

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)**

**Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение Фе-
дерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)**

На правах рукописи

ХУСНУТДИНОВ ЭМИЛЬ АЙДАРОВИЧ

**НОКАУТ ГЕНОВ НЕГАТИВНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА АНТО-
ЦИАНОВ В РАСТЕНИЯХ СЕМЕЙСТВА КАПУСТНЫХ С ИСПОЛЬЗОВА-
НИЕМ ТЕХНОЛОГИИ CRISPR/CAS9**

06.06.01 Биологические науки

1.5.3. – Молекулярная биология

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа 2025

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики – обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук

Научный руководитель:

Михайлова Елена Владимировна
кандидат биологических наук, доцент

Рецензенты:

Якупова Альфира Буребайевна
кандидат биологических наук, доцент

Мусин Халит Галеевич
кандидат биологических наук

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность: Антоцианы — это группа водорастворимых растительных пигментов, образующихся по фенилпропаноидному пути. Они присутствуют в различных тканях высших растений, включая листья, стебли, корни, цветы и плоды, и обуславливают характерные красные, фиолетовые и синие оттенки, тем самым участвуя в процессе опыления и распространения семян. Также, антоциановые пигменты связаны с защитными свойствами растений от различных видов абиотического и биотического стресса, и обладают высокой лекарственной и пищевой ценностью, что привлекает внимание научного сообщества и вызывает интерес со стороны сельского хозяйства и фармацевтической индустрии. Кроме того, антоциановая окраска может быть использована в качестве репортера в области генной инженерии, и геномного редактирования. Для оценки эффективности разрабатываемых молекулярно-биологических инструментов, таких как усовершенствованные варианты системы CRISPR/Cas целесообразно использование генов, характеризующихся выраженными фенотипическими признаками. Изменение антоциановой пигментации легко определяется невооруженным глазом, и является альтернативой нокауту гена фитоен десатуразы (*PDS*), приводящему к депигментации растительных тканей (Wada et al., 2015).

Arabidopsis thaliana L. - широко распространенное в молекулярной биологии модельное растение с небольшим и хорошо изученным геномом, подходящее для исследования функций генов антоцианового биосинтеза. Это растение относится к семейству *Brassicaceae* (Капустные), которое включает в себя экономически важные виды и сельскохозяйственные культуры, распространенные по всему миру, такие как *Brassica oleracea* L., *Brassica napus* L., *Brassica juncea* L., *Brassica nigra* L., *Brassica carinata* и *Brassica rapa* L, химический состав и полезные свойства которых хорошо задокументированы (De Zoysa et al., 2021; Li et al., 2021; Jan et al., 2018; Rahman et al., 2018; Tian et al., 2020; Chmielewska et al., 2021). Высокая значимость для сельского хозяйства, а также сходство генома с арабидопсисом делает растения семейства Капустных перспективными объектами исследования в области регуляции биосинтеза антоцианов.

Метаболические пути и молекулярно-генетические механизмы, вовлеченные в биосинтез антоцианов, хорошо изучены, и в высокой степени консервативны. Однако регуляция экспрессии структурных генов биосинтеза антоцианов транскрипционными факторами достаточно сложна и может иметь свои особенности у разных видов растений.

Экспрессия структурных генов биосинтеза антоцианов регулируется транскрипционными факторами MYB, bHLH и WD40, которые образуют комплекс MBW, куда могут включаться либо положительные, либо негативные регуляторы семейства MYB, определяя его функции. Белки MYB могут также напрямую связываться с соответствующими мотивами в промоторах структурных генов, что делает этой семейство транскрипционных факторов важнейшим звеном фенилпропаноидного пути. Ключевой ген биосинтеза антоцианов *DFR*, кодирующий дигидрофлавонолредуктазу, контролируется множеством факторов транскрипции. На сегодняшний день известны положительные факторы транскрипции, PAP1 (AN2), PAP2, TT8, TTG1, MYB2 и Delila. Среди факторов транскрипции, подавляющих экспрессию гена *DFR*, известны GLABRA2, NAT1, CPC, MYBL2, MYB1 и MYB57 (Maskon et al., 2021). Тогда как технология создания трансгенных растений, сверхэкспрессирующих структурные гены и положительные регуляторы биосинтеза антоцианов, уже внесла существенный вклад в исследования этого метаболического пути, геномное редактирование позволит экспериментально подтвердить функции негативных регуляторов биосинтеза антоцианов путем нокаута соответствующих генов. Предполагается, что путем подавления активности негативных регуляторных факторов транскрипции возможно индуцировать накопление антоцианов и повысить устойчивость к неблагоприятным условиям среды. Несмотря на то, что проверенный временем традиционный подход к селекции внес заметный вклад в развитие устойчивости к стрессу и улучшению полезных признаков у сельскохозяйственных культур, для прицельной корректировки хозяйственно-ценных признаков в наиболее короткие сроки и с минимальной вероятностью появления побочных эффектов, требуется применение методов молекулярной биологии (Hussain et al., 2021).

Показано, что у *A thaliana* гены *AtMYB60* (Zhao et al., 2017), *CAPRICE* (*CPC*) (Zhu et al., 2009) и *AtMYBL2* (Matsui et al., 2008) подавляют накопление антоцианов. Однако гены *AtMYB60* и *AtMYBL2* никогда не подвергались редактированию, а у растений с нокаутом гена *CPC* исследовалось только наличие трихом. Функции гомологов данных генов у других видов семейства

Brassicaceae на данный момент недостаточно изучены. Исследование негативной регуляции биосинтеза антоцианов характеризуется существенной научной новизной и практической значимостью. Нокаут генов с использованием системы CRISPR/Cas представляет собой эффективный способ исследования функций данных транскрипционных факторов.

Инструменты редактирования генома позволяют вносить точные изменения в ДНК организма путем введения однонуклеотидных полиморфизмов, инсерций, делеций и других изменений с использованием нуклеаз. В последние годы были разработаны и использованы для редактирования генома мегануклеазы (Puchta et al., 1993), нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALENs) (Zhang et al., 2013), нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFNs) (Zhang et al., 2010) и система CRISPR/Cas (Jiang et al., 2013). Было продемонстрировано, что система CRISPR/Cas9 является наиболее успешной системой редактирования генома для широкого спектра организмов, включая растения (Chen et al., 2019b). Для нацеливания нуклеазы Cas9 на определенный участок генома требуется только гидовая РНК (гРНК), которая представляет собой геном-специфическую последовательность длиной 18-20 п.н., и дополнительную ~ 80 п.н. последовательность, необходимую для формирования вторичной структуры и связывания с Cas9, в отличие от систем ZFNs и TALENs, где необходимо конструирование специфических нуклеаз (Cong et al., 2013). Кроме того, использование нескольких гРНК в генетической конструкции может привести к образованию крупных делеций, тем самым увеличивая вероятность выключения целевого гена.

На данный момент, система CRISPR/Cas9 применялась для редактирования геномов у многих видов растений, включая арабидопсис, рис, пшеницу, табак, кукурузу, картофель, томаты, подсолнечник и сою (Hussain et al., 2021). Редактирование генов с помощью системы CRISPR/Cas9 использовалось на более чем 20 видах сельскохозяйственных культур с целью повышения урожайности, и снижения влияния биотического и абиотического стресса (Hamdan et al., 2022). Кроме того, мультиплексирование на основе CRISPR/Cas9 путем нацеливания на несколько генов в одном организме также было успешно проведено в отношении ряда видов сельскохозяйственных культур, таких как пшеница (Wang et al., 2018), рис (Miao et al., 2013), хлопок (Gao et al., 2017) и кукуруза (Char et al., 2017). Таким образом, данная технология имеет огромный потенциал для получения растений с желаемыми признаками, устойчивых к разным видам стресса.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время, молекулярным основам положительной регуляции синтеза антоцианов в растениях *Brassica* уделяется большое внимание в научном сообществе, однако, функциям негативных регуляторов биосинтеза антоцианов посвящены лишь отдельные работы, в большинстве из которых, в качестве объекта исследования рассматривались модельные растения, такие как арабидопсис (Kleinstiver et al., 2015).

У модельного растения *A. thaliana* на данный момент известно несколько генов, негативно регулирующих биосинтез антоцианов. Это *MYB60* (Li et al., 2022; Park et al., 2008), *MYBL2* (Matsui et al., 2008; Ma et al., 2019; Richter et al., 2020; Sakai et al., 2019; Andrea et al., 2020), *CPC* (Colanero et al., 2018; Nakatsuka et al., 2013; Xie et al., 2022). Стоит отметить, что гомологичные гены у родственных видов растений изучены слабо, или не изучены вовсе. На данный момент, рядом групп авторов проведены комплексное исследование функции негативных регуляторов биосинтеза антоцианов *MYBL2* (Nakatsuka et al., 2013; Gates et al., 2018), *MYB60* (Ma et al., 2022), *CPC* (Zhang et al., 2009, Chen et al., 2019), однако работы по изучению зависимости между эффектом нокаутирования данных генов методом CRISPR/Cas9 и уровнем накопления антоцианов, а также экспрессией гена *DFR* не проводятся.

Цель исследования:

Осуществить редактирование генов негативных регуляторов биосинтеза антоцианов у растений семейства Капустных с помощью технологии CRISPR/Cas9 и оценить его влияние на пигментацию и экспрессию структурного гена *DFR*.

Задачи:

1. Выявить ключевые гены, выступающие в качестве негативных регуляторов биосинтеза антоцианов в растениях семейства Капустных и осуществить поиск их функциональных доменов.
2. Осуществить подбор гРНК к целевым функциональным доменам, и провести оценку их структуры.

3. Создать генно-инженерные конструкции для нокаута негативных регуляторов биосинтеза антоцианов с помощью технологии CRISPR/Cas9.
4. Провести агроинфильтрацию и агробактериальную трансформацию исследуемых растений.
5. Оценить эффективность проведенного нокаута целевых генов и стабильность наследования индуцированных мутаций.
6. Оценить влияние геномного редактирования на содержание антоцианов, экспрессию целевого гена и гена *DFR* в отредактированных растениях.

Научная новизна. В исследовательской работе впервые проводился поиск гомологов негативных регуляторов *CPC*, *MYB60*, *MYBL2* участвующих в биосинтезе антоцианов для растений *C. sativa*, *R. sativus*, *E. sativa*. Секвенированы последовательности негативного регулятора биосинтеза антоцианов *MYBL2* у отечественных сортов *B. napus*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *C. sativa*, *R. sativus*, *E. sativa*. Впервые обнаружена мутация в последовательности *MYBL2* всех проанализированных антоциановых сортов *B. oleracea* в начале ДНК-связывающего домена. Методом погружения цветков получены растения *B. napus*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *B. juncea*, *R. sativus*, *E. sativa*, *A. thaliana* с отредактированными генами *MYBL2*, *MYB60*, *CPC*. Исследована зависимость между эффектом нокаутирования генов *MYBL2*, *MYB60*, *CPC* и уровнем накопления антоцианов, а также экспрессией гена *DFR*.

Положения, выносимые на защиту.

1. Два SNP в гене *MYBL2* у антоциановых сортов *B. oleracea*, приводят к замене двух аминокислот (KESN на KKNN - AAAGAAAGCAAC на AAAAAAAAAACAAC) и возникновению одонуклеотидного повтора (A)₈, что характеризуется повышением экспрессии гена *DFR* и содержания антоцианов. У антоциановых сортов *B. napus* и *B. juncea* заметного влияния экспрессии гена *MYBL2* на накопление антоцианов не наблюдалось. Кроме того, у *B. juncea*, *B. napus* и *B. rapa*, не было выявлено значимых мутаций в этом гене, которые могут быть связаны с гиперпигментацией.
2. Делеция в гене *MYBL2* размером 207 п.н. у *A. thaliana* приводит к снижению экспрессии целевого гена в среднем в 2 раза, повышению уровня экспрессии гена *DFR* в 4,7 раза и уровня содержания антоцианов в 3,8 раза по сравнению с контрольными растениями.
3. Делеция в гене *CPC* размером 662 п.н. у *A. thaliana* приводит к снижению экспрессии целевого гена в среднем в 1,5 раза, повышению уровня экспрессии гена *DFR* в 3,1 раза и уровня содержания антоцианов в 5,2 раза по сравнению с контрольными растениями.
4. Делеция в гене *MYB60* размером 974 п.н. у *A. thaliana* приводит к снижению экспрессии целевого гена в среднем в 1,5 раза, повышению уровня экспрессии гена *DFR* в 2,1 раза и уровня содержания антоцианов в 7 раз по сравнению с контрольными растениями.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе исследовательской работы данные о влиянии нокаута генов *MYBL2*, *MYB60*, *CPC* на содержание антоцианов и экспрессию гена *DFR* могут эффективно применяться в дальнейшем для получения хозяйственно-полезных растений с высоким содержанием антоцианов, а также выведения декоративных сортов растений с необычной пигментацией. Идентификация целевых генов, ответственных за видимый фенотипический эффект, будет способствовать разработке стратегий безтрансгенного редактирования. Гены биосинтеза флавоноидов являются перспективными мишенями, поскольку накопление антоцианов видно невооруженным глазом. Гены *MYBL2*, *MYB60*, *CPC* могут использоваться в качестве репортеров наряду с геном *PDS*, нокаут которого приводит к депигментации растительных тканей. Получены данные об отсутствии зависимости в пигментации *B. juncea* и *B. napus* от последовательности и уровня экспрессии гена *MYBL2*. По всей видимости, экспрессия гена *DFR* у этих видов регулируется иначе, что свидетельствует о неуниверсальности этого метаболического пути внутри семейства Капустных. Таким образом, данная работа является важным вкладом в понимание молекулярных механизмов регуляции биосинтеза антоцианов и демонстрирует потенциал технологий CRISPR/Cas9 для развития агроиндустрии и создания стрессоустойчивых сортов растений и сельскохозяйственных культур. Кроме того, полученные результаты могут быть использованы в учебно-исследовательской работе по изучению молекулярно-генетических механизмов регуляции биосинтеза антоцианов при чтении курсов по молекулярной биологии растений.

Апробация работы. Материалы научной квалификационной работы были представлены на II международной научно-практической конференции «Современные подходы и методы в защите растений» (Екатеринбург, 2020), на III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021), на 6-й международной научной конференции «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений» PlantGen2021 (Новосибирск, 2021), на 45-й виртуальной (онлайн) конференции FEBS (Любляна, Словения, 2021), на международной научно-практической конференции «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений» ГенБио2022 (Ялта, 2022), на III Международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2022 (Санкт-Петербург, 2022), на X съезде общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» (Уфа, 2023).

Степень достоверности результатов проведенных исследований. Достоверность полученных в ходе исследования результатов обеспечивается применением современных методов молекулярной биологии, биотехнологии и генетики растений, соответствующего оборудования, а также достаточной выборкой и большим объемом проведенной работы. Для интерпретации и анализа полученных результатов привлечено достаточное количество данных литературы. Выводы объективно и полноценно отражают результаты проведенных исследований. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов.

Конкурсная поддержка. Данная работа проводилась при финансовой поддержке гранта РНФ (20-74-10053) - "Исследование регуляции биосинтеза антоцианов в растениях семейства Капустных с использованием технологии геномного редактирования" (2020-2023).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 работ, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Благодарности. Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. Е.В. Михайловой за формулирование основной идеи работы, постановку цели и задач исследования и помощь при подготовке публикаций и текста диссертации, всему педагогическому составу за поддержку, помощь и вдохновение на протяжении всего образовательного пути, а также ЦКП Агидель за техническую поддержку экспериментальной части исследовательской работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследования. В качестве объекта исследования использовались растения семейства Капустных (*Brassicaceae*) следующих видов: *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. juncea*, *R. sativus*, *B. napus*, *E. sativa*, *C. sativa*, *B. nigra*, *A. thaliana*. Семена высевали в естественных условиях на опытном участке и в лабораторных условиях (в сосуды, наполненные коммерческим грунтом (Geolia, Россия)). В лаборатории растения выращивали при температуре 20°C, освещенности 10000 люкс и фотопериоде дня и ночи 16:8, генерируемом светодиодным освещением.

Методы исследования. Прямые векторы с одной гРНК были собраны на основе плазмиды pDIRECT_23A методом Golden Gate согласно Cermak et al. (2017). Для сборки модульных генетических конструкции, олигонуклеотиды гРНК, нацеленные на целевые гены (*CPC*, *MYB60*, *MYBL2*), были клонированы в плазмиду B2103, которая впоследствии была объединена с плазмидами pTRANS_230/pTRANS_231, A0508/A0503 и C3003 в конечный вектор CRISPR/Cas с помощью реакции Golden Gate, согласно Cermak et al. (2017).

Для клонирования плазмид методом химической трансформации использовались следующие штаммы *Escherichia coli* - XL-blue, Dh10b, cddb, а для агроинфильтрации и трансформации растений генетические конструкции внедряли в *Agrobacterium tumefaciens* штамма Ag10 методом электропорации. Для выделения геномной ДНК применялся метод с использованием Chelex100. Выделение плазмидной ДНК производилось с помощью набора GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific, США). Для агробактериальной трансформации опытных растений применялся метод погружения цветков (floral dip). Полученные отредактированные растения обрабатывались глюфофинатом для селективного отбора.

Для поиска растений с отредактированным геном использовались методы выделения суммарной РНК с использованием реагента «Ли́ра», ЦТАБ-метод для выделения геномной ДНК,

методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), синтеза кДНК с использованием набора OT-M-MuLV-RH («Биолабмикс», Россия), аналитического электрофореза ДНК в агарозном геле, рестрикционного анализа, секвенирования ДНК по Сэнгеру на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью набора для циклического секвенирования BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher, США). Общее содержание антоцианов измеряли спектрофотометрическим методом дифференциального pH с использованием люминесцентного спектрометра Perkin Elmer LS 55 (Perkin Elmer, США) и выражали в эквивалентах цианидин-3-глюкозида.

Определение уровней экспрессии целевых генов количественную ПЦР (кПЦР) в реальном времени проводили на системе Quant studio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием смеси BioMaster HS-qPCR Lo-ROX SYBR (Биолабмикс, Россия).

Для всех экспериментов средние значения и стандартное отклонение ($p < 0,05$) сравнивались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), а коэффициент корреляции Пирсона рассчитывался с использованием LibreOffice.

Биоинформационный поиск генов-кандидатов проводили с использованием баз данных Brassica Database (<http://brassicadb.cn/>), NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Ортологи генов-мишеней *MYB60*, *CPC* и *MYBL2* и их консервативные домены были найдены с использованием каталога OrthoDB (<https://www.orthodb.org/>) и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), а также на ресурсе InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Последовательности мРНК выбранных генов, а также полногеномные последовательности выравнивались в программе MEGA 10.1.8 и SnapGene 7.1.1. Поиск возможных целевых последовательностей гРНК был осуществлён с использованием программного обеспечения CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>), структура РНК, оценивалась в программе RNA-fold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>). Дизайн праймеров для гРНК был выполнен согласно статье Cermak et al. (2017).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация целевых генов и ДНК-связывающих доменов для редактирования

Путем анализа литературы и баз данных по теме исследования, были подобраны несколько генов-мишеней, которые принимают участие в биосинтезе и регуляции антоцианов в растениях семейства Капустных - *MYB60*, *CPC*, *MYBL2*. Негативные регуляторы *CPC* и *MYBL2* представляют собой одноповторные транскрипционные факторы R3 MYB с одним доменом связывания, при этом *CPC* не содержит мотива репрессии на С-конце, а *MYBL2* содержит часть домена R2 и репрессивный мотив TLLFR. R3-MYB, конкурируя с положительными регуляторами биосинтеза антоцианов за сайты связывания bHLH, образует, таким образом, репрессорный комплекс MBW, тем самым снижая экспрессию структурных генов *DFR*, *LDOX*, *CHS*, *CHI*, *F3'H* и *F3H* в арабидопсисе, томате, петунии, табаке и тополе. (Xie et al., 2022; Ma et al., 2019).

MYB60 относится к R2R3-MYB транскрипционным факторам, и включает в себя два ДНК-связывающих домена. N-концевой домен MYB необходим для связывания ДНК, тогда как С-концевой домен участвует в регуляторной активности белка. MYB60 подавляет биосинтез антоцианов в салате, арабидопсисе и винограде, напрямую связываясь с цис-элементами промоторов структурных генов, ассоциированных с флавоноидами, в частности *DFR* (Ma et al., 2022; Li et al., 2022).

Поиск ортологов целевых генов осуществлялся у различных видов растений Капустных, геном которых был секвенирован: *A. thaliana*, *C. sativa*, *B. juncea*, *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus*, *R. sativus*, *B. nigra*, *E. sativa*. Особое внимание уделялось копияности генов, поскольку у большинства растений семейства Капустных целевые гены чаще всего имели несколько копий.

Основные структурные гены биосинтеза антоцианов являются универсальными для большинства видов растений, где ген *DFR* считается основной мишенью транскрипционных факторов, регулирующих биосинтез антоцианов. Кроме того, согласно анализу литературных данных, в геноме большинства растений семейства Капустных, имеется лишь одна копия гена *DFR*.

Было проведено исследование 43 зеленых и антоциановых отечественных сортов различных видов Капустных: *B. oleracea*, *B. napus*, *B. juncea* и *B. rapa*. Согласно полученным результатам,

содержание антоцианов колебалось от 6 до 411 мг/100 г сухого веса, коэффициент корреляции с уровнем экспрессии гена *DFR* в среднем составил 0,83.

Антоциановая окраска у растений *B. oleracea* была напрямую связана с экспрессией гена *DFR*. Антоциановые сорта одного и того же сорта производили больше мРНК гена *DFR* по сравнению с зелеными, однако между сортами наблюдалась большая разница. Несмотря на то, что между антоциановыми сортами кольраби (Рисунок 1 - 20-22) и зелеными сортами кочанной капусты были отчетливые фенотипические различия, экспрессия гена *DFR* существенно не отличалась. Было обнаружено, что в некоторых сортах кочанной и брюссельской капусты (Рисунок 1 - 2, 3, 8) экспрессия гена *DFR* была на уровне референсного гена (70-90%), однако в кольраби и цветной капусте это значение составляло всего 20-30%.

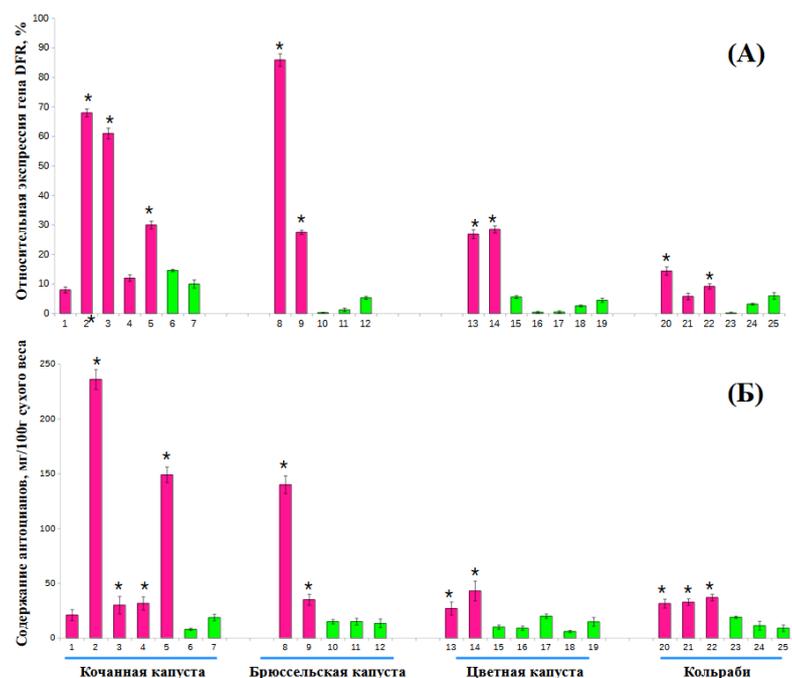


Рисунок 1. Уровень экспрессии гена *DFR* (А) и содержание антоцианов (Б) в фиолетовых и зеленых сортах *B. oleracea*. Сорта: 1-Калибос; 2-Людмила; 3-Рубин; 4-Марс; 5-Жар-птица; 6-Роял Вантаж; 7-Московская поздняя; 8-Гранатовый браслет; 9-Виноградная гроздь; 10-Розелла; 11-Геркулес; 12-Сноуболл; 13-Мечта огородника; 14-Лиловый шар; 15-Птичье молоко; 16-Бэби; 17-Флейм стар; 18-Зеленая гроздь; 19-Альфа; 20-Мадонна; 21-Фиолетта; 22-Венская голубая; 23-Венская белая; 24-Гулливер; 25-Пикант. Сорта, заявленные производителем как фиолетовые, выделены розовым цветом.

Среди всех исследованных видов *Brassica*, у *B. rapa* были наиболее пигментированные семядоли. Кроме того, растения *B. rapa* продуцировали больше мРНК гена *DFR*, чем референсный ген (Рисунок 2 - 38-40). Растения *B. napus* с антоциановыми корнеплодами имели зеленые листья с низкой экспрессией гена *DFR* (Рисунок 2 - 33, 34). Согласно информации производителя семян, *B. juncea* сорта «Веснушка» накапливает большое количество антоциановых соединений (Рисунок 2 - 28), однако какой-либо отчетливой пигментации листьев у растений этого сорта не наблюдалось, а уровень экспрессии гена *DFR* относительно остальных сортов был низким, но при этом выше, чем у зеленых сортов.

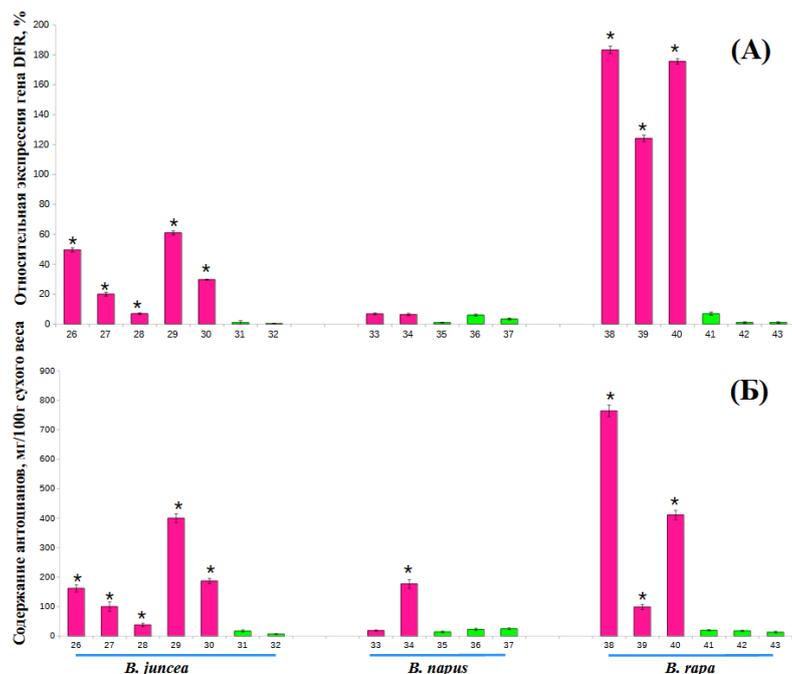


Рисунок 2. Уровень экспрессии гена *DFR* (А) и содержание антоцианов (Б) в фиолетовых и зеленых сортах, *B. juncea*, *B. napus* и *B. rapa*. Сорта: 26-Витамин; 27-Красный бархат; 28-Веснушка; 29-Чудеса в решетке; 30-Красный вельвет; 31-Красный гигант; 32-Ядреная; 33-Красносельская; 34-Гера; 35-Новгородская; 36-Детская любовь; 37-Вежа; 38-Русалочка рубиновая; 39-Мизуна красная; 40-Мизуна ред; 41-Импульс; 42-Русалочка; 43-Мизуна зеленая. Сорта, заявленные как фиолетовые, выделены розовым цветом.

В результате секвенирования выбранных генов-мишеней (*MYB60*, *CPC* и *MYBL2*), была обнаружена мутация в гене *MYBL2*, которая в свою очередь приводила к повышению экспрессии гена *DFR*, и как следствие более высокому уровню содержания антоцианов. В последовательности гена *MYBL2* всех исследованных антоциановых сортов *B. oleracea* было обнаружено два новых SNP, которые повлияли на начало ДНК-связывающего домена, а именно привели к замене двух аминокислот (KESN на KQSN - AAAGAAAGCAAC на AAAAAAACAAC) и возникновению однонуклеотидного повтора (A)₈, тем самым внося изменения во вторичную структуру РНК, что могло нарушить процесс трансляции нативного белка (Рисунок 3). Присутствие одинаковой мутации во всех исследованных антоциановых сортах капусты (кочанной, кольраби, брюссельской и т. д.) свидетельствует о том, что она непосредственно связана с уровнем содержания антоцианов. При этом каких-либо значимых мутаций в гене *MYBL2* у проанализированных антоциановых сортов *B. juncea*, *B. napus* и *B. rapa* найдено не было, учитывая те, которые уже были описаны ранее (Xie et al., 2016; Zhu et al., 2009). Таким образом, можно сделать вывод, что экспрессия гена *DFR* у этих видов может регулироваться по-другому.

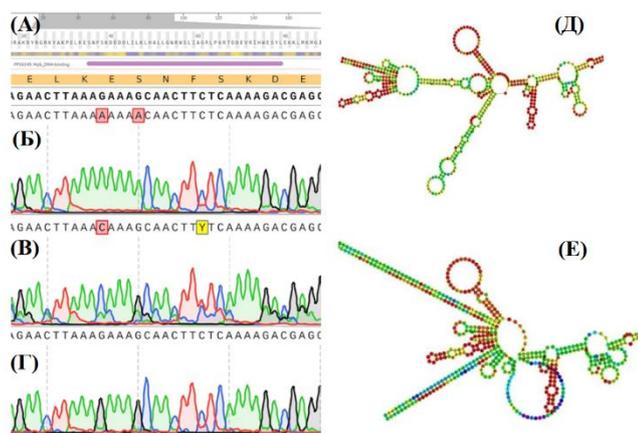


Рисунок 3. Локализация ДНК-связывающего домена в гене *MYBL2* (А) и последовательность начала этого домена у сортов *B. oleracea* - Мечта огородника (Б), "Гулливер" (В) и *B. juncea* сорта Ядреный. Часть предсказанной структуры РНК нормального (Д) и мутантного (Е) гена *MYBL2*.

У зеленых сортов *B. oleracea* был также выявлен один новый SNP, приводящий по сравнению с геном *MYBL2* *B. rapa* к изменению аминокислоты (GAA на САА – KESN на KQSN), однако это происходило за пределами ДНК-связывающего домена. У растений *B. juncea*, *B. napus* и *B. rapa* каких-либо значимых мутаций обнаружено не было. Таким образом, ген *MYBL2* у растений семейства Капустных различных видов оказался достаточно консервативным. Следует отметить, что у зеленых сортов капусты часто наблюдались гетерозиготные мутации, тогда как у антоциановых

сортов они встречались редко. Были обнаружены и другие различия между сортами, однако маловероятно, что они напрямую связаны с антоциановой пигментацией.

Секвенирование генов *MYB60* и *CPC* показало большое количество мутаций как в интронах, так и в экзонах, ни одна из которых не была общей для антоциановых сортов, из чего следует что только нарушение функциональных доменов данных генов позволит более точно определить их функции в регулировании процесса синтеза антоцианов. Таким способом можно исключить возможность сохранения активности мутантных форм белков.

Подбор целевых гРНК и обзор генетических конструкций, задействованных в работе

Существует обоснованная необходимость уделять особое внимание структуре гРНК, в связи с тем, что она несет непосредственную ответственность за формирование комплекса с нуклеазой Cas. Для нокаута негативных регуляторов биосинтеза антоцианов *CPC*, *MYB60* и *MYBL2*, спейсеры гРНК подбирались к наиболее функциональным и консервативным участкам всех имеющихся копий генов.

В результате, для редактирования целевого гена *MYBL2* в растениях семейства Капустных было выбрано 5 гРНК, которым были присвоены номера – 223, 302, 307, 369 и 556. Спейсеры были подобраны таким образом, что на каждую копию гена в растениях *B. rapa*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. nigra*, *R. sativus* приходилось не менее 2 гРНК. Отдельно для геномного редактирования *A. thaliana* было подобрано 3 гРНК (228, 369, 426) (Рисунок 4).

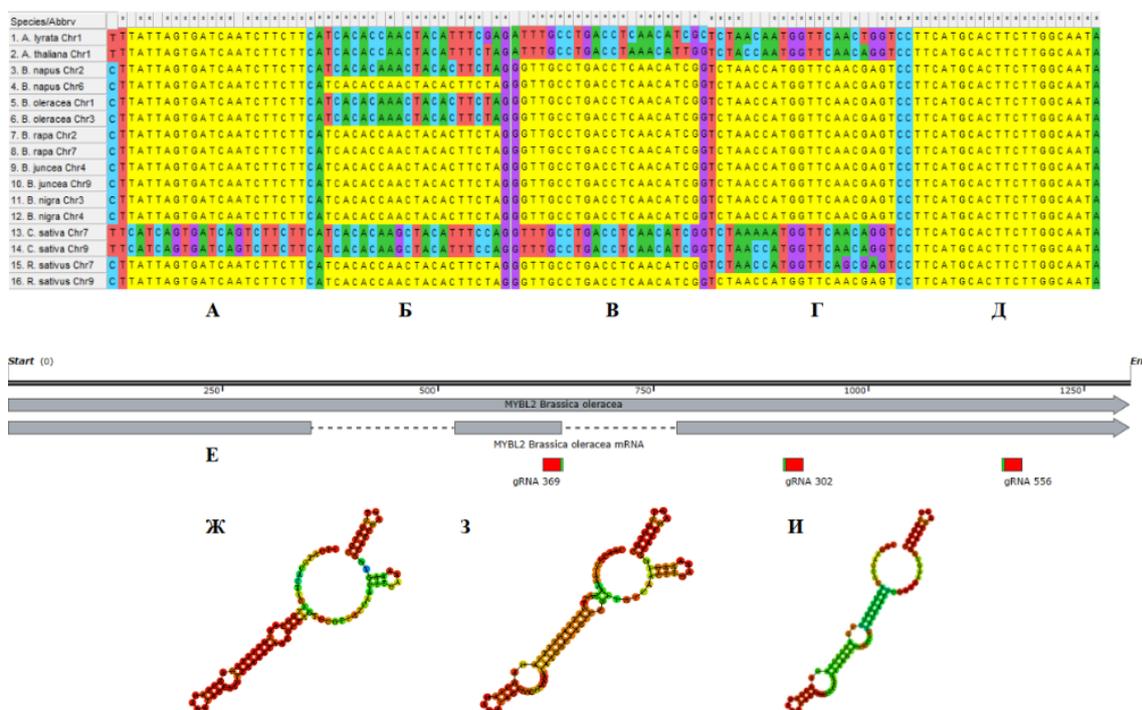


Рисунок 4. Выравнивание подобранных спейсеров гРНК относительно гена *MYBL2* разных видов растений *Brassica*: А-223, Б-302; В-307; Г-369, Д-556. Расположение гРНК на последовательности гена *MYBL2* *A. thaliana* (Е). Структура гРНК 223 (З), 302 (И), 369 (Ж), предсказанная с помощью веб-инструмента RNAfold.

С целью инактивации гена *MYB60* было подобрано 5 гРНК - 13, 13new, 214, 221 и 785. Для более эффективного редактирования гена, и обеспечения точности модификации и снижения риска нежелательных мутаций, на каждую копию гена в *B. rapa*, *B. oleracea*, *B. napus*, *B. nigra*, *B. juncea* приходилось не менее 2 гидовых РНК. Только для вида *B. juncea* на две копии гена *MYB60* приходилась одна гРНК. Для редактирования гена *MYB60* в растениях *A. thaliana* было отдельно подобрано 3 гРНК (3, 785, 954) (Рисунок 5).

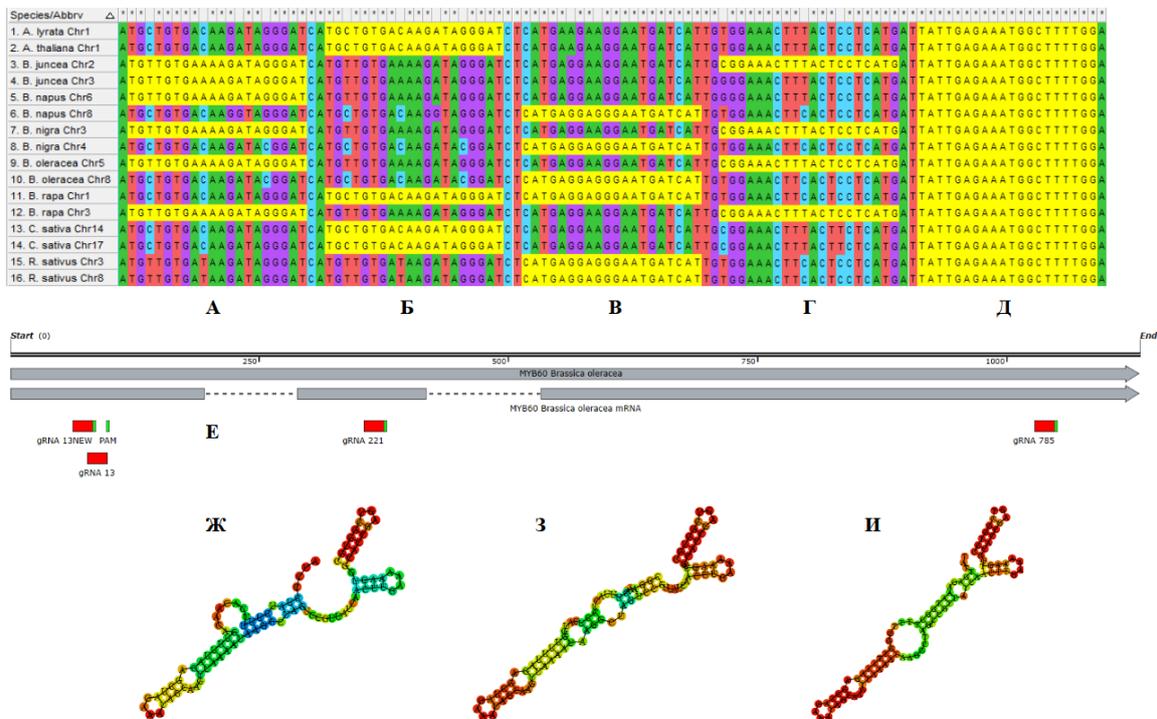


Рисунок 5. Выравнивание подобранных спейсеров гРНК относительно гена *MYB60* разных видов растений *Brassica*: А-13, Б-13new; В-214; Г-221, Д-785. Расположение гРНК на последовательности гена *MYB60 A. thaliana* (Е). Структура гРНК 13 (Ж), 221 (З), 785 (И), предсказанная с помощью веб-инструмента RNAfold.

Всего для нокаута гена *CPC* было подобрано 6 гРНК (3, 4, 315new, 322, 350, и 355), так, чтобы на каждую копию целевого гена в *B. rapa*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. napus*, приходилось не менее 2 гРНК. При этом, конструкция подходила для нокаута только двух копий гена *CPC* у видов *R. sativus* и *B. nigra*. Также, для трансформации растений *A. thaliana* было отдельно подобрано 2 гРНК (270 и 331) (Рисунок 6).

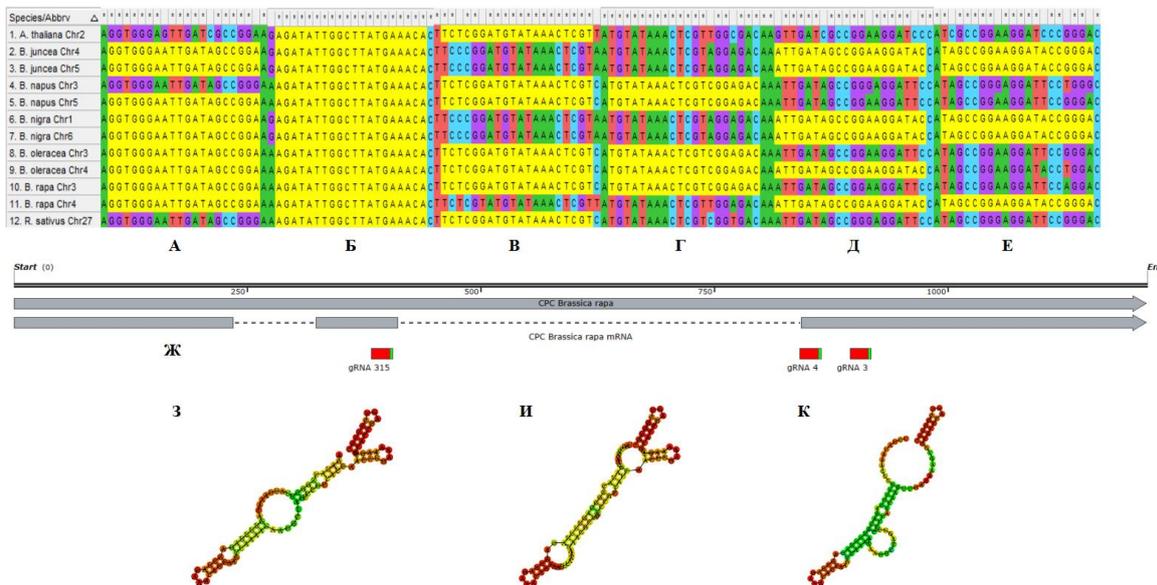


Рисунок 6. Выравнивание подобранных спейсеров гРНК относительно гена *CPC* разных видов растений *Brassica*: А-3, Б-4; В-315new; Г-322, Д-350; Е-355. Расположение гРНК на последовательности гена *CPC* (Ж). Структура гРНК 4 (З), 4 (И), 322 (К), предсказанная с помощью веб-инструмента RNAfold.

Для достижения поставленных целей исследовательской работы, были разработаны четыре типа генетических конструкций для редактирования целевых генов:

1. Конструкция на основе вектора pDIRECT_23A, которая содержала ген *bar* для устойчивости к глюфосинату, одну гРНК, под управлением промотора AtU6 и кассету CmYLCV:Cas9.
2. Модульная конструкция, pTRANS_230+pMOD_A0508+pMOD_B2103+pMOD_C3003, которая содержала ген устойчивости к глюфосинату *bar*, несколько гРНК полицистронно экспрессируемых под управлением промотора CmYLCV, и кассету Ec1.2:Cas9.
3. Модульная конструкция, pTRANS_231+pMOD_A0508+pMOD_B2103+pMOD_C3003, на основе репликона геминивируса, которая включала в себя ген устойчивости к глюфосинату *bar*, несколько гРНК, полицистронно экспрессируемых под управлением промотора CmYLCV, и кассету Ec1.2:Cas9.
4. Модульная конструкция, pTRANS_231+pMOD_A0503+pMOD_B2103+pMOD_C3003, на основе репликона геминивируса, которая включала в себя ген устойчивости к глюфосинату *bar*, несколько гРНК, полицистронно экспрессируемых под управлением промотора CmYLCV, и кассету CmYLCV:Cas9

Модульные конструкции содержали все подобранные гРНК. Единичные гРНК, способные редактировать все копии гена, использовали также в конструкциях на основе вектора для прямого клонирования pDIRECT_23A. Стоит отметить, что спейсеры гРНК MYBL2(3), MYB60(3), CPC(3) не полностью подходили для редактирования *A. thaliana*, имея отличие в 1 нуклеotide, поэтому использовались для этого вида в качестве отрицательного контроля, тогда как спейсеры гРНК MYB60(4) и CPC(4) подходили для всех исследуемых видов.

Для выключения целевых генов в растениях рода *Brassica* (*B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus*, *B. juncea*, *B. nigra*, *E. sativa*, *C. sativa*, *A. thaliana*), было использовано 5 прямых генно-инженерных конструкций, в которые была проклонирована единственная гРНК, а именно - 23A-60MYB(3), 23A-60MYB(4), 23A-CPC(3), 23A-CPC(4) и 23A-MYBL2(3).

Также было использовано 9 модульных генно-инженерных конструкций с несколькими гРНК - 03-31-60MYB, 08-31-60MYB, 08-30-60MYB, 03-31-MYBL2, 08-31-MYBL2, 08-30-MYBL2, 03-31-CPC, 08-31-CPC, 08-30-CPC.

Оценка эффективности разработанных генетических конструкций с помощью метода агроинфильтрации.

Для оценки эффективности, векторы с единственной гРНК были клонированы в *A. tumefaciens*. штамма Ag10 и использовались для транзientной экспрессии методом агроинфильтрации листьев *B. napus*, путем введения рабочей суспензии с бактериями под нижний эпидермис листа с помощью инсулинового шприца, в том числе с дополнительным поранением иглой. Появление антоцианового окрашивания вокруг мест инъекций свидетельствовало об успешной экспрессии генетических конструкций транзientном редактировании тканей растений рапса.

Агроинфильтрация растений рапса конструкциями 23A-CPC(4) и 23A-60MYB(4) приводила к появлению антоциановой пигментации в местах введения генетических конструкций. После обработки листьев рапса генетическими конструкциями 23A-MYBL2(3) и 23A-CPC(3) в большинстве случаев наблюдалось антоциановое окрашивание, которое возникало сначала в местах инъекций, а в некоторых случаях распространялась на весь лист. Наиболее интенсивная антоциановая пигментация наблюдалась в области жилок листьев. При агроинфильтрации листьев конструкцией 23A-60MYB(3), а также контрольной суспензией, наблюдалось локальное пожелтение листьев в местах инфильтрации, и в ряде случаев последующий некроз обработанных тканей листа.

Для других видов Капустных (*B. rapa*, *B. juncea*, *R. sativus*, *A. thaliana*) протокол агроинфильтрации оптимизировать не удалось.

Редактирование гена *MYBL2* у растений семейства Капустных

Растения *A. thaliana* были трансформированы генетическими конструкциями с единственной гРНК, подобранный к гену *MYBL2* методом погружения цветков, в результате было получено 200 семян. После селективной обработки глюфосинатом выжило 2 растения, обработанных конструкцией 23А-*MYBL2*(3), которые по внешнему виду не отличались от контроля. Стоит отметить, что спейсер гРНК 23А-*MYBL2*(3) не полностью подходил для редактирования *A. thaliana*, так как имелось отличие в 1 нуклеотиде, что могло препятствовать редактированию.

Результаты трансформации других видов Капустных показали низкую эффективность редактирования. Растений с видимыми фенотипическими отличиями от контроля, а также выживших после обработок глюфосинатом обнаружено не было.

Одновременное редактирование множества копий генов целесообразно для аллотетраплоидов, например, таких как *B. napus*. Кроме того, это дает возможность гарантированно деактивировать МУВ домен, и индуцировать делецию, которую можно будет визуализировать на гель-электрофореze.

Растения семейства Капустных были трансформированы генетическими конструкциями 08-30-*MYBL2* с 5 гРНК, нацеленными на наиболее функциональные и консервативные участки целевого гена *MYBL2*. В этих конструкциях ген *Cas9* находился под контролем промотора ЕС1.2, специфичного для яйцеклеток, что должно способствовать снижению доли мозаичных растений. Успешное редактирование должно было привести к делеции доменов МУВ и потере транскрипционным фактором репрессорных функций. После трансформации методом погружения цветков было посажено около 14,9 тыс. семян *A. thaliana*, 2 тыс. семян каждого из видов *B. rapa*, *B. juncea*, *B. napus*, 300 семян *R. sativus*, *C. sativa* и *B. nigra* и 100 семян *E. sativa* и *B. oleracea* (самый малопродуктивный вид, двухлетник).

Всхожесть семян *A. thaliana* составила 61.7%. К обработкам глюфосинатом проявили устойчивость 1.2% проростков. Результаты ПЦР показали, что у 73,7% растений устойчивых к глюфосинату, присутствовал ген *Cas*. ПЦР-анализ на целевой ген *MYBL2* выявил делецию только у 4 растений, которая визуализировалась в виде дополнительной полосы меньшего размера на гель-электрофореze. При этом у них сохранялась также неотредактированная аллель (Рисунок 7В).

Полученный амплификат элюировали и анализировали относительно гена *MYBL2* контрольного растения методом секвенирования по Сэнгеру. Было показано, что только у 2 растений *A. thaliana* линий №6 и №26, трансформированных конструкцией 08-30-*AtMYBL2*, имелась делеция размером 207 п.н. между гРНК 228 и 426 в трех нуклеотидах от РАМ. гРНК 22, скорее всего, оказалась неэффективной, так как ПЦР-продуктов с делецией более 207 п.н. обнаружено не было (Рисунок 7А и 7Б).

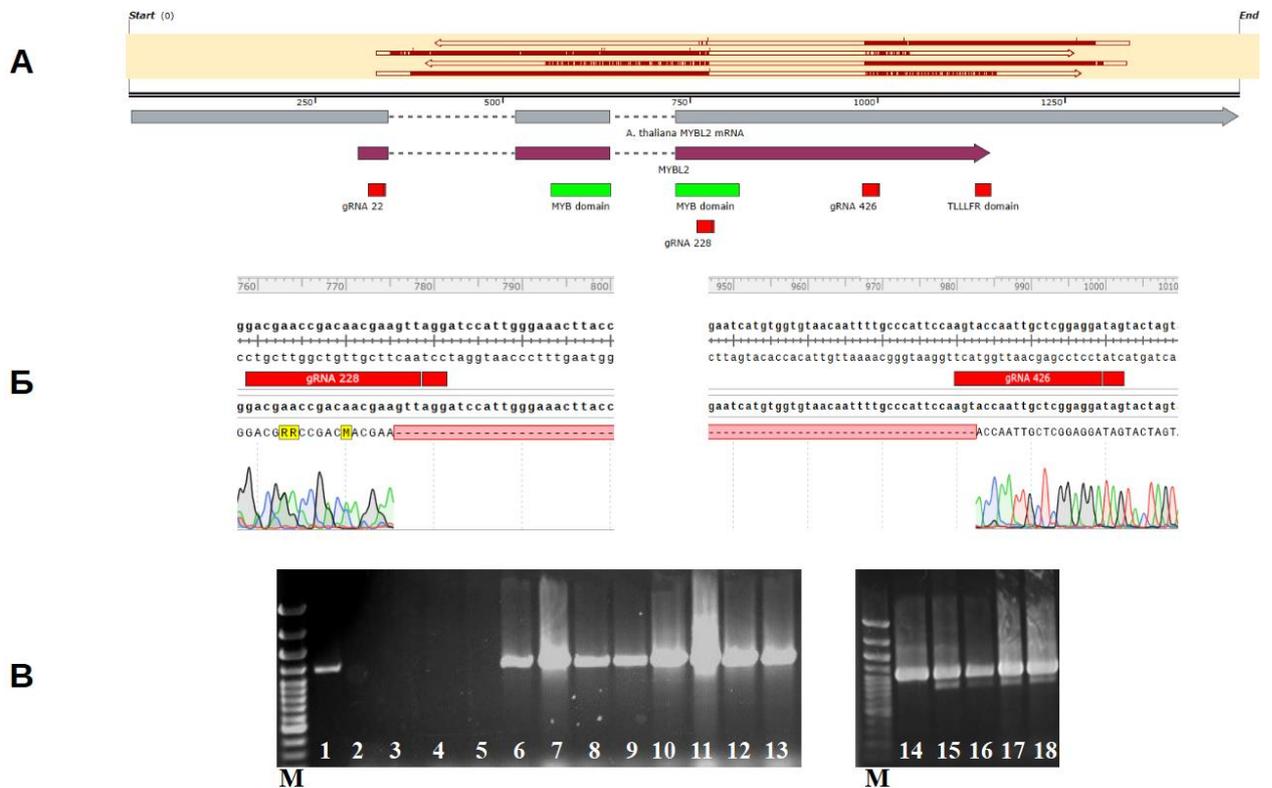


Рисунок 7. Локализация гРНК, домена MYB и вызванного редактированием делеции на карте гена *MYBL2* (A). Хроматограмма расположения CRISPR/Cas-индуцированной мутации в гене *MYBL2* (Б). Результаты ПЦР-анализа контрольных (1 - положительный контроль, 2 - отрицательный контроль, 3-5, 14 контрольные растения) и модифицированных растений на ген *Cas* (6-13) (~ 1218 п.н.) и *MYBL2* (15-18) (~ 961 п.н.) (М - ДНК-маркер Step100Long, Biolabmix, Россия) (В).

Отредактированные растения *A. thaliana* линии 08-30-AtMYBL2 № 6 имели насыщенную пигментацию по сравнению с контрольными растениями. Тогда как растения линии № 26 имели антоциановую окраску преимущественно на абаксиальной стороне листьев.

Согласно результатам оценки уровня экспрессии регуляторных и структурных генов флавоноидов методом кПЦР, средний уровень транскрипционной активности гена *MYBL2* у растений отредактированных конструкцией 08-30-AtMYBL2 линии №26, был снижен приблизительно в 2 раза ($6,5 \pm 2,2\%$) по сравнению с контрольными образцами, у которых этот показатель составил $13,2 \pm 1,8\%$, при этом показатели экспрессии целевого гена в растениях четвертого поколения (F4) достоверно не отличались от контроля и составили – $11,9 \pm 1,4\%$ у линии №6 и $12,7 \pm 2,5\%$ у линии №26 (Рисунок 8А).

Средний уровень экспрессии гена *DFR* у мутантной линии 08-30-AtMYBL2 №26 первого поколения (F1) - составил $45,1 \pm 12,0\%$, что в 4,8 раза выше, чем у контрольных образцов ($9,4 \pm 0,8\%$). У растений четвертого поколения, линии №6 и №26 средний уровень транскрипционной активности был в 3,8 раза выше по сравнению с контролем ($35,6 \pm 14,0\%$ и $36,0 \pm 15,0\%$). Таким образом, эффект редактирования целевого гена ослабевал в ряду поколений (Рисунок 8Б).

Результаты исследования содержания антоцианов в растениях с отредактированным геном *MYBL2* показали, что по сравнению с контролем ($1,25 \pm 0,25$ мг/100г сухой массы), во всех анализируемых линиях растений наблюдалось значительное повышение уровня содержания антоцианов, 08-30-AtMYBL2 №26-F1 – в 3,8 раза ($4,8 \pm 1,5$ мг/100г сухой массы), у растений четвертого поколения, линии №6 – в 2,7 раз ($3,4 \pm 1,0$ мг/100г сухой массы), и №26 – 3,1 раза ($3,9 \pm 1,1$ мг/100г сухой массы) (Рисунок 8В).

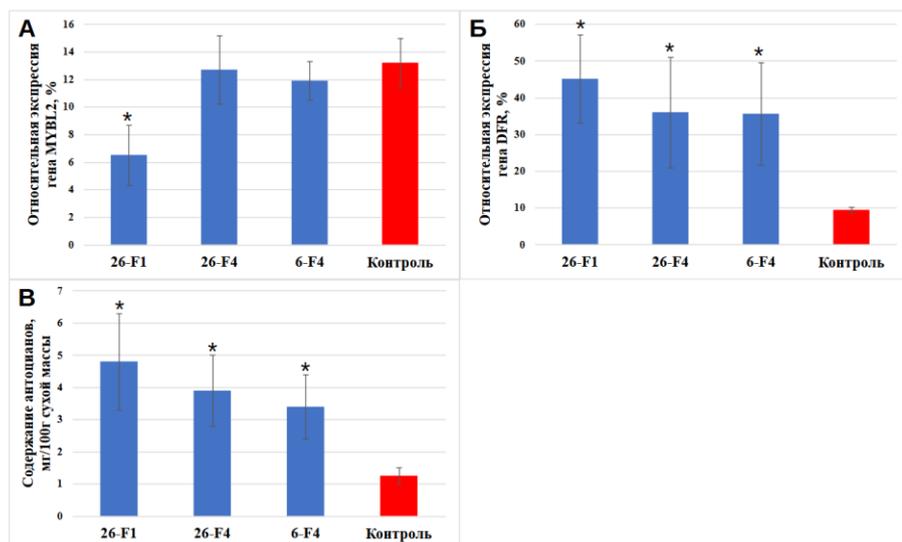


Рисунок 8. Уровень экспрессии гена *MYBL2* (А) и *DFR* (Б), содержание антоцианов (В) в отредактированных растениях *A. thaliana*. Звездочка (*) указывает на существенное отличие от контрольных растений.

В результате трансформации других видов Капустных генетическими конструкциями 08-30-MYBL2 были получены 32 растения *B. juncea*, 41 растение *R. sativus*, 36 растений *B. napus*, 4 растения *B. nigra*, 7 растений *B. rapa*, 1 растение *B. oleracea*, устойчивые к обработкам глюфосинатом.

Большая часть трансформированных растений не отличалась от контроля, кроме 1 растения у видов *B. napus* и *B. juncea*, которые характеризовались повышенным накоплением антоцианов. Также, у большей части растений, которые оказались устойчивы к воздействию глюфосинатом ген *Cas* обнаружен не был. ПЦР-положительными были только 4 растения *B. rapa*, 3 растения *R. sativus*, 3 растения *B. juncea*. При секвенировании ПЦР-продукта в некоторых случаях наблюдались неидентифицируемые мутации в районе трех нуклеотидов от РАМ, но эффекты редактирования не наследовались, что может свидетельствовать о мозаицизме.

Растения, отредактированные с помощью генетических конструкций на основе транзитивно экспрессирующегося геминивирусного вектора (03-31) отбирались согласно соответствию визуальным критериям, так как ген устойчивости к глюфосинату в геном растений не встраивался, что осложняло процесс селективного отбора. Ввиду наличия в использованных конструкциях нескольких гРНК, ожидалось получение крупных делеций в целевом сайте редактирования, которые будут визуально наблюдаться в геле при электрофорезе амплификатов.

В процессе визуального скрининга при отборе трансформированных растений внимание уделялось не только наличию антоциановой пигментации, но количеству и длине трихом, и другим фенотипическим отличиям, поскольку изучаемые транскрипционные факторы могут быть задействованы в различных биологических процессах.

Растений, которые визуально отличались от контроля, было около 1%, что свидетельствует о низкой эффективности проведенного редактирования. В результате для дальнейших исследований были отобраны следующие растения:

- *B. juncea* 03-31-MYBL2 - 11 растений, одно из которых отличалось практически полным отсутствием трихом, два растения имели антоциановую пигментацию и аномальное количество семян, остальные растения отличались небольшой антоциановой пигментацией;
- *B. rapa* 03-31-MYBL2 - 5 растений, одно из которых отличалось отсутствием трихом, у остальных отредактированных растений наблюдалась антоциановая окраска стебля;
- *B. napus* 03-31-AtMYBL2 - 9 растений которые выделялись антоциановой пигментацией стебля (у одного из растений также наблюдалась антоциановая окраска листьев);
- *R. sativus* 03-31-AtMYBL2 - 1 растение с антоциановой окраской стебля;

Отобранные растения, были проанализированы посредством рестрикционного анализа (в зоне протоспейсера присутствовал сайт рестрикции НРАII). В результате было обнаружено, что у двух исследованных растений рестрикция прошла неполностью, что может свидетельствовать о наличии мутаций, индуцированных системой CRISPR/Cas9. Эти растения, были просеквенированы

по Сэнгеру, и в одном из образцов были выявлены негомозиготные делеции между сайтами редактирования. По всей видимости, растения были мозаичными, или сработала только одна из гРНК. Таким образом, согласно полученным результатам, большая часть растений, отобранных по визуальным критериям, судя по всему, не была отредактированной, и имела антоциановую пигментацию по иным причинам (Рисунок 9).

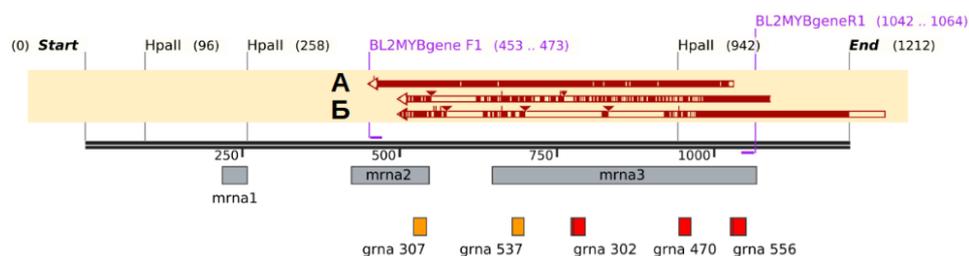


Рисунок 9. Расположение делеции в последовательности гена *MYBL2* в растениях *B. rapa*, трансформированных конструкцией 03-31-AtMYBL2 (А – сиквенс контрольного растения, Б - сиквенс трансформированных растений). Совпадения с референсом (NC_024801.2) отмечены коричневым цветом.

Редактирование гена *CPC* в растениях семейства Капустных

В результате трансформации растений *A. thaliana* генетическими конструкциями с единственной гРНК 23А-СРС(3) и 23А-СРС(4) методом погружения цветков было получено по 200 семян с каждой из использованных конструкций. К селективной обработке глүфосинатом оказалось устойчиво 2 растения 23А-СРС(3) с слабой антоциановой пигментацией и 1 растение, трансформированное 23А-СРС(4), которое визуально не отличалось от контроля. Стоит отметить, что антоциановая пигментация полученных отредактированных растений не сохранялась у следующих поколений, что свидетельствует о мозаичности. Поскольку спейсер гРНК СРС(4) имел отличие в 1 нуклеотид от целевого участка гена арабидопсиса, а спейсер СРС(3) полностью соответствовал последовательности гена *CPC* всех изучаемых видов растений, различия в антоциановой окраске между трансформированными растениями объяснимы.

Результаты секвенирования показали, что у двух растений *A. thaliana*, отредактированных генетической конструкцией 23А-СРС(3) была выявлена негомозиготная однонуклеотидная замена С на Т в области протоспейсера.

После трансформации других видов Капустных генетическими конструкциями 23А-СРС(3) и 23А-СРС(4), было получено 2 растения *B. juncea* с антоциановой окраской жилок листьев и стеблей. Однако по мере развития растений, пигментация распределялась неравномерно, что в свою очередь, может указывать на мозаичную природу полученных растений. Так же оба отредактированных растения имели меньшую длину стебля и большее количество трихом относительно контроля. Среди растений следующего поколения антоциановая пигментация не наблюдалась. Все полученные растения были устойчивы к обработкам глүфосинатом.

По результатам секвенирования была обнаружена однонуклеотидная замена у растений *B. juncea*, отредактированных генетической конструкцией 23А-СРС(4). Также сиквенс с форвард-прайма выравнивался с геном *CPC* только до конца первого экзона, что может быть связано наличием других мутаций во второй копии гена или мозаичностью. При этом происхождение невыравнивающегося сиквенса установить не удалось.

Для нокаута гена *CPC*, была проведена трансформация растений генетической конструкцией 08-30-СРС с 6 гРНК, нацеленными на функциональные домены МҮВ. По итогу трансформации было посажено около 25,5 тыс. семян *A. thaliana*, 1 тыс. семян каждого из видов *B. rapa*, *B. juncea*, *B. napus*, 400 семян *R. sativus* и *B. nigra* и по 100 семян *C. sativa*, *E. sativa* и *B. oleracea*.

Всхожесть семян *A. thaliana* составила 69,0%. В процессе селективного отбора, к обработкам глүфосинатом проявили устойчивость 1,65% трансформированных растений. Согласно результатам ПЦР-анализа, у 18% устойчивых к глүфосинату растений обнаружился ген *Cas*. ПЦР-анализ на целевой ген *CPC* позволил выявить у 4 растений ожидаемый продукт меньшего размера, но при этом, сохранялась также неотредактированная аллель (Рисунок 10В).

Полученный продукт элюировали и анализировали относительно контрольного гена *CPC* методом секвенирования по Сэнгеру. По результатам анализа, все четыре линии растений *A. thaliana*, № 5, 6, 43, и 44, у которых обнаруживался дополнительный ПЦР-продукт, имели делецию размером 662 п.н., между гРНК 270 и 3. Редактирование произошло в ожидаемом месте в трех нуклеотидах от РАМ (Рисунок 10А и 10Б).

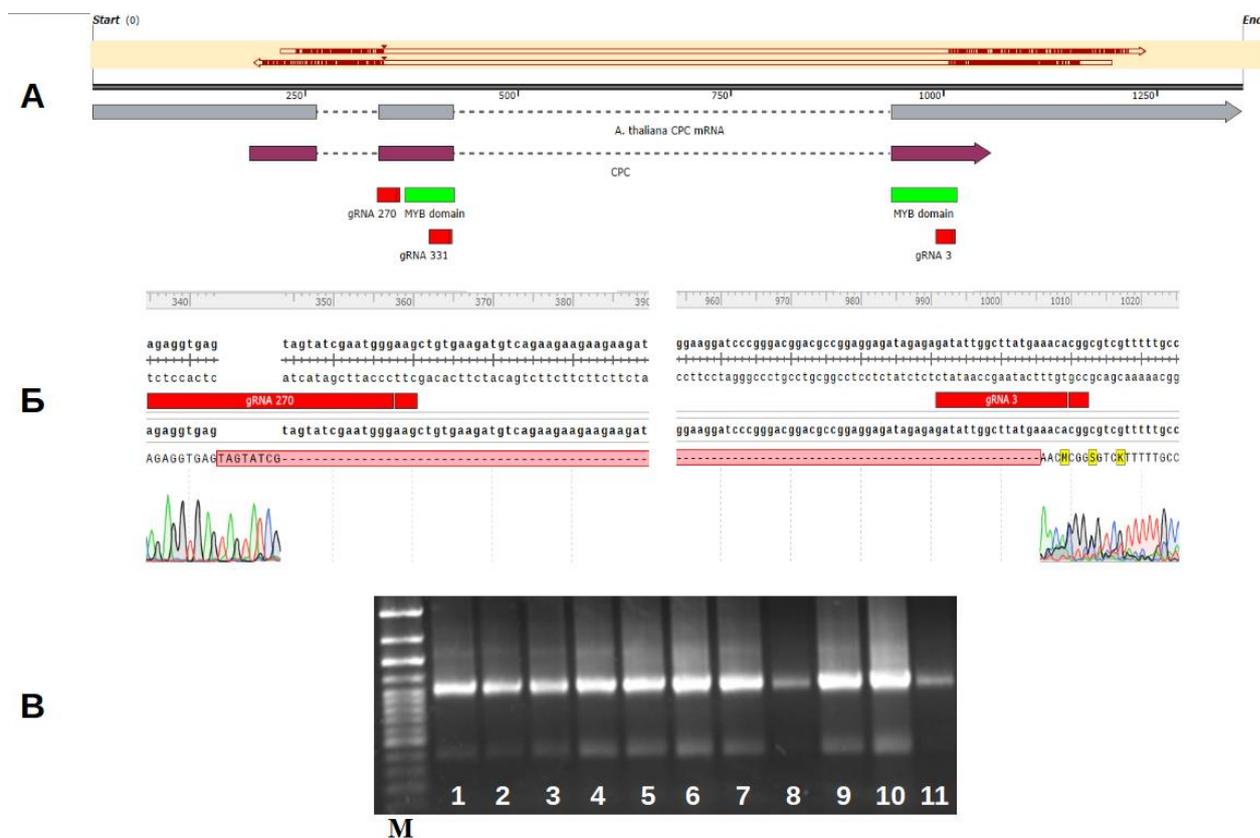


Рисунок 10. Локализация гРНК, домена MYB и индуцированной системой CRISPR/Cas делеции на карте гена *CPC* (А). Хроматограмма расположения участков мутации в последовательности гена *CPC* (Б). Результаты ПЦР-анализа контрольного (11) и отредактированных растений четвертого поколения на ген *CPC* (1-10) (~ 431 п.н.) (ДНК-маркер Step100Long, Biolabmix, Россия) (В).

У растений с отредактированным геном *CPC* антоциановая окраска наблюдалась в разные периоды онтогенеза, чаще всего на стадии всходов или созревания семян. У линий 08-30-AtCPC №43 и №44 изменение окраски не наблюдалось, тогда как растения линий и №6 имели выраженную антоциановую окраску на стадии всходов. Однако, в отличие от контрольных растений, все линии с отредактированным геном *CPC* аккумулировали антоцианы на абаксиальной стороне листьев на стадии цветения.

Согласно результатам кПЦР, во всех линиях *A. thaliana* первого поколения с отредактированным геном *CPC* среднее содержание транскриптов целевого гена был ниже в 1,5 раза по сравнению с контрольными образцами, у которых этот показатель составил $12,0 \pm 2,5\%$. Средний уровень экспрессии гена *CPC* во всех исследуемых линиях растений четвертого и пятого поколения был также ниже относительно контроля в 1,2 раза. (Рисунок 11А).

По результатам анализа экспрессии гена *DFR*, было показано, что по сравнению с контрольными растениями *A. thaliana* ($3,8 \pm 1,1\%$), во всех линиях отредактированных растений активность гена была выше в 3,1 раза. В следующих поколениях растений, во всех линиях средний уровень экспрессии гена *DFR* был выше относительно контроля в 3 раза (Рисунок 11Б).

Уровень содержания антоцианов у растений *A. thaliana* с отредактированным геном *CPC*, в среднем был в 5,2 раза выше, чем у контрольных растений, где этот показатель составлял $1,25 \pm 0,25$ мг/100г сухой массы. При этом в следующих поколениях растений уровень накопления антоцианов во всех линиях так же был выше по сравнению с контролем в 3,3 раза (Рисунок 11В).

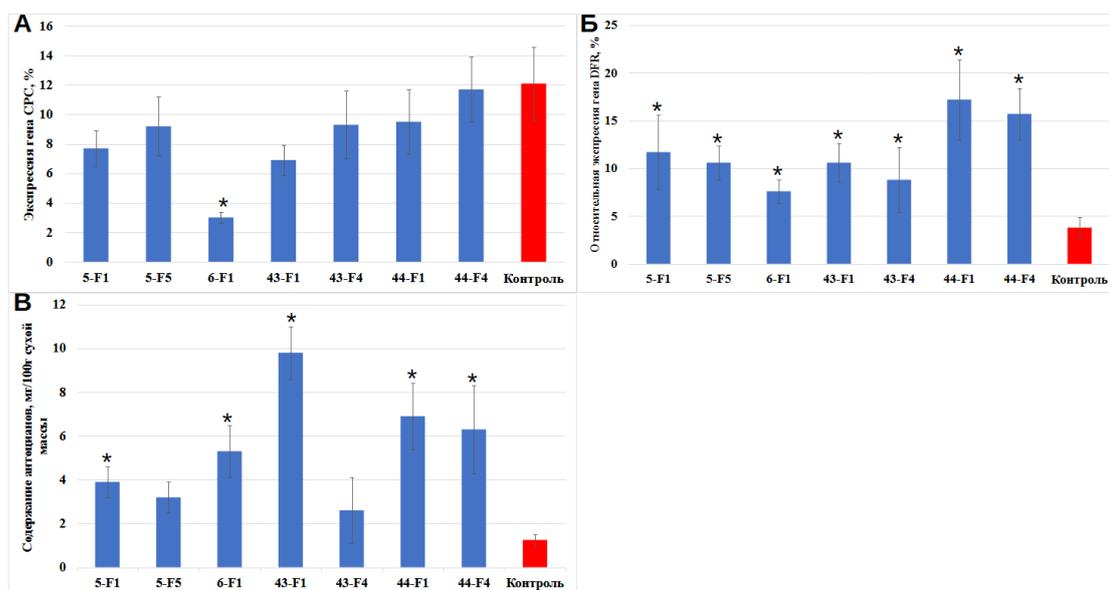


Рисунок 11. Уровень экспрессии гена *CPC* (А) и *DFR* (Б), содержание антоцианов (В) в отредактированных растениях *A. thaliana*. Звездочка (*) указывает на достоверное отличие от контрольных растений.

В результате редактирования целевого гена *CPC* других видов Капустных, генетическими конструкциями 08-30-*CPC*, были получены 20 растений *B. juncea*, 18 растений *B. rapa*, 1 растение *B. oleracea*, которые были устойчивы к обработкам глифосинатом. Однако фенотипических отличий от контрольных растений не наблюдалось. Кроме того, у растений устойчивых к глифосинату ген *Cas* методом ПЦР обнаружен не был, кроме одного растения *B. juncea*, у которого в результате секвенирования, CRISPR-индуцированных мутаций обнаружено не было.

Отбор растений, трансформированных генетическими конструкциями на основе вирусного репликона (03-31-*CPC* и 08-31-*CPC*) проводился посредством визуального анализа, так как в этом случае ген *bar* для селективного отбора не встраивался в геном растений. В большей степени, внимание уделялось антоциановой пигментации. В конечном итоге, было отобрано 17 растений арабидопсиса после трансформации конструкцией 03-31-*CPC* и 8 растений - после трансформации конструкцией 08-31-*CPC*. В основном, полученные растения отличались от контроля антоциановой окраской и отсутствием трихом. По такому же принципу были отобраны предполагаемые мутанты *B. juncea* 03-31-*CPC* в количестве 9 растений, отличавшихся антоциановой пигментацией в области жилок листьев. Однако ни у одного растения визуализируемые ПЦР-продукты не отличались от таковых у контрольных растений. Таким образом, большая часть визуально отобранных растений не была отредактирована, либо эффективной оказывалась только одна гРНК

При секвенировании ПЦР-продукта у 4 растений *A. thaliana* и 1 растения *B. rapa* наблюдались мутации в районе 3х нуклеотидов от РАМ. Кроме того, было обнаружено растение *A. thaliana* с делецией в области протоспейсера, отредактированное конструкцией 08-31-*CPC* (Рисунок 12). Однако, мутации не наследовались, что может говорить об их мозаичности.

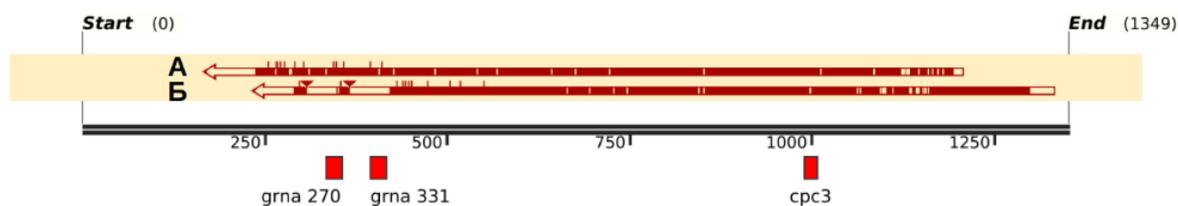


Рисунок 12. Расположение делеции в последовательности гена *CPC* в растениях *A. thaliana*, трансформированных конструкцией 08-31-*CPC* (А – сиквенс контрольного растения, Б - сиквенс трансформированных растений). Совпадения с референсом (NC_003071) отмечены коричневым цветом.

Редактирование гена MYB60 в растениях семейства Капустных

После трансформации *A. thaliana* генетическими конструкциями с единственной гРНК 23А-MYB60(3) и 23А-MYB60(4) было посажено по 200 семян. После обработки глюфосинатом, выжило 4 растения *A. thaliana* трансформированных конструкцией 23А-MYB60(3) с выраженной антоциановой пигментацией и 1 растение, отредактированное 23А-MYB60(4), которое не отличалось от контрольных растений.

Конструкция 23А-MYB60(4) не полностью подходила для *A. thaliana*, так как в последовательности гРНК имелось несоответствие одного нуклеотида, что может объяснять отсутствие изменений в окраске у единственного трансформированного этой конструкцией растения.

Результаты секвенирования показали, что у одного из растений *A. thaliana*, отредактированного конструкцией 23А-MYB60(3), в трех нуклеотидах от РАМ, в области протоспейсера гРНК наблюдался двоящийся сиквенс (Рисунок 13).

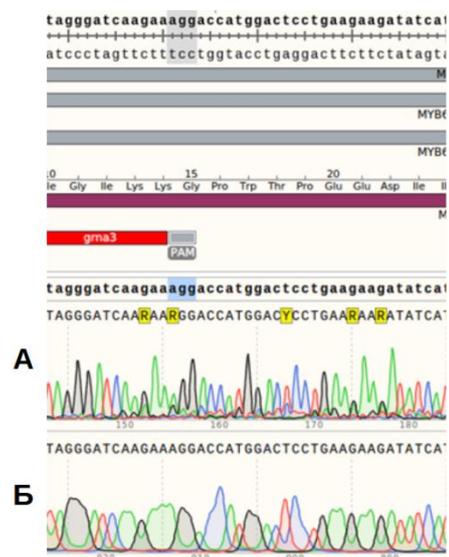


Рисунок 13. Хроматограмма секвенирования гена MYB60 *A. thaliana*, трансформированного конструкцией 23А-60MYB3 (А), и контрольного растения (Б). У редактированного растения наблюдается "двоящийся сиквенс" в трех нуклеотидах от РАМ.

По итогам трансформации других видов Капустных генетическими конструкциями с одной гРНК было получено 4 растения *E. sativa* с антоциановой пигментацией. По мере развития растений антоциановая окраска распределялась неравномерно, к примеру, пигментированы были только определенные области стебля, вероятнее всего по причине мозаичности полученных растений, что часто встречается при использовании промотора 35S. Растения с наиболее насыщенной антоциановой пигментацией так же отличались меньшей длиной стебля по сравнению с контролем. Следующие поколения полученных растений не были устойчивы к обработкам глюфосинатом и фенотипически не отличались от контрольных растений.

Секвенирование растений *E. sativa*, отредактированных генетической конструкцией 23А-60MYB(4) показало большое количество мутаций в сравнении с последовательностью гена из базы данных NCBI, но ни одна из них не находилась в области протоспейсера гРНК. Наиболее значимая мутация находилась с 5'-конца от гРНК, и могла привести к альтернативному сплайсингу и сдвигу рамки считывания по причине дополнительного АТG-кодона, который не был обнаружен у контрольных растений (Рисунок 14). Несмотря на то, что полученные результаты указывают на вовлеченность целевого гена MYB60 в биосинтез антоцианов у *E. sativa*, не совсем понятно, какие обнаруженные мутации могли иметь естественное происхождение, а какие были внесены проведенным редактированием.

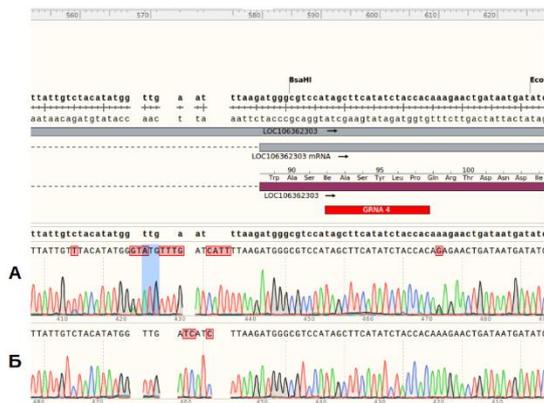


Рисунок 14. Хроматограмма секвенирования гена *MYB60* растения *E. sativa*, трансформированного конструкцией 23А-60МУВ(4) и контрольного растения (NC_063451.1). Голубым выделен АТG-кодон, по всей видимости, приводящий к альтернативному сплайсингу.

После трансформации растений семейства Капустных генетическими конструкциями 08-30-AtMYB60 было посажено около 35,3 тыс. семян *A. thaliana*, 2 тыс. семян каждого из видов *B. rapa*, *B. juncea*, *B. napus*, 300 семян *R. sativus* и *B. nigra* и 100 семян *C. sativa* и *B. oleracea*.

Всхожесть семян *A. thaliana* составила 68,3%, лишь 1,4% проростков были устойчивы к обработкам глюфосинатом. Согласно результатам ПЦР-анализа, только у 21% растений устойчивых к глюфосинату был обнаружен ген *Cas*. ПЦР-анализ целевого гена *MYB60* показал, что лишь у 3 растений (№ 20, 40, 110) присутствовал ожидаемый продукт меньшего размера (Рисунок 15В). Однако нормальный продукт также присутствовал, следовательно, мутация не была гомозиготной. Кроме того, в двух отобранных потомках растений 08-30-AtMYB60 №110 отсутствовал ген *Cas*, целевой ген по размеру не отличался от контроля, а индуцированная системой CRISPR/Cas мутация не передавалась потомству, что свидетельствует о мозаичности родительского растения.

Согласно результатам секвенирования по Сэнгеру, в растениях линии № 20 образовалась делеция размером 974 п.н., между гРНК 3 и 785, в трех нуклеотидах от РАМ. Кроме того мутации наблюдались в области гРНК 13 и 954. В мутантных линиях № 40 и 110 по всей видимости произошла инсерция стороннего фрагмента (Рисунок 15А и 15Б).

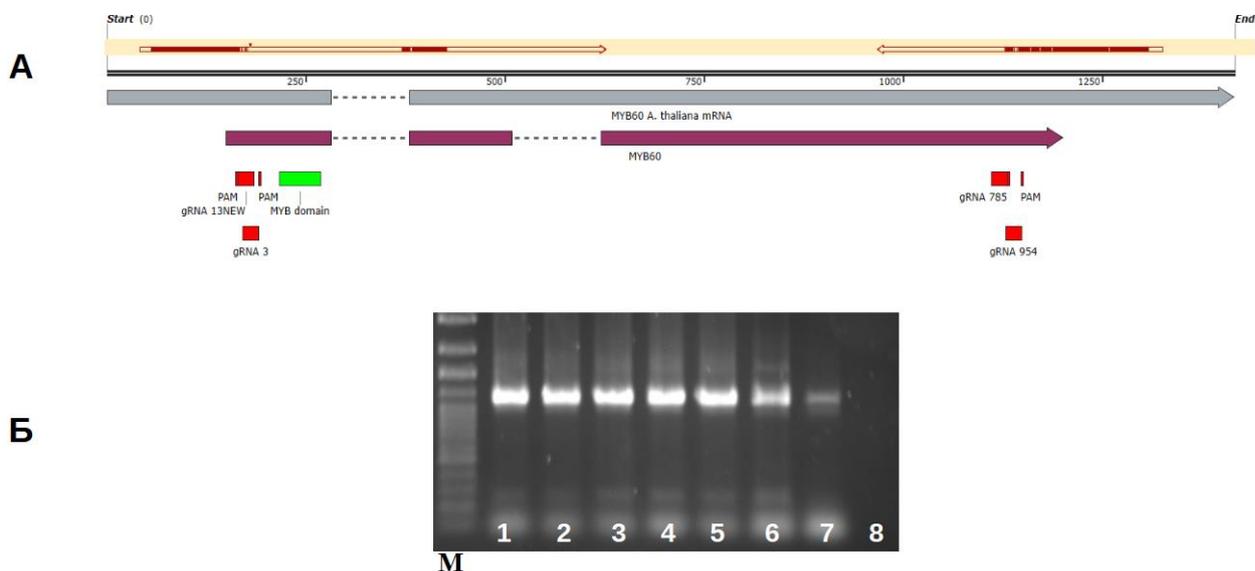


Рисунок 15. Локализация гРНК, домена МУВ и вызванного редактированием делеции на карте гена *MYB60* (А). Результаты ПЦР-анализа гена *MYB60* контрольного (7) и отредактированных (1-6) растений линии № 20, демонстрирующие дополнительный ПЦР-продукт размером ~ 241 п.н., вода -8. (ДНК-маркер Step100Long, Biolabmix, Россия) (В).

По сравнению с контролем, отредактированные растения линии 08-30-AtMYB60 №20 имели выраженную пигментацию в районе центральной жилки листьев и черешка. Стоит отметить, что антоциановая окраска менялась в течении разных стадии онтогенеза, достигая своего пика в период цветения. У растений *A. thaliana* с отредактированным геном *MYB60* были более длинные трихомы на адаксиальной стороне листа по сравнению с контролем, что согласуется с данными литературы, согласно которым ген *MYB60* связан с развитием трихом.

Согласно литературным данным, уровень экспрессии ключевого структурного гена *DFR* и негативного фактора регуляции биосинтеза антоцианов *AtMYB60* оказывает прямое воздействие на содержание антоцианов в растениях.

По результатам кПЦР, уровень транскрипционной активности целевого гена *MYB60* в растениях *A. thaliana* линии №20, был ниже 1,5 раза ($4,2 \pm 1,1\%$) относительно контроля ($7,5 \pm 1,3\%$). Показатели уровня экспрессии гена *MYB60* в третьем поколении растений линии №20, были также ниже в 1,3 раза ($5,2 \pm 1,2\%$) по сравнению с контрольными образцами (Рисунок 16А).

Уровень экспрессии гена *DFR* коррелировал с экспрессией целевого гена *MYB60* в растениях линии №20 и был выше 2,1 раза ($13,9 \pm 3,7\%$) по сравнению с контролем ($6,5 \pm 3,0\%$). Так же, уровень транскрипционной активности в растениях третьего поколения растений линии №20 был выше в 2 раза ($13,0 \pm 2,6\%$), по сравнению с контролем (Рисунок 16Б).

Уровень содержания антоцианов в растениях *A. thaliana* линии №20 был 7 раз выше ($8,7 \pm 2,8$ мг/100г сухой массы) по сравнению с контрольными образцами ($1,25 \pm 0,25$ мг/100г сухой массы). Растения третьего поколения линии №20 показали практически аналогичные результаты и накапливали в 6,9 раз больше антоцианов ($8,6 \pm 2,2$ мг/100г сухой массы) по сравнению с контролем (Рисунок 16В).

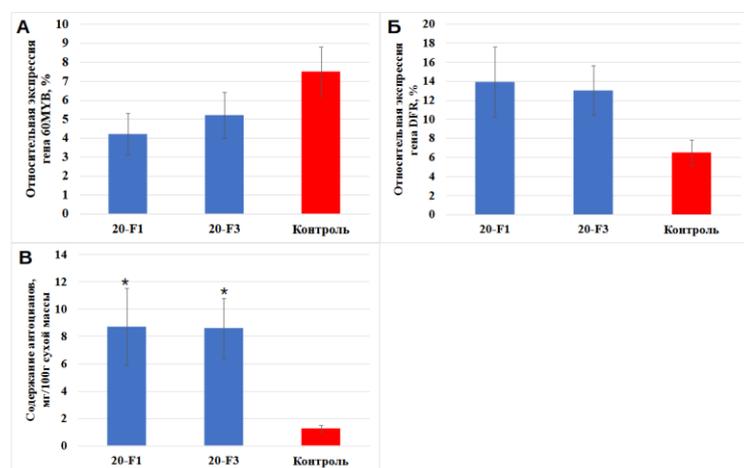


Рисунок 16. Уровень экспрессии гена *MYB60* (А) и *DFR* (Б), содержание антоцианов (В) в отредактированных растениях *A. thaliana*. Звездочка (*) указывает на достоверное отличие от контрольных растений.

По итогам трансформации генетическими конструкциями 08-30-MYB60 других видов растений Капустных устойчивость к глюфосинату проявили 5 растений *B. rapa*, 2 растения *B. napus*, 1 растение *B. oleracea*, 2 растения *B. nigra*. Однако по сравнению с контрольными растениями заметных фенотипических отличий не наблюдалось. Согласно результатам ПЦР-анализа, у растений устойчивых к глюфосинату ген *Cas* обнаружен не был, кроме 2 растений *B. rapa* и 3 растений *B. nigra*. Однако по результатам секвенирования, каких-либо значимых мутаций обнаружено не было, а следующее поколение не имело устойчивости к глюфосинату.

Растения Капустных, отредактированные с использованием конструкций на основе транзитивно экспрессирующегося геминивирусного вектора 03-31-MYB60 отбирались согласно визуальным критериям, по причине отсутствия у них устойчивости к селективному отбору. Ожидалось получить крупные делеции в сайте редактирования, которые будут видны на в процессе электрофореза ПЦР-продуктов, поскольку в используемых генетических конструкциях встроено несколько гРНК.

По итогу, согласно результатам визуального отбора, по фенотипическим признакам были отобраны следующие растения: *B. juncea* 03-31-MYB60 - 4 растения, из которых 1 отличался значительной антоциановой пигментацией семядолей, остальные небольшой пигментацией различных частей растения, *B. rapa* 03-31-MYB60 - 1 растение практически с полным отсутствием трихом, *R. sativus* 03-31-MYB60 - 5 растений с антоциановой окраской стебля. В результате ПЦР-анализа, ни у одного предполагаемого отредактированного растения крупных делеций обнаружено не было.

Заключение

Различные этапы биосинтеза антоцианов контролируются тремя группами регуляторов транскрипции - MYC-подобными bHLH, MYB и WDR, которые образуют регуляторный комплекс

MYB, и напрямую регулируют экспрессию структурных генов. Факторы транскрипции MYB являются ключевыми регуляторами, выполняя роль как активаторов, и репрессоров биосинтеза антоцианов. На данный момент выявлено большое количество положительных транскрипционных факторов, связанных с биосинтезом антоцианов. При этом репрессоры остаются недооцененными в качестве целей для редактирования. Кроме того, до сих пор было опубликовано мало сообщений о негативных регуляторах накопления антоцианов растений рода *Brassica*.

Антоцианы представляют собой большую группу вторичных метаболитов, которые отвечают за пигментацию, сигналинг, защиту от неблагоприятных условий окружающей среды и другие важные функции, а также обладают многочисленными полезными свойствами для здоровья человека и промышленности. Кроме того, гены, участвующие в биосинтезе антоцианов могут использоваться в качестве репортеров для оценки эффективности молекулярно-биологических инструментов, так как изменение антоциановой пигментации легко определяется невооруженным глазом.

Антоциановая пигментация растений в значительной степени определяется уровнем транскрипционной активности различных регуляторных и структурных генов биосинтеза антоцианов. Изменения, возникающие в этих генах, могут повлиять на характер пигментации растения. При этом, при сохранении интактной аллели, визуальный анализ, по всей видимости, не всегда может верно определить успешность события редактирования целевого гена. На содержание антоцианов большое влияние может оказывать также воздействие многих других факторов, такие как световое излучение, состав почвы, температура и т.д., что требует культивирования опытных и контрольных растений в одинаковых и стабильных условиях.

В данной работе был проведен анализ известных структурных и регуляторных генов, задействованных в процессе биосинтеза антоцианов в растениях Капустных. Структурный ген *DFR*, который считается основной мишенью регуляторных транскрипционных факторов в процессе синтеза антоцианов был изучен у 43 отечественных сортов видов *B. oleracea*, *B. napus*, *B. juncea* и *B. rapa*. Была доказана ключевая роль гена *DFR* в растениях *B. oleracea* и *B. rapa*, и его корреляция с уровнем содержания антоцианов. Тогда как антоциановая окраска у растений *B. napus* и *B. juncea* не была напрямую связана с экспрессией гена *DFR*, что может быть объяснено тем, что биосинтез антоцианов в этих видах регулируется другими путями. В качестве генов-мишеней были выбраны негативные регуляторы биосинтеза антоцианов, *MYB60*, *MYBL2*, *CPC*, которые в рамках данной работы были впервые просеквенированы у сортов Капустных, культивируемых в России. В последовательности гена *MYBL2* была обнаружена мутация, общая для антоциановых сортов *B. oleracea*, которая приводила к повышению содержания антоцианов за счет усиления экспрессии гена *DFR*. Результаты секвенирования генов *MYB60* и *CPC* показали высокий уровень генетического полиморфизма в области интронов и экзонов, однако они не были общими для антоциановых сортов растений Капустных.

Методом агроинфильтрации была достигнута транзientная экспрессия целевых генетических конструкций в листьях *B. napus*, которая проявлялась в виде антоциановой пигментации.

Путем трансформации методом погружения цветков, получены модифицированные растения *A. thaliana* с гетерозиготным нокаутом негативных регуляторов биосинтеза антоцианов *CPC*, *MYB60*, *MYBL2*, соответственно. К глюфосинату проявили устойчивость 1,2% (*MYBL2*), 1,65% (*CPC*), 1,4% (*MYB60*) отредактированных растений *A. thaliana*. Среди устойчивых к глюфосинату растений у 73,7% (*MYBL2*), 18,0% (*CPC*), 21,0% (*MYB60*) был обнаружен ген *Cas*. В целевых генах были индуцированы крупные делеции в гене *MYBL2* размером 207 п.н. между гРНК 228 и 426, в гене *CPC* размером 662 п.н. между гРНК 270 и 3, и в гене *MYB60* размером 974 п.н., между гРНК 3 и 785 в отредактированных растениях *A. thaliana*.

Транскрипционная активность исследуемых генов, отредактированных растений *A. thaliana* была ниже по сравнению с контролем в среднем в 2 раза (*MYBL2*), и 1,5 раза (*CPC* и *MYB60*). Уровень экспрессии гена *DFR* по сравнению с контрольными растениями в среднем была выше на в 4,7 раз (*MYBL2*), 3,1 раза (*CPC*), 2,1 раза (*MYB60*). Также, уровень накопления антоцианов по сравнению с контролем была выше на 3,8 раза (*MYBL2*), 5,2 раза (*CPC*), 7 раз (*MYB60*). Было показано, что с каждым новым поколением отредактированных растений, эффект модификации снижается, что может быть результатом работы компенсаторных механизмов.

С использованием генно-инженерных конструкций на основе плазмид pDIRECT_23A и pTRANS_231/pMOD_A0503 удалось получить только мозаичные мутации, которые не наследовались следующими поколениями. Вероятнее всего причина заключается в том, что в генетических конструкциях, где ген *Cas* находился под контролем 35S конститутивного промотора, использование которого, согласно литературе, приводит в основном к соматическим мутациям и мозаичности, так как данный промотор демонстрирует слабую активность в яйцеклетках и не начавших делиться зиготах. Наследуемые мутации удалось получить только с использованием модулей pTRANS_230/pMOD_A0508, где ген *Cas9* находился под контролем промотора EC1.2, специфичного для яйцеклеток.

ВЫВОДЫ

1. Установлена ключевая роль гена *DFR* и его корреляция с уровнем содержания антоцианов в растениях *B. oleracea* и *B. rapa*, тогда как антоциановая пигментация в растениях *B. juncea* и *B. napus* не была напрямую связана с экспрессией гена *DFR*;
2. Выявлена мутация в последовательности гена *MYBL2* в антоциановых сортах *B. oleracea*, которая приводила к повышению экспрессии гена *DFR*, и как следствие более высокому уровню содержания антоцианов;
3. Методом погружения цветков, получены растения *A. thaliana* с крупными делециями в последовательностях целевых генов (*CPC*, *MYBL2*, *MYB60*), которые характеризовались высокой экспрессией гена *DFR* и повышенным содержанием антоцианов.
4. Методом погружения цветков, получены растения *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. juncea*, *R. sativus*, *B. napus*, *E. sativa*, *C. sativa*, *B. nigra* с небольшими и мозаичными мутациями, которые не наследовались следующими поколениями, некоторые из которых отличались незначительной антоциановой пигментацией различных частей растения.
5. Показано, что геномное редактирование растений семейства *Brassicaceae* с использованием генетических конструкций, где нуклеаза Cas9 находится под контролем промотора EC1.2 специфичного для яйцеклеток, эффективнее индуцирует наследуемые мутации по сравнению с конструкциями, где Cas9 управляется конститутивным промотором 35S.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ НАУЧНОЙ РАБОТЫ

Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК РФ:

1. Khusnutdinov E., Sukhareva A., Panfilova M., Mikhaylova E. Anthocyanin Biosynthesis Genes as Model Genes for Genome Editing in Plants // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. P. 8752. <https://doi.org/10.3390/ijms22168752> Q1
2. Mikhaylova E., Khusnutdinov E., Shein M., Sukhareva A., Panfilova M., & Kuluev B. Transcription factor *CAPRICE* as a target to induce anthocyanin biosynthesis in oilseed rape // AIP Publishing LLC. 2021. V. 2388. № 1. P. 030024. <https://doi.org/10.1063/5.0068528>
3. Михайлова Е. В., Хуснутдинов Э. А., Чемерис А. В., Кулуев Б. Р. Доступный арсенал систем CRISPR/cas для геномного редактирования растений // Физиология растений. 2022. Т. 69. № 1. с. 38-53. <https://doi.org/10.31857/S0015330322010134>
4. Khusnutdinov E., Artyukhin A., Sharifyanova Y., Mikhaylova E.V. A Mutation in the *MYBL2-1* Gene Is Associated with Purple Pigmentation in *Brassica oleracea*. Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 11865. <https://doi.org/10.3390/ijms231911865> Q1
5. Хуснутдинов Э.А., Панфилова М.А., Терехов М.П., Михайлова Е.В. CRISPR/Cas-редактирование гена *CPC* у *Arabidopsis thaliana*. Ecological genetics. 2024. V. 22. № 1. P. 13-22. <https://doi.org/10.17816/ecogen624373>

Публикации в других изданиях:

1. Панфилова М.А., Хуснутдинов Э.А., Шейн М.Ю., Сухарева А.С., Кулуев Б.Р., Михайлова Е. В. Редактирование гена *Caprice* рапса для изменения антоциановой окраски и исследования роли антоцианов в устойчивости к стрессам // Современные подходы и методы в защите растений: Материалы II Международной научно-практической конференции (16–18 ноября 2020 г.,

Уральский федеральный университет, Екатеринбург, Россия) // ИЗДАТЕЛЬСТВО АМБ (Екатеринбург). с. 250-251. <http://hdl.handle.net/10995/96481>

2. Khusnutdinov E., Panfilova M., Sukhareva S., Mikhaylova E. The knockout of predicted *MYB60* gene in *Eruca sativa* promotes anthocyanin accumulation // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021): The 6 th International Scientific Conference (June 14–18, 2021, Novosibirsk, Russia); Abstracts. P. 110. <https://doi.org/10.18699/PlantGen2021-094>

3. Артюхин А.Е., Хуснутдинов Э.А., Михайлова Е.В. Антоциановая окраска у *Brassica oleracea* опосредована мутацией в гене *MYBL2*. ГенБио2022: Материалы III Международной научно-практической конференции «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений - ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад - Национальный научный центр РАН», г. Ялта, Россия, 3–8 октября 2022 г. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2022. с. 30. <https://doi.org/10.18699/GenBio2022-10>

4. Хуснутдинов Э.А., Артюхин А.Е., Михайлова Е.В. DFR - ключевой ген антоцианового биосинтеза у растений семейства Капустных. Материалы 3-ей Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 3-8 октября 2022 г., Санкт-Петербург // отв. ред. И.А. Тихонович. 2022. с. 225.

5. Михайлова Е.В., Хуснутдинов Э.А., Панфилова М.А., Артюхин А.Е., Вершинина З.Р. Использование модульных генно-инженерных конструкций в геномном редактировании растений // Геномика и биотехнология для медицины и сельского хозяйства: материалы Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 60-летию ИБГ УФИЦ РАН - – Уфа: РИЦ УУНиТ. 2022. с. 117-118.

6. Artyukhin A., Khusnutdinov E., Mikhaylova E. Transcription factors *MYB60*, *CPC* and *MYBL2* are involved in anthocyanin accumulation and formation of root hairs in *Brassica napus* // FEBS Open Bio. 2021. V. 11. P. 294. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13205>

Отправлено в печать:

1. Mikhaylova E., Musin K., Panfilova M., Khusnutdinov E., Kuluev B. Agrobacterium-mediated transformation and gene editing of kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes*) // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2805928/v1>