных делеций (данные не показаны).

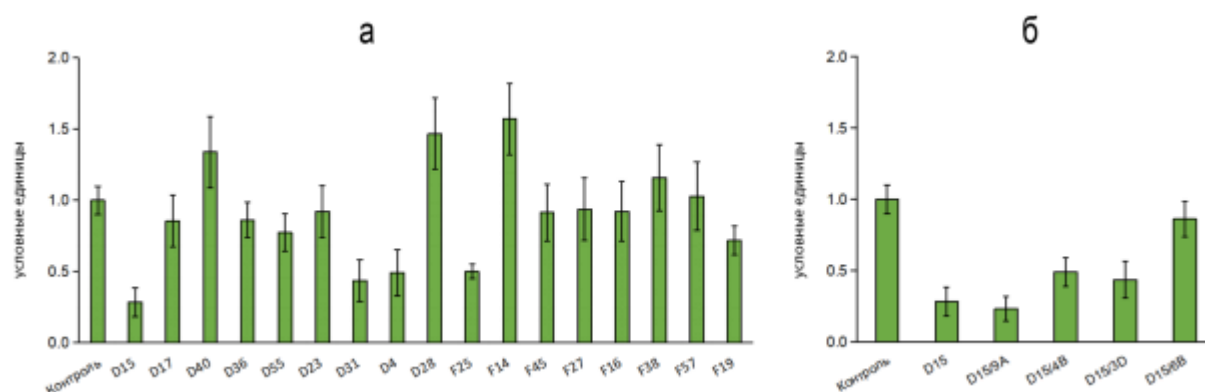


Рисунок 14. **Уровень экспрессии гена коилина, определенный методом ПЦР в реальном времени**, в контрольном растении и первично редактированных линиях (*а*) и линиях после второго цикла редактирования (*б*). Линии, полученные при редактировании клеток меристем методом биобаллистики, обозначены как линии D; линии, полученные методом вакуумной инфильтрации, обозначены как линии F. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Для их выявления был использован метод глубокого секвенирования (NGS) ампликонов размером около 1100 пн, включающих участок связывания кгРНК. В результате были обнаружены протяженные делеции у линии D15 размером 561 пн, а у линии F25 размером 552 пн, начинающиеся за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающие участок связывания кгРНК (рис. 15а). В контрольных необработанных растениях делеции выявлены не были. Таким образом, менее чем за два месяца с использованием предложенной технологии нам удалось получить модифицированные линии, по крайней мере, с одним редактированным аллелем целевого гена.

С целью изучения возможности повышения эффективности метода и увеличения числа отредактированных аллелей мы провели повторное редактирование полученных и охарактеризованных как мутантные линий картофеля. Для этого была выбрана линия D15, апикальные меристемы которой обстреливали золотыми микрочастицами с иммобилизованным РНП-комплексом Cas9/кгРНК, используя увеличенные вдвое концентрации рекомбинантной эндонуклеазы Cas9 и кгРНК.

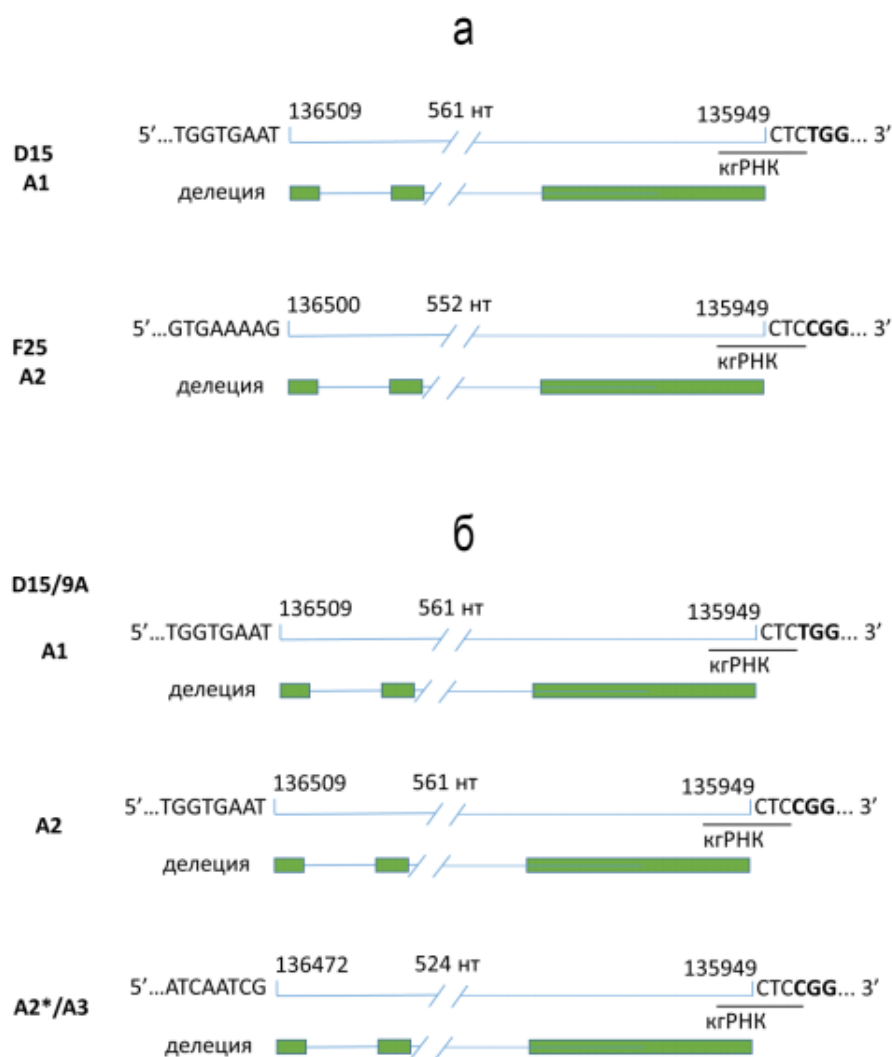


Рисунок 15. Положение протяженных делеций в аллелях гена коилина линий D15 и F25 (а) и повторно редактированной линии D15/9А (б). Последовательности аллелей в целевом фрагменте гена коилина обозначены как А1, А2 для линий D15 и F25 и А1, А2, А2*/А3 для линии D15/9А. Прямоугольники соответствуют экзонам. Делеции нуклеотидов показаны скобками. Размер делеции указан в нт, по концам интервала даны позиции первого и последнего нуклеотида в ориентации, соответствующей базе данных (идентификационный номер NW_006239172, GenBank). Положение кгРНК показано прямой линией слева от РАМ-сайта, который отмечен жирным шрифтом.

В экспериментах использовали ту же кгРНК, что и в первом раунде редактирования. Растения полученных линий анализировали на уровень экспрессии гена коилина методом РВ-ПЦР. Для детального анализа была выбрана линия D15/9А, уровень экспрессии гена коилина в которой был снижен по сравнению с исходной линией D15 на 20% (рис. 14б). На рис. 15б приведены данные, полученные методом глубокого секвенирования нового поколения (NGS) ампликонов размером около 1100 пн для линии D15/9А. Наряду с делецией размером 561 пн в аллеле А1, выявленной ранее у линии D15 (при повторном редактировании аллель А1 не затрагивался, поскольку фрагмент, соответствующий

кгРНК уже был в нем делетирован), дополнительно было выявлено два новых варианта делеций. Одна делеция размером 561 пн, идентичная по размеру делеции в аллеле A1, являлась модифицированной версией другого аллеля (обозначен как A2), содержащего маркер CGG (РАМ-сайт), отличный от маркера аллеля A1 (TGG). Второй вариант содержал меньшую делецию в 524 пн и маркер CGG. В настоящее время не представляется возможным определить принадлежат ли оба этих варианта к одному и тому же или к разным аллелям (обозначены на рис. 15б как A2*/A3). Все выявленные делеции были расположены за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивали участок связывания кгРНК.

Таким образом, повторное редактирование увеличивало число отредактированных аллелей до трех, однако, как видно на рис. 14б, незначительно снижало экспрессию гена коилина. Этот эффект может быть связан с тем обстоятельством, что гомоаллели (гомеоаллели) гена коилина экспрессируются неодинаково (сильно или слабо) и, следовательно, вносят неравный вклад в последующий синтез данного белка в растении. Очевидно, что редактирование первого из аллелей внесло основной вклад в угнетение экспрессии гена коилина и выявленный биологический эффект повышения устойчивости отредактированной линии к заражению вирусом и абиотическим стрессам (см. следующий раздел). Интересно, что аллельные вариации в экспрессии генов часто встречаются в гибридах и полиплоидных растениях некоторых видов.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что доставка редактирующего РНП-комплекса Cas9/кгРНК в клетки апикальной меристемы картофеля методом биобаллистики функционализированными микрочастицами золота или методом вакуумной инфльтрации функционализированными микрочастицами хитозана, является простым, быстрым и недорогим методом, позволяющим специфическое и достаточно эффективное редактирование целевого гена. Редактирование гена коилина с использованием этой технологии приводит к возникновению только длинных делеций, начинающихся за три нуклеотида левее РАМ-сайта, размером чуть более 500 пн. Подобные протяженные делеции не были выявлены ранее при knock-out редактировании генов растений с помощью технологии CRISPR/Cas9.

Действительно, как уже упоминалось, геномное редактирование ДНК системой CRISPR/Cas9, как правило, приводит к появлению в редактируемом гене вставок и/или делеций (так называемых инделей) размером менее 20 пн (Koike-Yusa et al., 2014; van Overbeek et al. 2016; Tan et al. 2015). Так, при редактировании генов картофеля с помощью различных подходов в подавляющем числе выявлялись одиночные индели длиной до 20 пн. Эти результаты были получены при агротрансформации стеблевых

эсплантов и петиолей картофеля (Andersson et al., 2017; Danielsen et al. 2004), при трансфекции генно-инженерных конструкций или доставке преформированного РНП-комплекса в протопласты (Andersson et al. 2018; Andersson et al. 2016). Сходным образом, редактирование генома в протопластах кукурузы и пшеницы методом бомбардмента редактирующим РНП-комплексом, сорбированным на микрочастицах золота, также приводило к возникновению небольших инделей (1-10 пн). В последнее время для повышения эффективности редактирования протопластов картофеля авторы использовали одновременно две гидовые РНК, комплементарные различным участкам редактируемого гена, в этом случае наряду с небольшими инделями наблюдаются и длинные делеции (в среднем от 100 до 300 пн), расположенные как симметрично, так и ассиметрично относительно РАМ-сайта. Появление таких делеций вызвано тем, что эндонуклеаза Cas9 вносит разрывы в обоих участках, что приводит к удалению фрагмента между ними (Standage-Beier et al. 2015; Shen et al. 2014). В нашей системе возникновение длинных делеций наблюдается при использовании одной кгРНК.

Вместе с тем, анализ изменений, вносимых системой CRISPR/Cas9, в геном клеток животных значительно разнообразнее и описывает возникновение протяженных делеций до 1500 пн (Ghezraoui et al. 2014; Hendel et al. 2015; Shin et al. 2017; Kosicki et al. 2018), в частности, при редактировании активно транскрибируемых локусов ДНК и ДНК клеток с повышенной митотической активностью (Kosicki et al. 2018). Мы предполагаем, что клетки меристемы растений по типу деления клеток/транскрипционной активности напоминают вышеупомянутые животные системы. Таким образом, образование подобных мутаций, впервые выявленных при редактировании клеток меристемы растений, вероятно, имеет сходный механизм с быстро делящимися клетками животных. Одна из вероятных причин появления подобных делеций заключается в структуре хроматина, имеющей важное значение при модификациях генома.

Как уже отмечалось (раздел 3), при редактировании гена *PDS* картофеля с использованием предложенного нами метода также были обнаружены длинные делеции сходного типа в отредактированной последовательности: а именно делеции, начинающихся за три нуклеотида до РАМ-сайта и частично затрагивающих участок связывания кгРНК размером 489, 497 и 574 пн в одном и двух аллелях, соответственно (см. раздел 3). Эти данные позволяют нам сделать вывод, что редактирование клеток меристем преформированным редактирующим комплексом сопровождается появлением длинных делеций в несколько сотен нуклеотидов (в диапазоне от 400 до 600 пн), расположенных стандартно за три нуклеотида до РАМ сайта. С практической точки зрения подобные делеции не являются недостатком системы, а возможно, даже являются ее

преимуществом, поскольку труднее или практически не поддаются реверсиям.

Технологическая простота предложенного метода и высокая эффективность регенерации растений выгодно отличает его от широко используемого в настоящее время метода с использованием протопластов картофеля, к ограничениям которого, кроме методических проблем, связанных с получением протопластов из отдельных сортов растений, низкой эффективностью и более длительным сроком регенерации, относится наличие большого числа самоклональных вариаций в растениях-регенерантах.

Важно отметить, что при одном или двух циклах редактирования технология приводит только к частичному редактированию целевого гена, затрагивающему от 1 до 3 аллелей из четырех. Такое редактирование уменьшает уровень экспрессии гена (gene knock-down), но не «выключает» его экспрессию полностью (gene knock-out). Частичное редактирование важно при редактировании существенных генов (генов домашнего хозяйства), полное выключение которых приводит к изменению фенотипа растения, снижению его выживаемости и даже гибели.

4.5 Функциональный анализ роли коилина в устойчивости растений картофеля *Solanum tuberosum* к вирусной инфекции и абиотическим стрессам

Редактированные линии растений картофеля анализировали на устойчивость к заражению Y-вирусом картофеля и к абиотическим (солевой и осмотический) стрессам.

Устойчивость редактированных линий картофеля к заражению YBK⁰ (штамм обыкновенный) изучали в двух сериях экспериментов. В первой серии пробирочные растения-регенеранты контрольной и редактированных линий F25 и D15 (по 10–20 растений в каждой группе) заражали YBK⁰ и через 28 дней после инокуляции (дпи) из растений выделяли суммарный препарат РНК для дальнейшего анализа. Во второй серии опытов взрослые растения картофеля (контрольные линии и линии F25 и D15) на стадии 5–6 листьев (10 растений в каждой группе) заражали YBK⁰ и через 28 дпи из системных симптоматических листьев каждого растения выделяли суммарный препарат РНК. Вирусную РНК определяли полуколичественным методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). В качестве гена сравнения использовали ген рибосомного белка L23. В обеих сериях экспериментов было выявлено значительное уменьшение доли заражённых вирусом растений в случае линий, редактированных по гену коилина, по сравнению с контрольными растениями (рис. 16). Так, по сравнению с контрольными растениями резистентность к вирусной инфекции линии D15 была выше в 2,7 и 2 раза, а линии F25 – в 10 и 4 раза в опытах *in vitro* и *in vivo* соответственно.

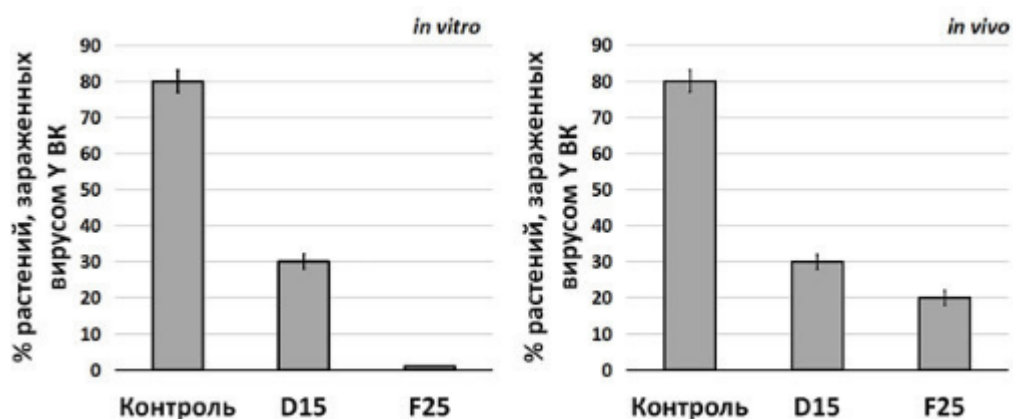


Рисунок 16. **Уровень устойчивости растений к заражению вирусом УБК.** На графиках показана доля (в процентах от общего числа заражённых УБК-О растений) контрольных растений и растений редактированных линий, в которых была выявлена вирусная инфекция. Слева эксперимент *in vitro*, справа - *in vivo*.

Далее мы исследовали устойчивость редактированных линий к двум типам абиотического стресса – солевому и осмотическому. Ответ на солевой стресс оценивали визуально по числу листьев с хлорозами и пониженным тургором, а также по размеру листовой пластинки. Видимые различия между группами контрольных растений и редактированных линий проявились на 11 день опыта: в условиях солевого стресса у контрольных растений наблюдали ускоренное пожелтение и опадание листьев по сравнению с редактированными линиями. Дополнительно обнаружили заметное ингибирование развития и деформацию листовой пластинки. Через 18 дней симптомы развития стресса усилились. Однако различия в устойчивости к стрессу между контрольными растениями и редактированными линиями сохранились (рис. 17).



Рисунок 17. **Влияние солевого стресса на фенотип контрольных растений и редактированных линий через 18 дней после ежедневной обработки растений раствором 300 мМ NaCl.**

Влияние гиперосмотического стресса изучали у пробирочных растений контрольной

линии и редактированных линий F25 и D15. Мы оценивали следующие параметры: сырой вес целого растения, вес надземного побега и корня, а также длину и общее число корней. Между контрольными растениями и редактированными линиями мы не зафиксировали заметного различия по весу надземного побега, однако суммарный вес корней отличался у контрольных и редактированных растений (рис. 18). Присутствие в среде сорбитола угнетало развитие корневой системы приблизительно в 9 раз в контроле и соответственно в 4 и 2 раза у редактированных линий F25 и D15. Сорбитол практически не влиял на длину корней у редактированных линий, тогда как у контрольных растений этот показатель уменьшился почти в 2 раза. Число корней в присутствии сорбитола снизилось у контрольных растений в 3 раза, у растений линии F25 – в 2 раза, а у линии D15 – в 1,4 раза (рис. 14). В целом бóльшая устойчивость к осмотическому стрессу у редактированных по гену коилина линий, видимо, обусловлена более эффективным развитием корневой системы.

Таким образом, эксперименты по редактированию гена коилина в растениях картофеля подтвердило результаты, полученные ранее на модельной системе – растения *Nicotiana benthamiana* – YBK (Shaw et al 2014), продемонстрировав, что «выключение» даже одного аллеля этого гена приводит к выраженному увеличению резистентности редактированных линий к заражению YBK, который является одним из наиболее опасных и экономически важных патогенов картофеля, и повышению устойчивости к абиотическим солевым и осмотическим стрессам.

Пробирочные растения, редактированные по гену коилина (линии F25 и D15, а также линия D15/9A) и контрольные растения сорта Чикаго (по 30-35 растений каждого варианта) были высажены в поле на опытные делянки (рис. 19) на естественном инфекционном фоне в июне 2018 г. на территории селекционно-генетической фирмы ООО «Дока-генные технологии» (с. Рогачево, Дмитровский район). В ходе вегетации была проведена оценка контрольных и опытных образцов по морфологическим и агрономическим признакам. Измерение высоты растений и отбор растительных проб для оценки на зараженность YBK (методом иммуноферментного анализа) был проведен дважды в течение вегетации – через 30 и 45 дней после высадки растений в поле.

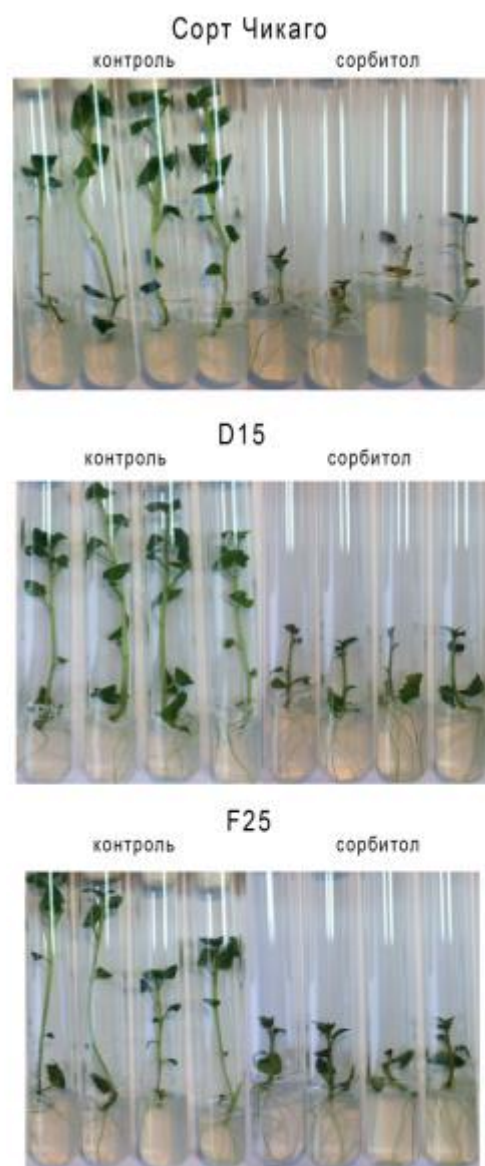
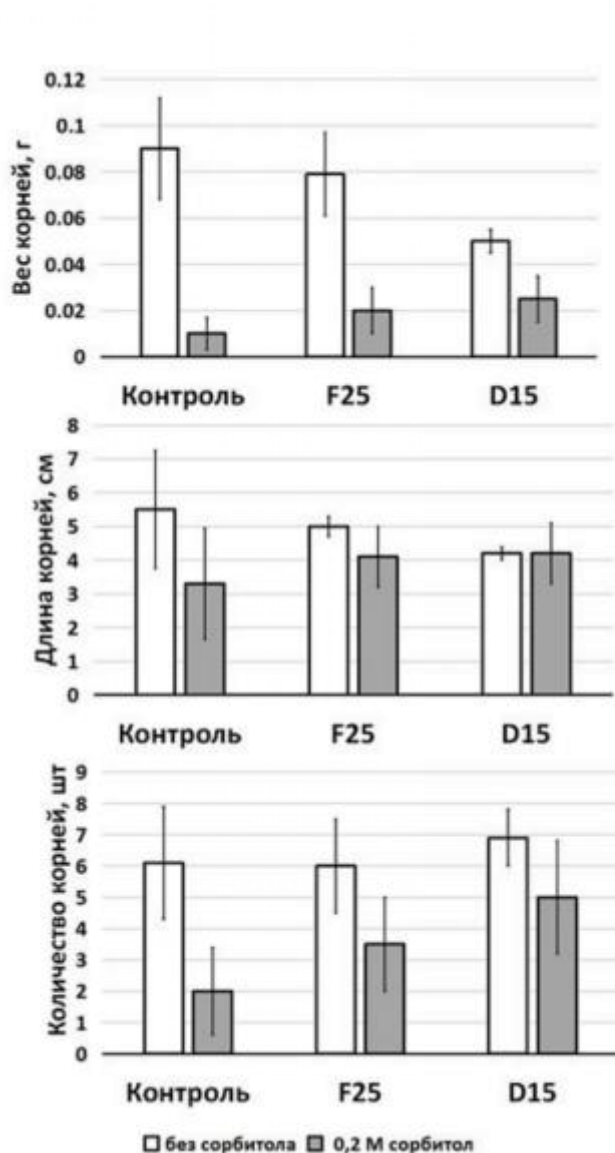


Рисунок 18. Влияние осмотического стресса на рост и развитие корневой системы пробирочных растений контрольной и редактированных линий через 14 дней роста на среде, содержащей 0,2 М сорбитола. На графиках - итоговые результаты трёх независимых экспериментов, $M \pm SD$, $n = 10$ для каждой группы, $*p < 0,05$ по критерию t Стьюдента по сравнению с контролем. Справа показан внешний вид пробирочных растений.

В конце вегетации был проведен учет массы всех полученных клубней и рассчитана продуктивность одного растения (масса всех собранных клубней, деленная на количество растений на делянке в каждом варианте).



Рисунок 19. Опытная делянка с высаженными на них растениями картофеля. Слева направо - контроль, линии F25 и D15.

В ходе вегетации не было отмечено различий между растениями редактированных линий по гену коилина и контрольных растений по морфологии куста, листьев, соцветий и цветков. Исключение составил такой признак как высота растения. Растения редактированных линий по гену коилина были выше контрольных растений сорта Чикаго в среднем на 5-10 см (рис. 20).

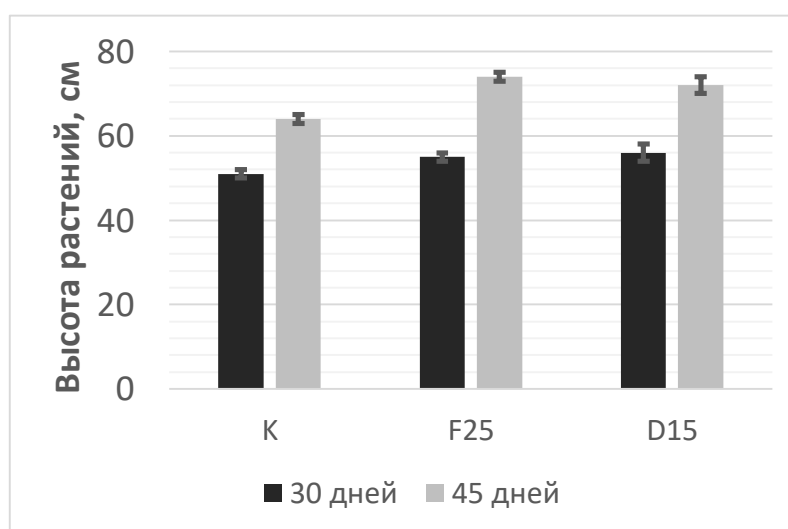


Рисунок 20. **Высота растений**, редактированных по гену коилина линий (F25 и D15) и контрольных растений сорта Чикаго, измеренная в ходе вегетации через 30 и 45 дней после высадки пробирочных растений в поле.

Иммуноферментный анализ, проведенный дважды в течение вегетации, показал, что количество зараженных YBK растений в контрольном сорте Чикаго было выше, чем в редактированных по гену коилина растениях линий F25 и D15 (рис. 21). Наибольшую устойчивость продемонстрировала линия D15, у которой на 45-ый день вегетации из всех высаженных на делянку растений только 20% оказались зараженными вирусом, в то время как в исходном сорте Чикаго (контроль) 64% растений были поражены этим вирусом.

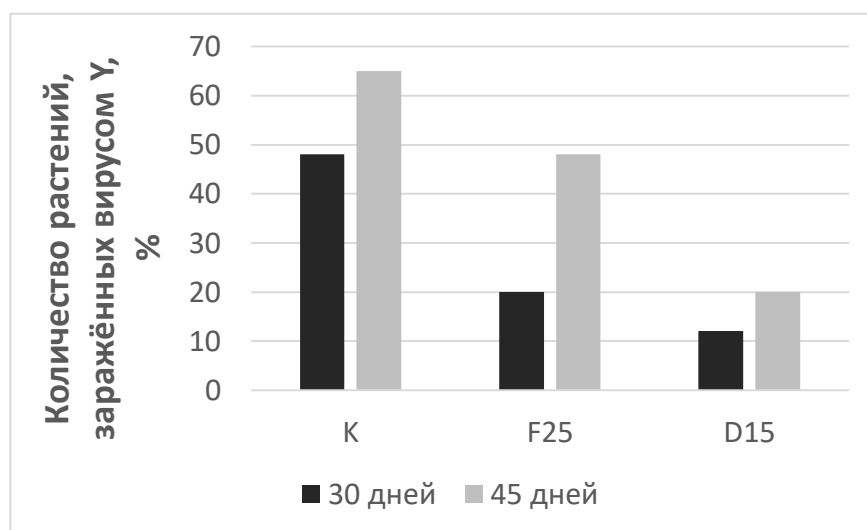


Рисунок 21. **Степень поражения растений**, редактированных по гену коилина линий (F25 и D15), и контрольных растений сорта Чикаго YBK в ходе вегетации через 30 и 45 дней после высадки в поле. Оценка зараженности YBK проводилась методом ИФА.

Как следствие минимальной зараженности вирусом, линия D15 (но не линия F25) продемонстрировала максимальную продуктивность – в среднем 648 г клубней с одного растения. Интересно, что продуктивность повторно редактированной линии D15/9A также была выше исходного сорта Чикаго (рис. 22).

Таким образом, результаты, полученные в лабораторных экспериментах, были подтверждены данными испытаний редактированных линий растений в полевых условиях на естественном инфекционном фоне.

В заключение следует отметить, что оптимизация методов бесплазмидного редактирования, позволяющих получать растения с заданными свойствами, которые не попадают под действие регуляторных мер, ограничивающих распространение ГМО, открывает большие возможности для улучшения полезных признаков в случае гетерозиготных, полиплоидных и вегетативно размножаемых культур, каким является картофель.

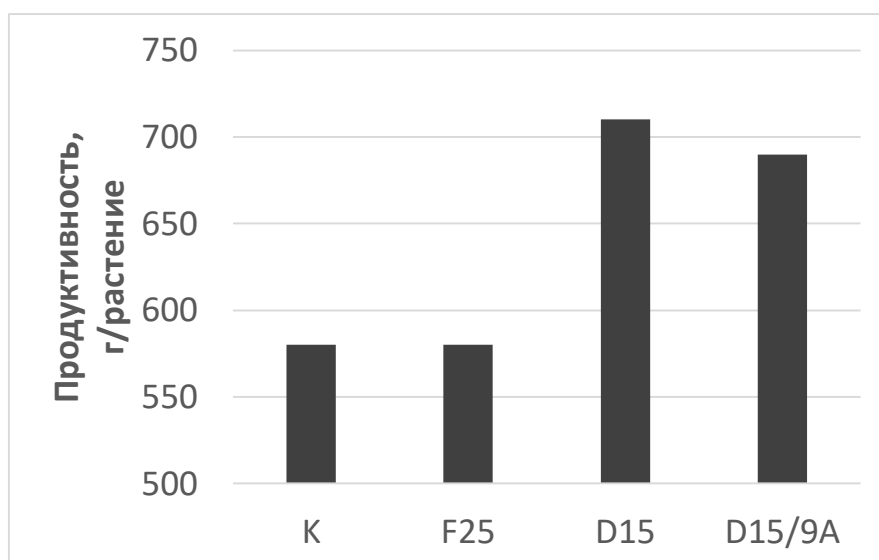


Рисунок 22. **Продуктивность растений сорта Чикаго** - контрольных (K), растений, отредактированных по гену коилина линий (F25 и D15) и повторно отредактированных (D15/9A), определенная как масса всех собранных клубней, деленная на количество растений на делянке в каждом варианте.

Предложенный нами технологически простой метод быстрого получения отредактированных растений картофеля с использованием меристем может быть полезным для модификации существенных генов, в частности, генов, отвечающих за устойчивость растений к стрессам разной природы, в любых коммерчески важных сортах картофеля.

5. ВЫВОДЫ

1. Разработан способ доставки в клетки растений *Nicotiana benthamiana* и *Solanum tuberosum* платформ на основе микрочастиц хитозана с иммобилизованными на их поверхности флуоресцентно меченными модельными белками и короткими РНК с помощью инфильтрации комплексов в листья растений. Показано, что наноплатформы способны доставлять биомолекулы в клетки эпидермиса листьев растений.
2. Проведен дизайн коротких гидовых РНК (кгРНК) к высоко консервативным участкам генов фитоен десатуразы (*PDS*) и коилина растений картофеля *Solanum tuberosum* L. Проведена оценка *in vitro* эффективности синтезированных кгРНК в разрезании целевого участка генов рекомбинантной эндонуклеазой Cas9.
3. Отработаны условия доставки редактирующего комплекса (рекомбинантная эндонуклеаза:кгРНК) в клетки растений картофеля *S. tuberosum* путем бомбардмента или вакуумной инфильтрации с использованием в качестве платформ микрочастиц золота и микрочастиц хитозана. В качестве редактируемых клеток выбраны апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов растений картофеля сорта Чикаго.
4. С использованием бесплазмидных технологий для доставки редактирующих компонентов системы CRISPR/Cas9 в клетки растений картофеля проведено редактирование двух генов – гена *PDS* и гена коилина. Для отбора отредактированных линий использовали визуальную оценку растений-регенерантов и данные ОТ-ПЦР (ген фитоен десатуразы), анализ методом количественной ПЦР-РВ (ген коилина), а также результаты генотипирования целевой последовательности генов размером 100-150 пн.
5. С использованием метода глубокого секвенирования (NGS) в целевой области ДНК размером около 1500 нт, которая включает участок, комплементарный кгРНК в отредактированных линиях картофеля по генам фитоен десатуразы и коилина показано, что редактирование генома клеток меристем сопровождается появлением протяженных делеций размером в среднем от 400 до 600 пн.
6. Редактированные по гену коилина линии растений-регенерантов картофеля демонстрировали повышенную устойчивость к заражению Y-вирусом картофеля (YBK, род *Potyvirus*) и к абиотическим осмотическому и солевому стрессам в опытах *in vitro* и *in vivo*. Растения картофеля отредактированных линий, выращенные в полевых условиях, проявили повышенную резистентность к заражению YBK на естественном фоне, эффективнее развивались и отличались повышенной продуктивностью.

6. БЛАГОДАРНОСТИ

Я хочу выразить искреннюю благодарность своему научному руководителю Калининой Наталье Олеговне за чуткое руководство и помощь в организационных процессах, планировании экспериментов и работе над диссертацией, а также за терпение.

Большая благодарность Тальянскому Михаилу Эммануиловичу за ценные консультации, обсуждение и интерпретацию результатов.

Благодарю генерального директора ООО "Дока-Генные Технологии" Чуенко Александра Михайловича и директора центра Супрунову Татьяну Павловну за помощь в работе с растениями картофеля.

Также хочу выразить благодарность Махотенко Антониде Викторовне за помощь на всех этапах работы, Макарову Валентину Владимировичу, Макаровой Светлане Сергеевне, Гущину Владимиру Алексеевичу за помощь на разных этапах экспериментов и обсуждении результатов.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joung, J., et al. . RNA targeting with CRISPR-Cas13. // Nature - 2017. - V. 550 - P. 280-284.
2. Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Joung, J., Slaymaker, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. // Science - 2016. - V. 353 - P. aaf5573.
3. Ali, Z., Abulfaraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. // Mol. Plant - 2015. - V. 8 - P. 1288-1291.
4. Ali, Z., Abulfaraj, A., Li, L., Ghosh, N., Piatek, et al. Efficient virus-mediated genome editing in plants using the CRISPR/Cas9 system. // Mol. Plant - 2015. - V. 8 - P. 1288-1291.
5. Ali, Z., Ali, S., Tashkandi, M., Zaidi, S. S. E. A., and Mahfouz, M. M. CRISPR/Cas9-mediated immunity to geminiviruses: Differential interference and evasion. // Sci. Rep. - 2016. - V. 6 - P. 26912.
6. Aman, R., Ali, Z., Butt, H., Mahas, A., Aljedaani, et al. RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants. // Genome Biol. - 2018. - V. 19 - P. 1.
7. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A., and Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. // Nature - 2014. - V. 513 - P. 569-573.
8. Andersson M., Turesson H., Nicolai A., et al. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. // Plant Cell Rep. - 2017 - V. 36 - P. 117–128.
9. Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P. // Plant Cell Reports. - 2016. - V. 36. - P. 117–128.
10. Andersson, A.F. and Banfield, J.F. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. // Science - 2008 - V. 320 - P. 1047–1050
11. Andersson, M., Turesson, H., Olsson, N., Falt, A. S., Ohlsson, P., Gonzalez, M. N., Samuelsson, M., and Hofvander, P. Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. // Physiol. Plant. - 2018. - V. 164:4 - P. 378-384
12. Arif, M., Azhar, U., Arshad, M., Zafar, Y., Mansoor, S., et al. Engineering broad(spectrum resistance against RNA viruses in potato // Transgen. Res. - 2012. - V. 21 - P. 303–311.
13. Baltes, N. J., Gil-Humanes, J., Cermak, T., Atkins, P. A., and Voytas, D. F. DNA replicons for plant genome engineering. // Plant Cell - 2014. - V. 26 - P.151-163.
14. Barrangou, R. et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. // Science - 2007 - V. 315 - P. 1709–1712

15. Barrangou, R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. // *Nat. Biotechnol.* - 2012 - V. 30 - P. 836–838
16. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science* - 2007. - V. 315 - P. 1709–1712.
17. Bassett, C.L., Cajal Bodies and Plant RNA Metabolism // *Crit. Rev. Plant Sci.* - 2012 - V. 31 - P. 258–270.
18. Bolotin, A. et al. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. // *Microbiology* - 2005 - V. 151 - P. 2551–2561
19. Borchard G. Chitosans for gene delivery // *Adv. Drug Deliv. Rev* - 2001. - V. 52 - P. 145-150.
20. Borrelli, V. M. G., Brambilla, V., Rogowsky, P., Marocco, A., and Lanubile, A. The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. // *Front. Plant Sci.* - 2018. - V. 9 - P. 1245.
21. Botelho, A. et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) analysis of members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. // *Methods Mol. Biol.* - 2015 - V. 1247 - P. 373–389
22. Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M., and Lamond, A.I., The Nucleolus under Stress // *Mol. Cell* - 2010. - V. 40:2 - P. 216–227.
23. Brouns, S.J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. // *Science* - 2008 - V. 321 -P. 960–964
24. Cabrera J.C., G. Wégria , R.C.A. Onderwater , G. González , M.C. Nápoles, et al. Practical use of oligosaccharins in agriculture // *Proc. Ist 1 World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture Acta Hort.* 1009, ISHS, 2013
25. Čermák , T., Baltes, N. J., Cegan, R., Zhang, Y., and Voytas, D. F. High-frequency, precise modification of the tomato genome. // *Genome Biol.* - 2015. - V. 16 -P. 232.
26. Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., et al. Development of broad virus resistance in nontransgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology // *Mol. Plant Pathol.* - 2016. - V. 17 - P. 1140–1153.
27. Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., and Nekrasov, V. Boosting plant immunity with CRISPR/Cas // *Gen. Biol.* - 2015. - V. 16 - P. 254.
28. Chirkov, S. N. The Antiviral Activity of Chitosan (Review) // *Applied Biochemistry and Microbiology* - 2002. - V.38(1) - P. 1–8.
29. Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas derived RNA-guided endonucleases and nickases // *Genome Res.* - 2014. - V.

- 24 - P. 132–141.
30. Christou P., D.E. McCabe, W.F. Swain, Stable transformation of soybean callus by DNA-coated gold particles // *Plant Physiol.* - 1988. - V. 87 - P.671-674.
 31. Cody, W. B., and Scholthof, H. B. Plant virus vectors 3.0: Transitioning into synthetic genomics. // *Annu. Rev. Phytopathol.* - 2019. - V. 57 - P. 211-230.
 32. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. // *Science* - 2013 - V. 339 - P. 819–823
 33. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. // *Science* - 2013. - V. 339 - P. 819-823.
 34. Cota-Arriola O. , M.O. Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández, J.M. Ezquerro-Braue and, M. Plascencia-Jatomea. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture // *J. Sci. Food Agric.* - 2013. - V. 93 - P. 1525-1536.
 35. Cox, D. B. T., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Franklin, B., Kellner, et al. RNA editing with CRISPR-Cas13. // *Science* - 2017. - V. 358 - P. 1019-1027.
 36. Danielsen S. , Kjell M. Vårum, and Bjørn T. Stokke Structural Analysis of Chitosan Mediated DNA Condensation by AFM: Influence of Chitosan Molecular Parameters. // *Biomacromolecules* - 2004. - V. 5(3) - P. 928-936
 37. Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. // *Nature* - 2011 - V. 471 - P. 602–607
 38. DeRosa M.C. , C. Monreal, M. Schnitzer, R. Walsh, and Y. Sultan Nanotechnology in fertilizers, // *Nat. Nanotechnol.* - 2010. - V. 5 - P. 91
 39. Deveau, H. et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. // *J. Bacteriol.* - 2008 - V. 190 - P. 1390–1400
 40. Doench J.G., Fusi N., Sullender M., Hegde M., Vaimberg E.W., Donovan K.F., Smith I., Tothova Z., Wilen C., Orchard R., Virgin H.W., Listgarten J., Root D.E. // *Nat. Biotechnol.* - 2016. - V. 34. - P. 184-191.
 41. Doench J.G., Hartenian E., Graham D.B., Tothova Z., Hegde M., Smith I., Sullender M., Ebert B.L., Xavier R.J., Root D.E. // *Nat. Biotechnol.* - 2014. - V. 32. - P. 1262-1267.
 42. Dominguez, A.A., Lim, W.A., and Qi, L.S. Beyond editing: repurposing CRISPR–Cas9 for precision genome regulation and interrogation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* - 2016.- V. 17 - P. 5.
 43. Doudna, J.A. and Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. // *Science* - 2014 - V. 346 - P. 1258096
 44. Duceppe N. ,M. Tabrizian Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and

- in vivo drug and gene delivery, // *Expert Opin. Drug Deliv.* - 2010. - V. 7:1191 - P. 1207.
45. East-Seletsky, A., O'Connell, M.R., Knight, S. C., Burstein, D., Cate, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. // *Nature* - 2016. - V. 538 - P. 270-273
 46. Estevan, J., Marena, A., Callot, C., Lacombe, S., Moretti, A., et al. Specific requirement for translation initiation factor 4E or its isoform drives plant host susceptibility to Tobacco etch virus, // *BMC Plant Biol.* - 2014. - V. 14 - P. 67.
 47. FAO, WFP, IFAD 2012 The state of food insecurity in the world 2012. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. FAO, Rome
 48. Garneau, J.E. et al. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. // *Nature* - 2010 - V. 468 - P. 67–71
 49. Gasiunas, G. and Siksnys, V. RNA-dependent DNA endo-nuclease Cas9 of the CRISPR system: Holy Grail of genome editing? // *Trends Microbiol.* - 2013 - V. 21 - P. 562–567
 50. Gasiunas, G. et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2012 - V. 109 - P. E2579–E2586
 51. Ghezraoui H., Piganeau M., Renouf B., et al. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. // *Mol. Cell* - 2014. - V. 55 - P. 829–842.
 52. Ghezraoui H., Piganeau M., Renouf B., et al. Chromosomal translocations in human cells are generated by canonical nonhomologous end-joining. // *Mol. Cell* - 2014. - V. 55 - P. 829–842.
 53. Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. // *Science* - 2017. - V. 356 - P. 438-442.
 54. Gornik K., M. Grzesik, B.R. Duda The effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress, // *J. Fruit Ornamental Plant Res.* - 2008. - V. 16 - P. 333-343.
 55. Green, J. C., Hu, J. S. Editing plants for virus resistance using CRISPR-Cas. // *Acta Virol.* - 2017. - V. 61 - P. 138-142.
 56. Groenen, P.M. et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. // *Mol. Microbiol.* - 1993 - V. 10 - P. 1057–1065
 57. Haft, D.H. et al. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in pro-karyotic genomes. // *PLoS Comput. Biol.* - 2005 - V. 1 - P. e60

58. Hale, C.R. et al. Essential features and rational design of CRISPR RNAs that function with the Cas RAMP module complex to cleave RNAs. // *Mol. Cell* - 2012 - V. 45 - P. 292–302
59. Hale, C.R. et al. RNA-Guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. // *Cell* - 2009 - V. 139 - P. 945–956
60. Harper, G., Osuji, J. O., Heslop-Harrison, J. S., and Hull, R. Integration of banana streak badnavirus into the Musa genome: Molecular and cytogenetic evidence. // *Virology* - 1999. - V. 255 - P. 207-213.
61. Hendel A., Bak R.O., Clark T.J., Kennedy A.B., et al. Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. // *Nat. Biotechnol.* - 2015. - V. 33 - P. 985–989.
62. Hermans, P.W. et al. Insertion element IS987 from Myco-bacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains. // *Infect. Immun.* - 1991 - V. 59 - P. 2695–2705
63. Hirano, H., Gootenberg, J.S., Horii, T., Abudayyeh, O.O., Kimura, M., et al. Structure and Engineering of Francisella novicida Cas9 // *Cell* - 2016. - V. 164 - P. 950-961.
64. Horvath, P. and Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. // *Science* - 2010 - V. 327 - P. 167–170
65. Horvath, P. et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus. // *J. Bacteriol.* - 2008 - V. 190 - P. 1401–1412
66. Hsu, P.D. et al. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. // *Cell* - 2014 - V. 157 - P. 1262–1278
67. Il'ina A.V., Varlamov V.P. CHITOSAN-BASED POLYELECTROLYTE COMPLEXES: A REVIEW // *Applied Biochemistry and Microbiology.* - 2005. - V. 41:1. - P. 5-11.
68. Ishino, Y. et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. // *J. Bacteriol.* - 1987 - V. 169 - P. 5429–5433
69. Jansen, R. et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. // *Mol. Microbiol.* - 2002 - V. 43 - P. 1565–1575
70. Jeffreys, A.J. et al. Minisatellite repeat coding as a digital approach to DNA typing. // *Nature* - 1991 - V. 354 - P. 204–209
71. Ji, X., Zhang, H., Zhang, Y., Wang, Y., and Gao, C. Establishing a CRISPR-Cas-like immune system conferring DNA virus resistance in plants. // *Nat. Plants* - 2015. - V. 1 -P. 15144.
72. Jiang, F., Doudna, J. A. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. // *Annu. Rev. Biophys.* - 2017. - V. 46 - P. 505-529.

73. Jiang, W. et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. // Nat Biotechnol. - 2013- V. 31 - P. 233–239
74. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. // Science - 2012 - V. 337 - P. 816–821
75. Jinek, M. et al. RNA-programmed genome editing in human cells. // Elife - 2013 - V. 2 - P. e00471
76. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. // Science - 2012. - V. 337 - P. 816-821.
77. Jones, H.D. Regulatory uncertainty over genome editing, / Nat. Plants - 2015. - V. 1 -P. 14011.
78. Joung, J.K. et al. Accelerating research through reagent repositories: the genome editing example. // Genome Biol. - 2015 - V. 16 - P. 255
79. Kanchiswamy, C. N. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement, // Plant Cell Rep. - 2016. - V. 35 -P. 1469-1474.
80. Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., Velasco, R., Kim, J. S., and Viola, R. Non-GMO genetically edited crop plants, // Trends Biotech. - 2015. - V. 33 - P. 489-491.
81. Katiyar D., A. Hemantaranjan , B. Singh, A.N. Bhanu, A future perspective in crop protection: Chitosan and its oligosaccharides, // Adv. Plants Agric. Res. - 2014. - V. 1 -P. 00006.
82. Kaya, H., Ishibashi, K., and Toki, S. A split Staphylococcus aureus Cas9 as a compact genome-editing tool in plants. // Plant Cell Physiol. - 2017. - V. 58 -P. 643-649.
83. Khan, Z., Khan, S. H., Ahmad, A., Aslam, S., Mubarik, M. S., et al. CRISPR/dCas9-mediated inhibition of replication of begomoviruses. // Int. J. Agric. Biol. - 2019. - V. 21 - P. 711-718.
84. Kiang T. , J. Wen, H.W. Lim, K.W. Leong, The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection, // Biomaterials - 2004. - V. 25 - P. 5293–5301.
85. Kim, Y., Cheong, S.-A., Lee, J. G., Lee, S.-W., Lee, M. S., et al. Generation of knockout mice by Cpf1-mediated gene targeting. // Nat. Biotechnol. - 2016. - v. 34 - P. 808-810.
86. Kis, A., Hamar, E., Tholt, G., Ban, R., and Havelda, Z. Creating highly efficient resistance against wheat dwarf virus in barley by employing CRISPR/Cas9 system. // Plant Biotechnol. J. - 2019. - V. 17 -P. 1004-1006.
87. Koike-Yusa H., Li Y., Tan E.-P., et al. Genome-wide re-cessive genetic screening in mammalian cells with a len-tiviral CRISPR-guide RNA library. // Nat. Biotechnol. - 2014. -

V. 32 - P. 267–273.

88. Koonin, E.V., Makarova, K.S. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* - 2019 - V. 374 - P. 20180087
89. Koonin, E. V., Makarova, K. S., and Zhang, F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. // *Curr. Opin. Microbiol.* - 2017. - V. 37 -P. 67-78.
90. Köping-Höggård, M., Vårum, K., Issa, M. et al. Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers. // *Gene Ther* - 2004. - V. 11 - P. 1441–1452
91. Kosicki M., Tomberg K., and Bradley A. Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. // *Nat. Biotechnol.* - 2018. - V. 36 - P. 765–771
92. Lander, E.S. The Heroes of CRISPR. // *Cell* - 2016 - V. 164 - P. 18–28
93. Larson M.H., Gilbert L.A., Wang X., Lim W.A., Weissman J.S., Qi L.S. // *Nat. Protoc.* - 2013. - V. 8. - P. 2180-2196.
94. Li, Y., Peng, N. Endogenous CRISPR-Cas System-based genome editing and antimicrobials: Review and prospects. // *Front Microbiol.* - 2019 - V. 10 - P. 2471
95. Liang, G., Zhang, H., Lou, D., and Yu, D. Selection of highly efficient sgRNAs for CRISPR/Cas9-based plant genome editing, // *Sci. Rep.* - 2016. - V. 6 - P. 21451.
96. Lillestøl, R.K. et al. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. // *Archaea* - 2006 - V. 2 - P. 59–72
97. Liu, H., Soyats, C. L., Li, J., Fei, Q., He, G., et al. CRISPR/Cas9-mediated resistance to cauliflower mosaic virus. // *Plant Direct* - 2018. - V. 2 - P. e00047.
98. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method, // *Methods* - 2001. - V. 25 - P. 402-408
99. Love A.J., Yu C., Petukhova N.V., Kalinina N.O., Chen J., Taliansky M.E. Cajal bodies and their role in plant stress and disease responses // *RNA Biol.* - 2016. - V.11. - P.1-12.
100. Ma, H., Tu, L.-C., Naseri, A., Huisman, M., Zhang, S., et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. // *Nat. Biotechnol.* - 2016. - V. 34 - P. 528-530.
101. Mahdavi B., A. Rahimi, Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress, // *Eurasia J. Biosci.* - 2013. - V. 7 - P. 69-76.
102. Makarov, V., Rakitina, D., Protopopova, A., Yaminsky, I., Arutiunian, A., Love, A.J., Taliansky, M., and Kalinina, Plant Coilin: Structural Characteristics and RNA-Binding Properties // *N., PLoS One* - 2013. - V. 8:1 - P. e53571.

103. Makarova, K.S. et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. // *Biology Direct* - 2006 - V. 1 - P. 7
104. Makarova, K.S. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2015 - V. 13 - P. 722–736
105. Makarova, K.S. et al. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2011 - V. 9 - P. 467–477
106. Makarova, S. S., Khromov, A. V., Spechenkova, N. A., Taliansky, M. E., and Kalinina, N. O. . Application of the CRISPR/Cas system for generation of pathogen resistant plants. // *Biochemistry (Moscow)* - 2018. - V. 83 - P. 1552-1562.
107. Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. // *Science* - 2013 - V. 339 - P. 823–826
108. Mao S. , W. Sun and T. Kissel, Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA, // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2010. - V. 62 - P. 12–27.
109. Marraffini, L.A. and Sontheimer, E.J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. // *Science* - 2008 - V. 322 - P. 1843–1845
110. Marraffini, L.A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. // *Nature* - 2015 - V. 526 - P. 55–61
111. Martin O.S., J.S. Valenstein, V.S.Y Lin, B.G. Trewyn, K. Wang, Gold functionalized mesoporous silica nanoparticle mediated protein and DNA codelivery to plant cells via the biolistic method, // *Adv. Funct. Mater.* - 2012. - V. 22 -P. 3576–3582.
112. Martin-Ortigosa, S., Peterson, D. J., Valenstein, J. S., Lin, V. S., Trewyn, B. G., Lyznik, L. A., and Wang, K. Mesoporous silica nanoparticle mediated intracellular Cre protein delivery for maize genome editing via loxP sites excision, // *Plant Phys.*, - 2014. - V. 164 - P. 537-547
113. Mehta, D., Sturchler, A., Anjanappa, R. B., Zaidi, S. S., Hirsch-Hoffmann, at al . Linking CRISPR-Cas9 interference in cassava to the evolution of editing-resistant geminiviruses. // *Genome Biol.* - 2019. - V. 20 -P. 80.
114. Mohanta, T.K., Bashir, T., Hashem, A., Abd-Allah, E.F., and Bae, H. Genome editing tools in plants, // *Genes* - 2017. - V. 8 - P. 399.
115. Mojica, F.J. et al. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. // *Mol. Microbiol.* - 2000 - V. 36 = P. 244–246
116. Mojica, F.J. et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. // *J. Mol. Evol.* - 2005 - V. 60 - P. 174–182

117. Mojica, F.J. et al. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. // *Mol. Microbiol.* - 1995 - P. 17 - V. 85–93
118. Mojica, F.J. et al. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. // *Microbiology* - 2009 - V. 155 - P. 733–740
119. Mojica, F.J. et al. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. // *Mol. Microbiol.* - 1993 - P. 9 - P. 613–621
120. Nakata, A. et al. Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. // *J. Bacteriol.* - 1989 - V. 171 - P. 3553–3556
121. No H. K., S.P. Meyers, P.W. Rinyawiwatkul, Z. Xu, Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: a review. // *J. Food Sci.* - 2007. - V. 72 - P. 87-100.
122. Packer, H. CRISPR guide RNA format affects genome editing outcomes. // - 2016 - <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/crispr-guide-rna-format-affects-genome-editing-outcomes>
123. Palukaitis, P. Resistance to viruses of potato and their vectors, // *Plant Pathol.* - 2012. - V. 28:248–258.
124. Palukaitis, P., Groen, S.C., and Carr, J.P. The Rumsfeld paradox: some of the things we know that we don't know about plant virus infection, // *Curr. Opin. Plant Biol.* - 2013. - V. 16 -P. 513–519.
125. Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity, // *Nat. Biotech.* - 2013. - V. 31 - P. 839–843.
126. Pourcel, C. et al. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. // *Micro-biology* - 2005 - V. 151 - P. 653–663
127. Price, A. A., Sampson, T. R., Ratner, H. K., Grakoui, A., and Weiss, D. S. Cas9-mediated targeting of viral RNA in eukaryotic cells. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2015. - V. 112 - P. 6164-6169.
128. Pyott, D.E., Sheehan, E., and Molnar, A. Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free *Arabidopsis* plants, // *Mol. Plant Pathol.* - 2016. - V. 17 - P. 1276–1288.
129. Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. // *Cell* - 2013. - V. 154 - P. 1380-1389.

130. Ran, Y., Liang, Z., and Gao, C. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. // *Sci. China Life Sci.* - 2017. - V. 60 - P. 490-505
131. Reddy, D.V.R., Sudarshana, M.R., Fuchs, M., Rao, N.C., and Thottappilly, G. Genetically engineered virus(resistant plants in developing countries: current status and future prospects, // *Adv. Virus Res.* - 2009. - V. 75 -P. 185–220.
132. Reis, A. et. al. CRISPR/Cas9 & Targeted Genome Editing: New Era in Molecular Biology. // *N NEB expressions Issue I* - 2014
133. Robaglia, C., Caranta, C. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection, // *Trends Plant Sci.* - 2006. - V. 11 - P. 40–45.
134. Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C.R., Grenha, A., Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery, // *J. Funct. Biomater.* - 2012. - V. 3 - P. 615-641.
135. Ruan S.L., Q.Z. Xue Effects of chitosan coating on seed germination and salt-tolerance of seedlings in hybrid rice (*Oryza sativa* L.), // *Acta. Agronomica Sinica* = (2002. - V. 28 - P. 803-808.
136. SailajaA.K. , P. Amareshwar, P. Chakravarty, Chitosan nanoparticles as a drug delivery system, // *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* - 2013. - V. 1 - P. 474-484.
137. Sander, J.D. and Joung, J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. // *Nat. Biotechnol.* - 2014 - V. 32 - P. 347–355
138. Selle, K. and Barrangou, R. Harnessing CRISPR-Cas systems for bacterial genome editing. // *Trends Microbiol.* - 2015 - V. 23 - P. 225–232
139. Sharp R. G. A Review of the applications of chitin and its derivatives in agriculture to modify plant-microbial interactions and improve crop yields, // *Agronomy* - 2013. - V. 3 - P. 757-793.
140. Shaw J, Love A.J., Makarova S.S., Kalinina N.O., Harrison B.D., Talianky M.E. Coilin, the signature protein of Cajal bodies, differentially modulates the interactions of plants with viruses in widely different taxa// *Nucleus* - 2014. - V. 5. - P. 85-94.
141. Shen, B. et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting. // *Cell Res.* - 2013 - V. 23 - P. 720–723
142. Shen, B., Zhang, W., Zhang, J. et al. Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. // *Nat Methods* - 2014. - V. 11 - P. 399–402
143. Shin H.Y., Wang Ch., Lee H.K., et al. CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. // *Nat. Commun.*, - 2017. - V. 8 - P. 15464.
144. Shukla S.K., A.K. Mishra, O.A. Arotiba, B.B. Mamba Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review, // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2013. - V. 59 - P. 46-58.

145. Sinha V.R., A.K. Singla, S. Wadhawan, R. Kaushik, R. Kumria, et al., Chitosan as a potential carrier for drugs, // *Int. J. Pharm.* - 2004. - V. 274 - P. 1-33
146. Sonia T.A., C.P. Sharma Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective, // *Adv. Polym. Sci.* - 2011. - V. 243 - P. 23–54.
147. Sprink, T., Eriksson, D., Schiemann, J., and Hartung, F. Regulatory hurdles for genome editing: process vs. product-based approaches in different regulatory contexts, // *Plant Cell Rep.* - 2016. - V. 35 - P. 1493–1506.
148. Standage-Beier K., Qi Zhang, and Xiao Wang Targeted Large-Scale Deletion of Bacterial Genomes Using CRISPR-Nickases // *ACS Synthetic Biology* - 2015. - V. 4:11 - P. 1217-1225
149. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., and Doudna, J. A. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. // *Nature* - 2014. - V. 507 - P. 62-67.
150. Sudarshana, M.R., Roy, G., and Falk, B.W. Methods for engineering resistance to plant viruses, // *Plant Path. Inter. Methods Mol. Biol.* - 2007. - V. 354 - P. 183–195.
151. Suh J.K.F., H.W.T. Matthew Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review // *Biomaterials* - 2000. - V. 21 - P. 2589–2598.
152. Svitashhev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J. K., and Cigan, A. M. Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. // *Nat. Commun.* - 2016. - V. 7 - P. 13274.
153. Tan E.P., Li Y., Velasco-Herrera M.D.C., Yusa K., et al. Off-target assessment of CRISPR-Cas9 guiding RNAs in human iPS and mouse ES cells. // *Genesis* - 2015. - V. 53 - P. 225–236.
154. Tang, T.H. et al. Identification of 86 candidates for small non-messenger RNAs from the archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2002 - V. 99 - P. 7536–7541
155. Tang, Y., Fu, Y. Class 2 CRISPR/Cas: An expanding biotechnology toolbox for and beyond genome editing. // *Cell Biosci.* - 2018. - V. 8 - P. 59.
156. Tashkandi, M., Ali, Z., Aljedaani, F., Shami, A., and Mahfouz, M. M. Engineering resistance against Tomato yellow leaf curl virus via the CRISPR/Cas9 system in tomato. // *Plant Signal. Behav.* - 2018. - V. 13 - P. e1525996.
157. Tian S., Jiang L., Gao Q., Zhang J., Zong M., Zhang H., Ren Y., Guo S., Gong G., Liu F., Xu Y. Efficient CRISPR/Cas9-based gene knockout in watermelon // *Plant Cell Rep.* - 2017. - V. 36. - P. 399-406.
158. Tiyaaboonchai W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery, // *Naresuan*

- Univ. J. - 2003. - V. 11 - P. 51-66.
159. Toyota, C.G., Davis, M.D., Cosman, A.M., and Hebert, M.D., // *Chromosoma* - 2010. - V. 119 - P. 205– 215.
 160. Tripathi, J. N., Ntui, V. O., Ron, M., Muiruri, S. K., Britt, A.i, L. CRISPR/Cas9 editing of endogenous Banana streak virus in the B genome of *Musa* spp. overcomes a major challenge in banana breeding. // *Commun. Biol.* - 2019. - V. 2 - P. 46.
 161. van der Oost, J. et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2014 - V. 12 - P. 479–492
 162. van Overbeek M., Capurso D., Thompson M., et al. DNA repair profiling reveals nonrandom outcomes at Cas9- mediated breaks. // *Mol. Cell.* - 2016. - V. 63 - P. 633–646.
 163. Wang M., Y. Chen, R. Zhang, W. Wang, et al. Effects of chitosan oligosaccharides on the yield components and production quality of different wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) in Northwest China, // *Field Crops Res.* - 2015. - V. 172 - P. 11–20
 164. Wang, H. et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. // *Cell* - 2013 - V. 153 - P. 910–918
 165. Weeks, D.P., Spalding, M.H., and Yang, B. Use of designer nucleases for targeted gene and genome editing in plants, // *Plant Biotech.* - 2016. - V. 14 - P. 483–495.
 166. Wolter, F., Puchta, H. The CRISPR/Cas revolution reaches the RNA world: Cas13, a new Swiss Army knife for plant biologists. // *Plant J.* - 2018. - V. 94 - P. 767-775.
 167. Woo, J. W., Kim, J., Kwon, S. I., Corvalan, C., Cho, S. W., Kim, H., Kim, S. G., Kim, S. T., Choe, S., and Kim, J. S. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins, // *Nat. Biotech.* - 2015. - V. 3 - P. 1162-1164.
 168. Xing K., X. Zhu, X. Peng, S. Qin, (2014). Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review, *Agron. Sustain. Dev.* 35:569–588
 169. Xu, H., Pillai, R.S., Azzouz, T.N., Shpargel, K.B., Kambach, C., Hebert, M.D., Schumperli, D., and Matera, A.G., *Chromosoma*, 2005, vol. 114, pp. 155– 166.
 170. Yang, H. et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. // *Cell* - 2013 - V. 154 - P. 1370–1379
 171. Yin, K., Han, T., Xie, K., Zhao, J., Song, J., et al. (2019). Engineer complete resistance to Cotton leaf curl Multan virus by the CRISPR/Cas9 system in *Nicotiana benthamiana*. *Phytopathol. Res.* 1:9.
 172. Zaidi, S. S., Mansoor, S. (2017). Viral vectors for plant genome engineering. *Front. Plant Sci.* 8:539.
 173. Zaidi, S.S.E.A., Mansoor, S., Ali, Z., Tashkandi, M., and Mahfouz, M. M. (2016) Engineering plants for geminivirus resistance with CRISPR/Cas9 system, *Trends Plant Sci.*,

21, 279–281.

174. Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., et al. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163:759-771.
175. Zhang H., X. Zhao, J. Yang, H. Yin, W. Wang, et al. (2011). Nitric oxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitooligosaccharide. *Plant Cell Rep.* 30:1153-62.
176. Zhang, T., Zhao, Y., Ye, J., Cao, X., Xu, C., et al. (2019). Establishing CRISP/Cas13a immune system conferring RNA virus resistance in both dicot and monocot plants. *Plant Biotechnol. J.* 17:1185-1187.
177. Zhang, T., Zheng, Q., Yi, X., An, H., Zhao, Y., et al. (2018). Establishing RNA virus resistance in plants by harnessing CRISPR immune system. *Plant Biotechnol. J.* 16:1415-1423.