



## ОСОБЕННОСТИ СОЗДАНИЯ ЭКСПРЕССИОННЫХ ВЕКТОРОВ В pBAtC ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ЛОКУСА *EDS1* КАРТОФЕЛЯ И ГЕНА *DYAD* АРАБИДОПСИСА

Рожнова Н.А.<sup>1</sup>, Геращенко К.Г.<sup>2</sup>, Эльконин Л.А.<sup>3</sup>, Геращенко Г.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Уфа, пр. Октября, 71, E-mail: [apomixis@anrb.ru](mailto:apomixis@anrb.ru)

<sup>2</sup> Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Россия, 420012, Казань, Карла Маркса, 76

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока»,  
Россия, 410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7

### Резюме

Геном-редактирующие стратегии появились недавно как многообещающие инструменты для придания желаемых свойств многим эукариотическим видам, включая растения. Эта технология CRISPR/Cas9 может быть использована для инжиниринга устойчивости растений к узкому или широкому кругу патогенов, репродуктивных особенностей развития и других свойств растений. Известно, что *EDS1* белок арабидопсиса контролирует активацию защиты и программируемую клеточную смерть, обусловленную межклеточными Toll-подобными иммунными рецепторами, которые узнают специфические эффекторы патогена. К сожалению, вовлеченность *EDS1* белка в антифитовирусный иммунитет растений картофеля не изучена. Особое место в системе полового и бесполого размножения принадлежит мейозу. Ключевые гены мейоза, и прежде всего ген *DYAD/SWI1* является потенциальным кандидатом при поиске генов апомиксиса. На основе плазмиды pBAtC рестриктазно-лигазным методом были получены бинарные векторы. Так, созданы три экспрессионных вектора (p01, p03 и p04) для редактирования локуса *EDS1*. Два экспрессионных вектора (pII-25 и pVIII-29) были созданы для введения мутаций во втором и восьмом экзонах гена *DYAD/SWI1* арабидопсиса. Во всех случаях наличие клонированных вставок подтверждено секвенированием ДНК. Созданные вектора p01, p03, p04 под промотором pAtU6-6 арабидопсиса и полученный прежде вектор p13 под промотором pStU6 картофеля используются в работе по биобаллистической трансформации растений картофеля *in vitro*.

**Ключевые слова:** CRISPR, геномное редактирование, *EDS1* локус, ген *DYAD/SWI1*, вектор pBAtC, гидПНК, секвенирование ДНК, арабидопсис, картофель

**Цитирование:** Рожнова Н.А., Геращенко К.Г., Эльконин Л.А., Геращенко Г.А. Особенности создания экспрессионных векторов в pBAtC для редактирования локуса *EDS1* картофеля и гена *DYAD* арабидопсиса // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 510-519. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-45

© Авторы

### FEATURES OF CREATING EXPRESSION VECTORS IN pBAtC FOR EDITING THE POTATO ADH1 LOCUS AND THE ARABIDOPSIS DYAD GENE

<sup>1</sup>Rozhnova N.A., <sup>2</sup>Gerashchenkov K.G., <sup>3</sup>Elkonin L.A., <sup>1</sup>Gerashchenkov G.A.

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics - Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, 71 Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: [apomixis@anrb.ru](mailto:apomixis@anrb.ru)  
Kazan Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, 76 K. Marx, Kazan, 420012, Russia  
Federal Agricultural Scientific Center of the South-East, 7 Tulaikov Street, 410010, Saratov, Russia,

### Resume

Genome-editing strategies have recently emerged as promising tools to impart desired properties to many eukaryotic species, including plants. This technology can CRISPR/Cas9 be used to engineer plant resistance to narrow or wide range of pathogens, reproductive developmental features and other plant properties. It is known that EDS1 arabidopsis protein controls protection activation and programmable cell death due to intercellular Toll-like immune receptors that recognize specific pathogen effectors. Unfortunately, the involvement of EDS1 protein in the antiphytoviral immunity of potato plants has not been studied. Meiosis has a special place in the system of sexual and seeds-without-sex reproduction. Key meiosis genes, and above all the *DYAD / SWII* gene, are a potential candidate in the search for apomixis genes. Binary vectors were obtained on the basis of plasmid pBAtC by the restriction-ligase method. Thus, three expression vectors (p01, p03 and p04) were created for editing the locus EDS1. Two expression vectors (pII-25 and pVIII-29) were created to introduce mutations in the second and eighth exons of the *DYAD / SWII* arabidopsis gene. In all cases, the presence of cloned inserts was confirmed by DNA sequencing. The created p01, p03, p04 vectors under the pAtU6-6 arabidopsis promoter and the previously obtained p13 vector under the potato pStU6 promoter are used in the work on bioballistic transformation of potato plants *in vitro*.

**Keywords:** CRISPR, genome editing, EDS1 locus, *DYAD / SWII* gene, pBAtC vector, guide RNA, DNA sequencing, arabidopsis, potato

**Citation:** Rozhnova N.A., Gerashchenkov K.G., Elkonin L.A., Gerashchenkov G.A. Features of creating expression vectors in pBAtC for editing the potato ADH1 locus and the arabidopsis *DYAD* gene. *Biomics*. 2020. Vol. 12(4). P. 510-519. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-45 (In Russian)

### © The Authors

#### Введение

Полагают, что геномное редактирование генома может кардинально изменить селекцию и сельскохозяйственное производство. Важными направлениями в генетике и селекции растений являются работы по устойчивости растений к фитопатогенам вообще и к фитовирусам в частности. В иммунитете растений важная роль принадлежит генам защитных белков, которые являются важнейшими молекулярными компонентами врожденной иммунной системы растений, обеспечивающими устойчивость к биотическому и абиотическому стрессу. Среди многих генов растительного иммунитета EDS1 известен как важный участник сигнальной трансдукции, опосредованной R генами, и устойчивости к вирусу табачной мозаики, опосредованной N геном гиперчувствительной устойчивости [Peart et al., 2002; Gantner et al., 2019]. Редактирование генов EDS1-подобного белка способно заменить традиционный подход, связанный с поиском эффективных природных "пептидных антибиотиков", и потому имеет огромный потенциал.

Семенная продуктивность сельскохозяйственных растений в связи с закреплением гетерозиса в ряду поколений посредством апомиксиса - следующее важное направление. Гаметофитный апомиксис (бесполосеменное размножение цветковых растений) является системой клонирования *in vivo*, имеющей огромный биотехнологический потенциал. Ключевое место в системе полового и бесполосеменного размножения принадлежит мейозу. Представляет интерес изучение ряда генов мейоза, и прежде всего гена *DYAD / SWITCH1* как потенциального кандидата при поиске генов апомиксиса. Известно, что ген *DYAD / SWITCH1* необходим для нормального протекания женского мейоза [Agashe et al., 2002; Voateng et al., 2008].

Цель работы – создание экспрессионных векторов для редактирования локуса EDS1-подобного белка картофеля и гена *DYAD* арабидопсиса.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выполнить биоинформатический поиск мишеней в гене EDS1-подобного белка картофеля и гена *DYAD* арабидопсиса;

2. Клонировать мишень гидРНК в вектор рВАтС по *AarI* сайтам;
3. Выполнить верификацию проведенных манипуляций методом секвенирования ДНК.

### Материалы и методы

Поиск мишеней в гене EDS1-подобного белка картофеля был проведен с использованием биоинформатических программ CRISPR DESIGN TOOLS ([https://www.milliporesigmabioinfo.com/bioinfo\\_tools/](https://www.milliporesigmabioinfo.com/bioinfo_tools/)), CRISPR GE (<http://skl.scau.edu.cn/>), CRISPROR (<http://crispor.tefor.net/crispor.py>), CHOP-CHOP (<http://chopchop.cbu.uib.no/>), как было описано в нашей предыдущей статье [Рожнова и др. (Rozhnova et al.), 2019], в том числе после проведенного анализа большого числа программ дизайна РНК-гидов [Герашенков и др. (Gerashchenkov et al.), 2020]. Дизайн гидРНК гена *DYAD* по II и VIII экзонам выполнен с помощью биоинформатических программ CHOP-CHOP (данные не приведены) и CRISPROR (рис.1 и 2).

В работе были использованы стандартные методы молекулярной биологии [Green, Sambrook 2012]. Мишени размером 20 п.н. для локуса EDS1 и для гена *DYAD/SWI* были клонированы в вектор рВАтС по сайтам *AarI* (New England Biolabs) с последующей трансформацией в клетки DH5α *E.coli* кальциевым методом. Трансформированные клетки были рассеяны на агаризованной LB среде в чашках Петри со спектиномицином (10 мкг/мл). Рекомбинантные плазмиды были подвергнуты секвенированию с подходящим праймером, используя генетический анализатор ABI 3130 (Applied Biosystems).

Ген *SWI1* (локус AT5G51330) кодирует новый белок, участвующий в сестринской когезии

хроматид и организации мейотической хромосомы как во время мужского, так и женского мейоза. Ген имеет два альтернативных транскрипта, которые продуцируют два похожих белка, один на 57 аминокислот короче другого. В работе использовали вектор рВАтС, имеющий ряд специфических особенностей:

- 1) Вектор пригоден для CRISPR/Cas геномного редактирования;
- 2) ГидРНК находится под контролем промотора *U6*;
- 3) Скрининг трансформированных растений можно вести по регулятору роста *Basta*;
- 4) Метод клонирования мишеней рестриктазно-лигазный;
- 5) Селекция трансформированных / редактируемых растений осуществляется по антибиотику спектиномицину.

### Результаты и обсуждение

**Биоинформатический анализ и дизайн праймеров.** Биоинформатический анализ EDS1 локуса осуществляли, используя программы, упомянутые выше. Результаты анализа этого локуса подробно даны ранее в работе [Рожнова и др. (Rozhnova et al.), 2019]. Биоинформатический анализ гена *DYAD* представлен на рис. 1 (II экзон) и рис. 2 (VIII экзон). Ген AT5G51330 = *DYAD* имеет 8 экзонов. Принимая во внимание функциональную важность этого гена, было принято решение о создании генно-инженерных конструкций, нацеленных на нокаутное редактирование нескольких экзонов, в которых возможно обнаружить мишени. При этом первый экзон этого гена очень короткий и не позволяет выбрать в нем мишени для геномного CRISPR/Cas редактирования.

I экзон, положение нуклеотидов 1-37:

ggaggaacgaagattatcgagagcaaaaatcatgagt - мишеней нет.

II экзон, положение нуклеотидов 344 - 425:

agtacgatgttcgtgaaacsggaatccgattagagaaacaccgcccggaaaatctcttcgcccgtcgtcaccgactttgaatg – мишени имеются.

VIII экзон, положение нуклеотидов 2517 - 2960:

gaagacatgggatggcttaagaaaacagtggacgagaactatcctaaaaagccagactcaacagagacacctttgctactagaggattcaccaccaatacagacactagaaggagaagtgaaggtggtgaacaagggtaaccsaaatcacagagtcacctcaaaacagagaaaaaggaaggaagcatgatcaacaagaaagatcaccactttcactaataagcaaacactgggtttcagaatctgcaggcctgtggggatgttcgcatggcccaattgcctgctcttgctgctgctactgataactaatgcttcttcgccaagtccacagacaagcctaccatcccctttccagtcaggccacttgagcctaagcgtcctcttggttgacggtttcccttccatcataccsagaagctcccaagaatctcttcaacggttgaagttgtcact – множественные мишени имеются.

Создание экспрессионных векторов для CRISPR/Cas редактирования

Ranked by default from highest to lowest specificity score (Hsu et al., Nat Biotechnol 2013). Click on a column title to rank by a score. If you use this website, please cite our paper in NAR 2018. Too much information? Look at the CRISPOR manual.

Download as Excel tables: [Guides](#), [all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A- <input type="checkbox"/> Only A-G-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency Doench '16 <small>Show all scores</small>	Mor.-Motifs Out-Of-Frame Lindel	Outcome Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score <input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chrom 5 only
25 / rev	CGGCGGAGATTTCCGGG Enzymes: <i>NciI</i> , <i>Hpy188I</i> , <i>PfiI</i> Cloning / PCR primers	100	100	30	63	0-0-0-0-0 0-0-0-0-0 0 off-targets	
44 / rev	CGGCGGAGATTTCCGGG Not with UGU3 Enzymes: <i>MspI</i> , <i>NciI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>SpyDI</i> Cloning / PCR primers	100	99	51	29	0-0-0-1-4 0-0-0-0-0 5 off-targets	4-exon:AT1G66180 4-exon:SULTR1.3 4-exon:AT1G62074 show all...
41 / rev	CGGCGGAGATTTCCGGG Not with UGU3 Enzymes: <i>MspI</i> , <i>NciI</i> , <i>BslI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>SpyDI</i> Cloning / PCR primers	99	100	74	73	0-0-0-0-5 0-0-0-0-0 5 off-targets	4-intergenic:AT1G50349-EMB2689 4-exon:SULTR1.3 4-exon:AT1G62074 show all...
45 / fw	CGGATAGAAACACCGC Enzymes: <i>MspI</i> , <i>NciI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>BslI</i> , <i>SpyDI</i> , <i>SbfI</i> Cloning / PCR primers	99	99	68	38	0-0-0-0-2 0-0-0-0-1 2 off-targets	4-exon:CNX3 4-intergenic:AT1G56545-U8P17
46 / fw	CGATAGAAACACCGC Enzymes: <i>MspI</i> , <i>NciI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>BslI</i> , <i>SpyDI</i> , <i>SbfI</i> Cloning / PCR primers	99	100	61	39	0-0-0-1-3 0-0-0-1-0 4 off-targets	4-exon:AT1G50180 4-exon:AT2G17160 4-exon:CLT3 show all...
38 / rev	CGAAGATTTCCGGG Not with UGU3 Enzymes: <i>BslI</i> Cloning / PCR primers	98	99	41	70	0-0-0-1-4 0-0-0-1-0 5 off-targets	4-exon:AT1G62930 4-exon:AT4G18570 3-exon:AT1G53380 show all...

Download as Excel tables: [Guides](#), [all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)  
Tab-sep format: [Guides](#) / [Off-targets](#)

Version 4.97 - Documentation - Contact us - Downloads/local installation - Paper - License

Рис.1. Биоинформатический поиск мишеней во II экзоне DYAD гена арабидопсиса (CRISPROR)  
Figure 1. Bioinformatic search for targets in exon II DYAD gene of the arabidopsis gene (CRISPROR)



Нуклеотидные последовательности синтезированных олигонуклеотидов, использованные при создании генно-инженерных конструкций для CRISPR/Cas геномного редактирования, представлены в табл. 1.

Таблица 1 / Table 1

Мишени генов, использованные в работе / Gene targets used in the study

Номера мишеней Target numbers	Название праймеров Name of primers	Нуклеотидная последовательность праймеров Nucleotide sequence of primers	Название и мишень созданных плазмид Name and target of the created plasmids
1	146r_S	GATTGtctcaaatggaacagag	p01 (редактируемый EDS1 locus в положении 146)
	146r_A	AAACctctgttccatcttggagaC	
2	360r_S	GATTGgtcaccttctggcttcttg	p02* (редактируемый EDS1 locus в положении 360)
	360r_A	AAACcacaagaccagaaggtgacaC	
3	510r_S	GATTGgaggagcaagcatcatcctg	p03 (редактируемый EDS1 locus в положении 510)
	510r_A	AAACcaggatgatgcttgcctcC	
4	816r_S	GATTGgtaactgcagaacagcatca	p04 (редактируемый EDS1 locus в положении 816)
	816r_A	AAACtgatgctgttctcagttacC	
5	510r_S	GATTGgaggagcaagcatcatcctg	p13** (редактируемый EDS1 locus в положении 510)
	510r_A	AAACcaggatgatgcttgcctcC	
6	II-25_S	GATTGccggcggtgttctctaat	pII-25 (редактируемый DYAD ген, II экзон)
	II-25_A	AAACattagagaaccaccgcccG	
7	VIII-29_S	GATTGgggatggcttaagaaaacag	pVIII-29 (редактируемый DYAD ген, VIII экзон)
	VIII-29_A	AAACctgttttcttaagccatcccC	

Обозначения: r - обратная цепь ДНК, S – прямой праймер мишени, A - обратный праймер мишени. В нуклеотидной последовательности праймеров заглавные буквы обозначают нуклеотиды, которые не являются частью протоспейсера (мишени).

p02\* - вектор не был создан. p13\*\* - вектор был создан прежде [Рожнова и др. (Rozhnova et al.), 2019] и содержит мишень под промотором картофеля StU6, в остальных векторах мишени находятся под промотором арабидопсиса AtU6-6.

Designations: r - reverse strand of DNA, S is the direct target primer, A - reverse primer of the target. In the nucleotide sequence of primers, capital letters denote nucleotides that are not part of the protospacer (target).

P02\* - vector was not created. p13\*\* - vector was created before [Rozhnova et al., 2019] and contains a target under the potato promoter StU6, in other vectors the targets are under the Arabidopsis promoter AtU6-6.

**Дизайн и клонирование мишеней для редактирования локуса EDS1 картофеля и гена DYAD арабидопсиса.** Принципы клонирования мишеней по сайтам AarI, используя вектор pBAtC, приведены в работах [Kim et al., 2016; Рожнова и др. (Rozhnova et al.), 2019]. Оптимальный сайт мишени имел обобщенный вид N<sub>20</sub>-NGG (gRNA + PAM site). Дизайн прямых олигонуклеотидов имеет вид: 5'-GATTG - N<sub>1-20</sub> -3'. Дизайн обратных олигонуклеотидов выглядит следующим образом: 5'-AAAC - последовательность, комплементарная N<sub>1-20</sub> -3'. Двухцепочечный олигонуклеотид в качестве мишени может быть легко получен отжигом прямого прямого и обратного праймера (Табл.1).

**Секвенирование мишеней.** Успешное клонирование мишеней при получении векторов p01, p03, p04, pII-25 и pVIII-29 было подтверждено секвенированием, используя праймер -486\_RSP: ccttctcctgcaacttcttctct. Секвенирование мишени p13 осуществляли при использовании праймера +160: CCATTACAATTAAGTCTGTCACACAAG

Результаты секвенирования подтверждают успешность клонирования в векторах p01, p03, p04, p13, pII-25 и pVIII-29 (Рис. 3 - 8).

Особенности создаваемых генно-инженерных конструкций определяются свойствами

исходной плазмиды (или бинарного вектора). Для выбранного нами вектора pBAtC характерна следующая черта: селективный отбор растений ведется на глюфосинате аммония - действующем веществе регулятора роста Basta. Этот отбор в ряде случаев более предпочтительным, чем рост растений на субстрате с антибиотиком.

Важная особенность, обеспечивающая будущий успех генетически отредактированных растений - это использование нескольких биоинформатических программ и предпочтительный выбор мишеней с более высоким рейтингом. Также важным является подбор мишеней, содержащих достаточное количество сайтов рестриционных эндонуклеаз. Безусловно, секвенирование нуклеотидных последовательностей обязательное требование. Однако на первом этапе анализа генетических изменений рестриктный анализ может оказаться востребованным в связи с относительной дороговизной и возможными трудозатратами при секвенировании ДНК.

Как показано в представленной статье, выбор исходного вектора pBAtC и подбор мишеней к EDS1 и DYAD вели с учетом этих требований.

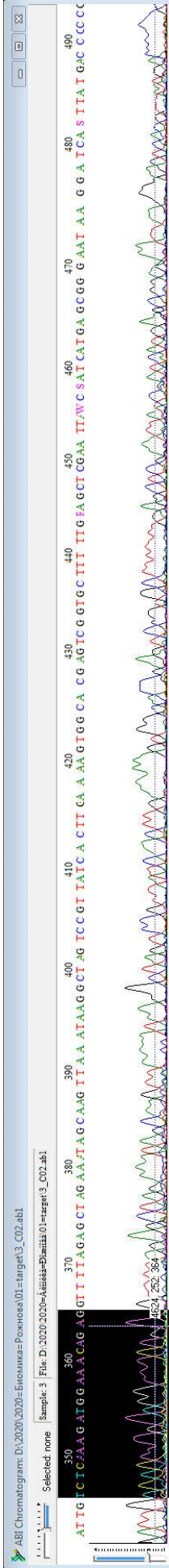


Рис. 3. Верификация результатов клонирования мишени р01 локуса EDS1 в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование  
 Figure 3. Verification of the results of cloning the P01 target of the EDS1 locus into a pBAtC vector using DNA sequencing

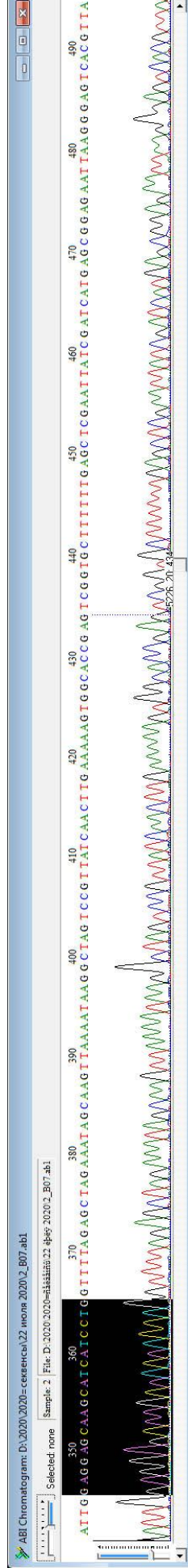


Рис. 4. Верификация результатов клонирования мишени р03 локуса EDS1 в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование  
 Figure 4. Verification of the results of cloning the P03 target of the EDS1 locus into the pBAtC vector using DNA sequencing

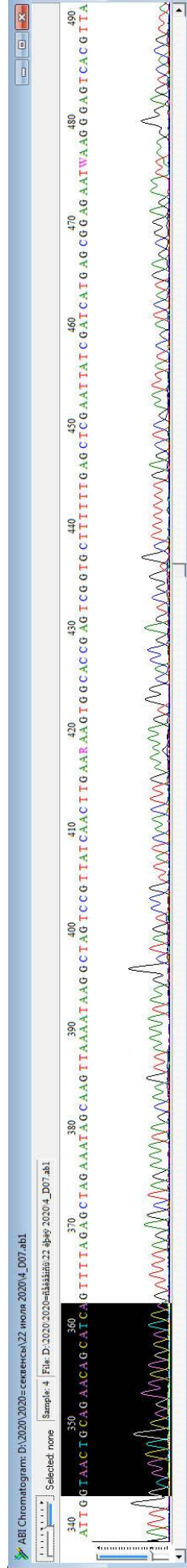


Рис. 5. Верификация результатов клонирования мишени р04 локуса EDS1 в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование  
 Figure 5. Verification of the results of cloning the P04 target of the EDS1 locus into the pBAtC vector using DNA sequencing

### Создание экспрессионных векторов для CRISPR/Cas редактирования

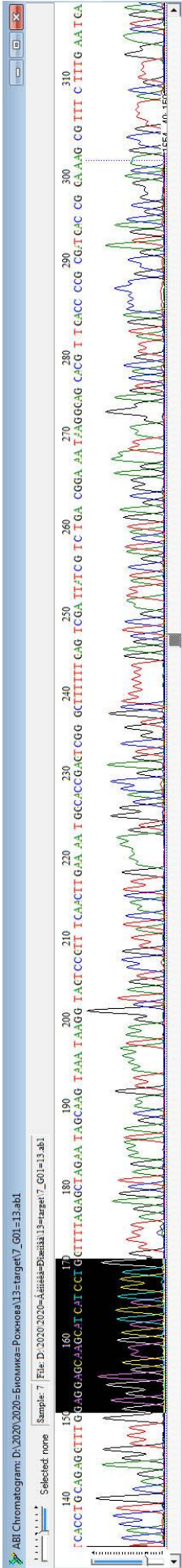


Рис. 6. Повторная верификация результатов клонирования мишени p13 локуса EDS1 в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование  
 Figure 6. Re-verification of the results of cloning the P13 target of the ADH1 locus using DNA sequencing

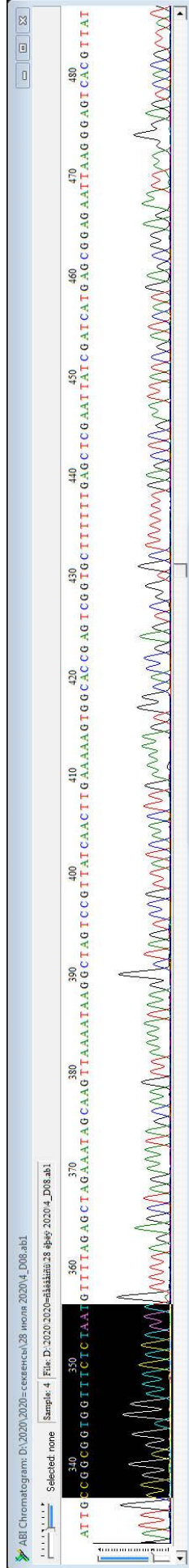


Рис.7. Верификация результатов клонирования мишени p1-25 локуса гена DYAD / SWI в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование  
 Figure 7. Verification of the results of cloning the target P1-25 locus of the DYAD / SWI gene into the pBAtC vector using DNA sequencing

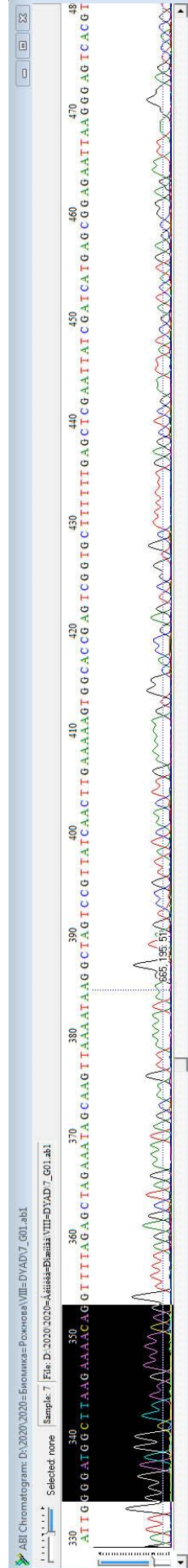


Рис.8. Верификация результатов клонирования мишени VIII-29 гена DYAD / SWI в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование  
 Figure 8. Verification of the results of cloning the target VIII-29 of the DYAD / SWI gene into the pBAtC vector using DNA sequencing



### Заключение

Генетическая биоинженерия - важное направление в биотехнологии растений. Отбор исходных плазмид и на их основе создание экспрессионных векторов - важный и ответственный этап в геномном редактировании. В наших исследованиях такой базовой плазмидой была pBAtC. Известно, что EDS1 белок арабидопсиса контролирует активацию защиты и программируемую клеточную смерть, обусловленную межклеточными Toll-подобными иммунными рецепторами, которые узнают специфические эффекторы патогена. К сожалению, вовлеченность EDS1 белка в антифитовирусный иммунитет растений картофеля не изучена. На основе плазмиды pBAtC были получены четыре экспрессионных вектора с клонированными по сайту *AarI* мишенями размером 20 п.н. Наличие клонированных вставок подтверждено секвенированием. Созданные генно-инженерные конструкции используются для биобаллистической трансформации растений картофеля *in vitro*.

В ходе исследований был осуществлен подбор геномных мишеней (последовательности 20 п.н.) в ортологе гена LOC102598075 EDS1-подобного белка с целью нокаутирования этого гена и произведено конструирование Cas9/sgRNA экспрессионных кассет на основе вектора pBAtC с увеличенной специфичностью Cas9 мутирования ортолога гена EDS1-подобного белка.

Исследование молекулярных механизмов функционирования апомиксиса преследует главную мечту селекционеров – использовать апомиксис для закрепления гетерозиса в селекции важнейших сельскохозяйственных культур. Представляет интерес создание мутантных форм гена *DYAD/SWII*, исследование функциональной активности этого гена и репродуктивных свойств полученных растений арабидопсиса. В качестве рабочей гипотезы рассматриваем возможность переключения программы амфимиктического (полового) размножения на апомиксис при участии этого гена как одного из ключевых компонентов спорогенеза, дерегуляция которого методом CRISPR/Cas9 геномного редактирования, позволит получить мутантные формы с высокой пенетрантностью признака. Ключевое место в системе полового и бесполосеменного размножения принадлежит мейозу. Внимание привлекают ключевые гены мейоза, и прежде всего ген *DYAD/SWII* [Ravi et al. 2008]. Таким образом, представленная работа демонстрирует успешность создания двух экспрессионных векторов (pII-25 и pVIII-29) для введения мутаций во втором и восьмом экзонах *DYAD/SWII* гена арабидопсиса.

Таким образом, цель и задачи, поставленные в работе, достигнуты.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-016-00139 А "Функциональный анализ ортолога гена EDS1-подобного белка *Solanum tuberosum* при

формировании устойчивости к фитовирусам" (РФФИ №19-016-00139 А, научный руководитель Н.А.Рожнова). Вектор pBAtC был любезно предоставлен Jin-Soo Kim через сайт Addgene (Addgene plasmid #78097; <http://n2t.net/addgene:78097>).

### Литература

1. Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Гуменова Г.Р., Князев А.В., Вершинина З.Р., Михайлова Е.В., Чемерис Д.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Дизайн РНК-гидов для CRISPR/Cas редактирования геномов растений // Молекулярная биология. 2020. Т.54(1). С. 1–22. DOI: 10.1134/S0026898420010061
2. Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Чемерис А.В. Создание экспрессионного вектора для геномного редактирования гена EDS1 // Биомика. 2019. Т.11(4). С. 422–429. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-35
3. Agashe B., Prasad C.K., Siddiqi I. Identification and analysis of DYAD a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in Arabidopsis // Development. 2002. 129:3935–3943.
4. Boateng K.A., Yang X., Dong F., Owen H.A., Makarof C.A. SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events // Mol Plant. 2008. V.1(4). P.620–633. doi: 10.1093/mp/ssn030
5. Gantner J., Ordon J., Kretschmer C., Guerois R., Stuttmann J. An EDS1-SAG101 Complex is Essential for TNL-mediated Immunity in *Nicotiana benthamiana* // Plant Cell. 2019. V. 31. P. 2456–2474. DOI: 10.1105/tpc.19.00099
6. Green, M. and Sambrook, J. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
7. Kim H, Kim ST, Ryu J, Choi MK, Kweon J, Kang BC, Ahn HM, Bae S, Kim JS, Kim SG. A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system // *J Integr Plant Biol*. 2016. V.58(8). P.705-712. doi: 10.1111/jipb.12474
8. Mercier R. SWITCH1 (SWI1): A novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis // *Genes Dev*. 2001. V. 15. P. 1859–1871.
9. Peart J.R., Cook G., Feys B.J., Parker J.E., Baulcombe D.C. An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus // *Plant J*. 2002. V.29(5). P.569-579.
10. Ravi M., Marimuthu M.P., Siddiqi I. Gamete formation without meiosis in Arabidopsis // *Nature*. 2008. V.451(7182). P.1121–1124. doi: 10.1038/nature06557
11. Yang C., Hamamura Y., Sofroni K., Böwer F., Stolze S.C., Nakagami H., et al. SWITCH 1/DYAD is a WINGS APART-LIKE antagonist that maintains sister chromatid cohesion in meiosis // *Nat Commun*. 2019. V.10(1):1755. doi: 10.1038/s41467-019-09759-w

### References

1. Agashe B., Prasad C.K., Siddiqi I. Identification and analysis of DYAD a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in Arabidopsis. *Development*. 2002. V.129. P.3935–3943.

2. Boateng K.A., Yang X., Dong F., Owen H.A., Makarof C.A. SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events. *Mol Plant*. 2008. V.1(4). P.620–633. doi: 10.1093/mp/ssn030
3. Gantner J., Ordon J., Kretschmer C., Guerois R., Stuttmann J. An EDS1-SAG101 Complex is Essential for TNL-mediated Immunity in *Nicotiana benthamiana* // *Plant Cell*. 2019. V.31. P.2456–2474. DOI: 10.1105/tpc.19.00099
4. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A. Kuluev B.R. Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Molecular Biology*. 2020. V. 54. P. 24–42. doi: 10.1134/S0026893320010069
5. Green, M. and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
6. Kim H, Kim ST, Ryu J, Choi MK, Kweon J, Kang BC, Ahn HM, Bae S, Kim JS, Kim SG. A simple, flexible and high-throughput cloning system for plant genome editing via CRISPR-Cas system. *J Integr Plant Biol*. 2016. V.58(8). P.705-712. doi: 10.1111/jipb.12474
7. Mercier R. SWITCH1 (SWI1): A novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes Dev*. 2001. V. 15. P.1859–1871.
8. Peart J.R., Cook G., Feys B.J., Parker J.E., Baulcombe D.C. An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J*. 2002. V.29(5). P.569-579.
9. Ravi M., Marimuthu M.P., Siddiqi I. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature*. 2008. V.451(7182). P.1121–1124. doi: 10.1038/nature06557
10. Rozhnova N.A., Gerashchenkov G.A., Chemeris A.V. The creation of an expression vector for genome editing of the EDS 1 gene. *Biomics*. 2019. V.11(4). P. 422-429. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-35
11. Yang C., Hamamura Y., Sofroni K., Böwer F., Stolze S.C., Nakagami H., et al. SWITCH 1/DYAD is a WINGS APART-LIKE antagonist that maintains sister chromatid cohesion in meiosis. *Nat Commun*. 2019. V.10(1):1755. doi: 10.1038/s41467-019-09759-w