



БИОМИКА/BIOMICS

ISSN 2221-6197 <http://biomicsj.ru>



СОЗДАНИЕ ЭКСПРЕССИОННОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА EDS1

Рожнова Н.А., Геращенко Г.А., Чемерис А.В.

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

Резюме

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. В ходе исследований осуществлен подбор геномных мишеней для введения мутаций (последовательности 20 п.н.) в ортолог гена LOC102598075 EDS1-подобного белка. Выполнен дизайн гРНК. Для минимизации вариантов ложно-целевых мутаций были использованы он-лайн биоинформатические ресурсы, такие как CRISPR DESIGN TOOLS, CRISPR GE, CRISPROR, CHOP-CHOP 2.0. Выполнена сборка Cas9/sgRNA экспрессионных кассет на основе вектора pBatC с увеличенной специфичностью Cas9 мутирования ортолога гена EDS1-подобного белка. Для лучшей трансформации картофеля в векторе pBatC промотор арабидопсиса был заменен на собственный промотор pStU6-6 размером 323 п.н.. На основе модифицированного вектора был получен экспрессионный вектор с клонированной по сайту AarI мишенью размером 20 п.н. Валидацию присутствия в векторе pSt6-6 промотора размером 323 п.н. и фрагмента гена Basta размером 424 п.н. осуществляли методом ПЦР. Наличие нужной вставки подтверждено секвенированием. Созданный вектор будет использован для биобаллистической трансформации растений картофеля *in vitro*.

Ключевые слова: CRISPR, геномное редактирование, EDS1 белок, вектор pBatC, секвенирование ДНК

Цитирование: 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

© Автор(ы)

THE CREATION OF AN EXPRESSION VECTOR FOR GENOME EDITING OF THE EDS 1 GENE

Rozhnova N.A., Gerashchenkov G.A., Chemeris A.V.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
71 Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia, E-mail: apomixis@anrb.ru

Resume

The Arabidopsis EDS1 protein is known to control defense activation and programmed cell death caused by intercellular Toll-like immune receptors that recognize specific pathogen effectors. Unfortunately, the involvement of EDS1 protein in the anti-virus immunity of potato plants has not been studied. During the research, the selection of genomic targets for the introduction of mutations (sequence 20 bp) in the ortholog of the gene LOC102598075 EDS1-like protein was

carried out. Design of guide RNA is carry out. Online bioinformatics resources such as CRISPR DESIGN TOOLS, CRISPR GE, CRISPROR, and CHOP-CHOP 2.0 were used to minimize variants of off-target mutations. The Assembly of Cas9/sgRNA expression cassettes based on the pBAtC vector with increased specificity of Cas9 mutation of the ortholog of the EDS1-like protein gene was performed. For better potato transformation arabidopsis promoter in the pBAtC vector was replaced with own pStU6-6 promoter 323 bp. On the basis of the modified vector, an expression vector was obtained with a 20 bp target cloned on the AarI site. Validation of the presence of a 323 bp promoter and a 424 bp Basta gene fragment in the pSt6-6 vector was performed by PCR. The presence of the desired insert is confirmed by sequencing. The created vector will be used for bioballistic transformation of potato plants *in vitro*.

Keywords: CRISPR, genome editing, EDS1 protein, pBAtC vector, DNA sequencing

Citation: 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

© The Author(s)

Введение

Фитопатогенез - это глобальная проблема, представляющая серьезную угрозу продовольственной безопасности. Основными негативными факторами в аграрном производстве являются биотические стрессы, вызываемые грибными, бактериальными и вирусными патогенами, которых только последних известно более 450 [Soosaar et al., 2005]. Самая разумная стратегия в фитопатологии - это повышать устойчивость растений, извлекая экономические и социальные выгоды. Таким образом, гены устойчивости к пестицидам и к болезням с полным основанием можно считать важнейшим источником ресурсов для удовлетворения потребностей роста производства продуктов питания.

Существует несколько основных подходов и стратегий для создания устойчивых к вирусным инфекциям растений картофеля [Макарова и др., 2017], а именно:

- использование в селекционных программах R генов устойчивости;
- использовании генов растений, вовлеченных в неспецифическую устойчивость;
- мутагенез ключевых генов, вовлеченных в фитоиммунитет.

В связи с этим поиск новых высокоактивных белков-регуляторов иммунитета растений и разработка методов их получения в частности посредством геномного редактирования целевых генов представляются чрезвычайно актуальными. Редактирование генов EDS1-подобного белка способно заменить традиционный подход, связанный с поиском эффективных природных "пептидных антибиотиков", и потому имеет огромный потенциал.

Известно, что EDS1 (enhanced disease susceptibility 1 protein) белок - это белок, расширенной восприимчивости к болезням, которому принадлежит ключевая роль в формировании растительного иммунитета против патогенов. Установлено, что ортологи EDS1 необходимы для N-опосредованной устойчивости против TMV (Tobacco Mosaic Virus) [Peart et al., 2002]. Однако это единственная работа, посвященная EDS1 белку в антифитовирусном иммунитете. Для идентификации защитных ответов растений, противодействующих атакам фитопатогенов, были выделены eds мутанты арабидопсиса, проявлявшие расширенную восприимчивость к болезням, вызываемым вирулентным патогеном *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* ES4326 [Rogers, Ausubel, 1997]. Таким образом, редактирование ортолога гена EDS1-подобного белка имеет большие перспективы в фитопатологии растений, нацеленной на улучшение и широкое использование этой технологии в растительных исследованиях и молекулярной селекции у сельскохозяйственных растений. Цель работы – создание экспрессионного вектора для редактирования гена EDS1-подобного белка картофеля на антифитовирусную активность.

Материалы и методы

В работе были использованы стандартные методы молекулярной биологии [Green, Sambrook 2012]. Тотальную ДНК экстрагировали из проростков и листьев растений фенольно-детергентным методом. Анализ нуклеотидных секвенций и подбор праймеров проводили с использованием данных ГенБанка <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Промотор картофеля выделяли с помощью HiFi Q5 полимеразы (NEB). Фракционирование ДНК фрагментов

осуществляли в агарозном геле в 1x TAE буфере. Последующую очистку препаратов ДНК выполняли, используя специальные наборы для очистки ДНК ISOLATE II PCR and Gel Kit (BIOLINE) и Quantum Prep™ Freeze`N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad Laboratories). Подбор мишеней к гену EDS1-подобного белка картофеля осуществляли с помощью ряда биоинформатических программ, довольно подробно рассмотренных нами ранее [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2017; Геращенко и др. (Gerashchenkov et al., 2020)]. Лигирование промоторов и мишеней с выступающими 5'-концами осуществляли по AarI концам, используя T4 ДНК лигазу (Thermo Scientific). Созданную конструкцию вводили в бактериальные клетки *E.coli* XL-1 Blue методом трансформации. Осуществляли контрольные ПЦР на наличие фрагмента гена BasR размером 424 п.н. и промотора картофеля pStU6-6 размером 323 п.н. Контроль наличия вставок мишеней выполняли методом секвенирования ДНК на анализаторе ABI 3130.

Ниже приведены основные характеристики локуса, выбранного для редактируемого по данным сайта NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NW_006239107.

1?from=1209133&to=1212961&report=genbank&strand=true);

Gene ID: 102598075, updated on 8-Apr-2017

Gene symbol = LOC102598075

Gene description = protein EDS1-like

Gene type = protein coding

RefSeq status = MODEL

Organism = Solanum tuberosum

Сборка мишени в генно-инженерных конструкциях была осуществлена по сайтам рестриктазы AarI в векторе pBAtC. Вектор pBAtC был любезно предоставлен Jin-Soo Kim через сайт Addgene (Addgene plasmid # 78097; <http://n2t.net/addgene:78097>). Сайт рестриктазы AarI уникален тем, что узнает сайт из 7 нуклеотидов и образует липкие концы, эффективные при лигировании и правильном встраивании гибридного дуплексного олигомера ДНК длиной 23 нуклеотида (Kim et al 2016). Таким образом, использование данного вектора существенно облегчает экспериментальную работу (рис.1).

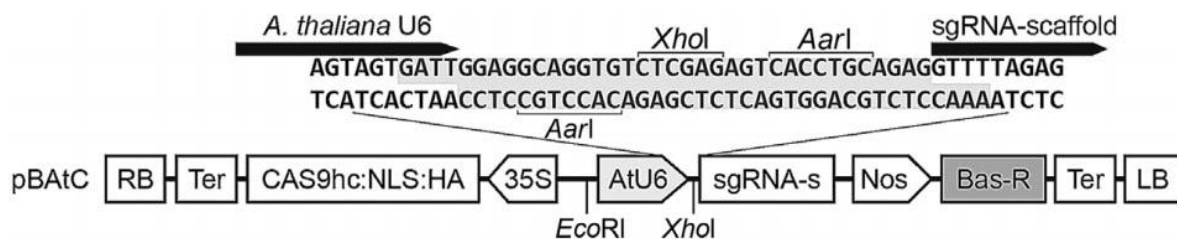


Рис.1. Схема исходной плазмиды pBAtC (приведена по [Kim et al 2016]). Особенности вектора: Тип вектора - Plant Expression, CRISPR; промотор - убикутиновый U6-6; селективный маркер растений - Basta; клонирующий метод - рестриктазно-лигазный; устойчивость бактерий – к спектиномицину.

Результаты и обсуждение

Очевидно, редактирование ортолога гена LOC102598075 EDS1-подобного белка имеет большие перспективы в фитопатологии растений, нацеленной на улучшение и широкое использование этой технологии в растительных исследованиях и молекулярной селекции сельскохозяйственных растений.

Для успешного создания генно-инженерной конструкции нам предстояло решить следующие задачи:

1. Подобрать мишени в гене EDS1-подобного белка картофеля.
2. Заменить промотор.
3. Клонировать мишень гидРНК.
4. Выполнить верификацию проведенных манипуляций методами ПЦР и секвенирования ДНК.

Результаты биоинформатического анализа для отбора наиболее эффективных мишеней в редактируемом локусе EDS1-подобного белка картофеля приведены на рис. 2 - 5.

Экспрессионный вектор для геномного редактирования

The screenshot shows the CRISPR DESIGN TOOLS web interface. The table lists target sequences with columns for Target ID, Target Sequence (5'-3' does not include PAM), PAM, Sense(+), AntiSense(-), Gene Symbol, Gene ID, Efficiency, Specificity, and a breakdown of sites in the genome (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100). The table also includes columns for offTargets and CEL-UTTEPrimer.

Target ID	Target Sequence (5'-3' does not include PAM)	PAM	Sense(+)	AntiSense(-)	Gene Symbol	Gene ID	Efficiency	Specificity	No. of sites in genome 1, 2 or 3 nt different from target sequence	offTargets	CEL-UTTEPrimer
Sequence_0406F	CTTTTGGATCCCTCTTGT	TGG	+			NA	97.43		1 0 0 0 9	View	View
Sequence_1580F	ATTTCGACAGTGCAGAC	AGG	+			NA	99.61		1 0 0 0 7	View	View
Sequence_0106F	GGTACAGTAACTCTTT	TGG	+			NA	96.41		1 0 0 0 5	View	View
Sequence_1581F	TTTGCACAGTGCAGACA	GGG	+			NA	97.79		1 0 0 0 5	View	View
Sequence_0290R	GCCTAGCCCTGATCAAGTA	AGG	-			NA	99.63		1 0 0 0 2	View	View
Sequence_0766F	GAATTTACATCTTTTCGAC	TGG	+			NA	98.88		1 0 0 0 2	View	View
Sequence_1030F	ATTGACACTGAAATGACCT	TGG	+			NA	98.54		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_1189F	AGTGTGATATCCGTAAGT	TGG	+			NA	99.38		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_1272F	CTTGAGCTAGAGGTATAT	GGG	+			NA	99.11		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_1364F	ACTAGGAGACAGTTTCGC	AGG	+			NA	99.24		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_1400F	GGATATTGCAACTATTAC	AGG	+			NA	99.33		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_1439F	TACTGACCTTACTTGATC	AGG	+			NA	99.3		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_0330F	CTGGCAGCTCTCTGTGTC	TGG	+			NA	97.53		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_0434F	GATATGCTCTCATGCCCC	AGG	+			NA	99.54		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_0920R	GTAACTGACAGACATC	AGG	-			NA	99.89		1 0 0 0 1	View	View
Sequence_0874R	ACTACTGACCTTCTGCTT	GGG	-			NA	99.49		1 0 0 0 1	View	View

Рис.2. Биоинформатический поиск мишеней в гене EDS1-подобного белка картофеля (CRISPR DESIGN TOOLS).

The screenshot shows the targetDesign web interface. The table lists target sequences with columns for Best site warning, Target sequence, Position, Strand, GC (%), Region, Potential off-target sites (Max score), and Pairing with sgRNA. The table also includes a column for off-target sites (Max score) and a column for Pairing with sgRNA.

Best site warning	Target sequence	Position	Strand	GC (%)	Region	Potential off-target sites (Max score)	Pairing with sgRNA
	GAAGCTCAGAAATATGACC	4 - 23	+	40.0	CDS	1.000	None
	AAAGTCAGAAATATGACCT	5 - 24	+	35.0	CDS	1.000	None
	TTTAAATATAGGTATGCC	44 - 25	-	30.0	CDS	1.000	8nt
	TCTATTTCTTTGAAATATA	53 - 34	-	15.0	CDS	1.000	None
	ATATTACAGAAATAGAT	35 - 34	+	15.0	CDS	1.000	None
	GAATTTTCTTTGCTTTGC	64 - 33	+	35.0	CDS	1.000	11nt, 10nt
	GTGAGACTTTCTTTTGA	82 - 101	+	40.0	CDS	1.000	None
	GAATTTTCTTTGATGCT	86 - 105	+	35.0	CDS	1.000	8nt
	TGATACAGTACACTCTTT	106 - 125	+	35.0	CDS	1.000	None
	TCTCAAGATGGAACAGAG	168 - 149	-	40.0	CDS	1.000	None
	TTTCCAGCTTTGAGAGTGT	154 - 173	+	35.0	CDS	1.000	8nt, 8nt
	GTGACAGACTTCTCAAGA	179 - 160	-	45.0	CDS	1.000	None
	GAAGATGTTGACAGTATG	165 - 184	+	50.0	CDS	1.000	12nt
	TGACCTGATGAGTACTA	174 - 189	+	50.0	CDS	1.000	8nt
	TAGAGATTTCAAGACATC	213 - 232	+	30.0	CDS	1.000	None
	GAAGAAATTTCACTTAAAG	234 - 253	+	30.0	CDS	1.000	None
	CAAACTTCACTTAAAGAG	257 - 256	+	30.0	CDS	1.000	None
	ATCTCACTTAAAGAGAGG	240 - 259	+	35.0	CDS	0.720	None
	ACTTAAAGAGAGGTGAGA	246 - 265	+	40.0	CDS	0.699	None
	GTGAGAGAGAGATGTGAAA	269 - 278	+	50.0	CDS	0.329	None
	GAAGACAGATGATGTTTC	280 - 299	+	45.0	CDS	0.274	None
	GAAGACAGATGATGTTTC	281 - 300	+	40.0	CDS	0.377	None

Рис.3. Биоинформатический поиск мишеней в гене EDS1-подобного белка картофеля (CRISPR GE)

Экспрессионный вектор для геномного редактирования

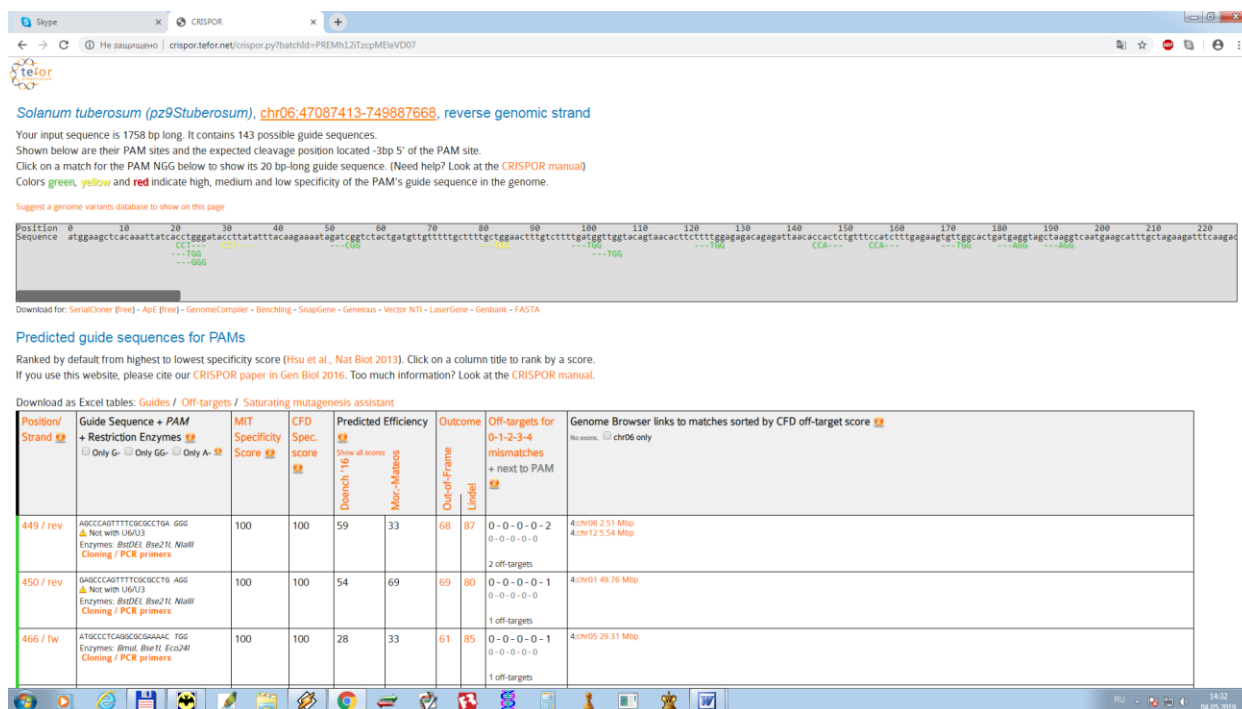


Рис.4. Биоинформатический поиск мишеней в гене EDS1-подобного белка картофеля (CRISPROR)

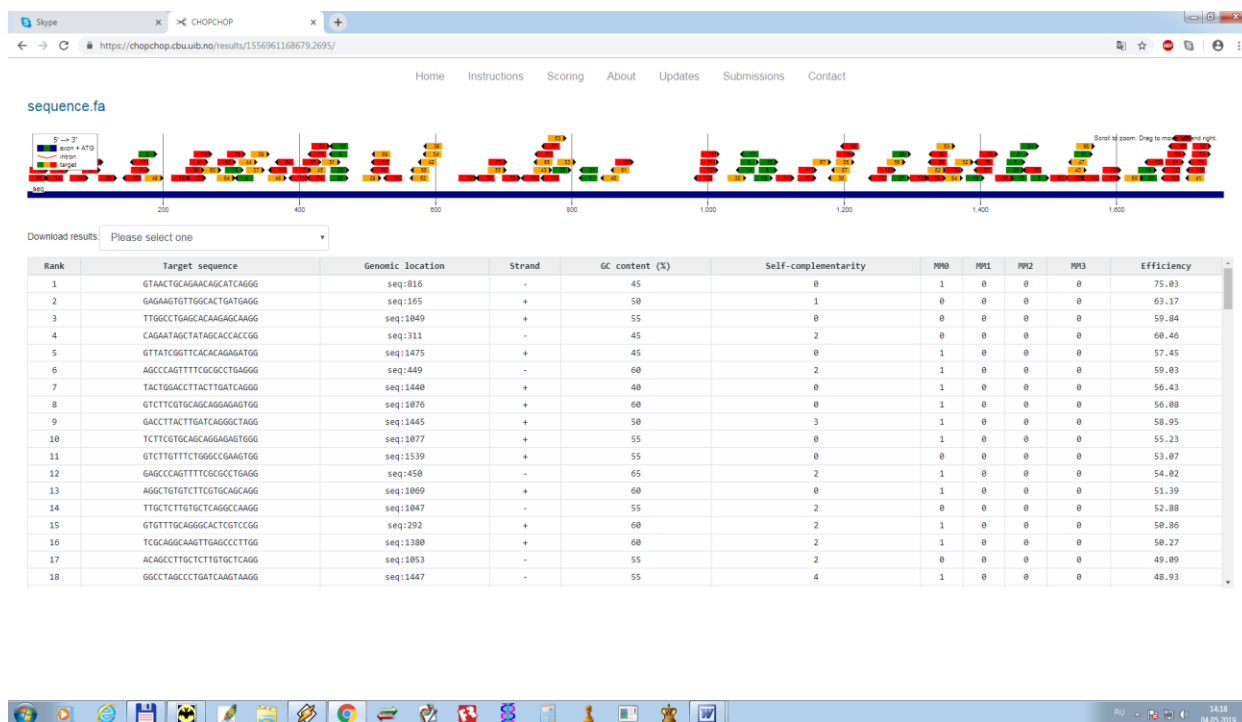


Рис.5. Биоинформатический поиск мишеней в гене EDS1-подобного белка картофеля (CHOP-CHOP)

Биоинформатический ресурс CRISPR DESIGN TOOLS размещен на общем сайте компаний Sigma и Millipore и был использован в связи с простотой дизайна и прямым указанием специфичности мишеней. Программа CRISPR-GE несколько сложнее, при этом она позволила просчитать минимальные риски ложных мишеней при планировании работы. Довольно удобная программа CRISPROR позволила сузить отбор мишеней в анализируемом локусе картофеля EDS1 благодаря охвату нескольких показателей и предсказанной эффективности, выведенной согласно проведенного ранжирования. Программа CHOP-CHOP одна из популярных программ, ранжирующих отбираемые последовательности по эффективности. Показана локализация мишеней в интронах и экзонах, что облегчает работу при планировании функционального анализа редактируемых мишеней.

Таблица.

Мишени гена EDS1-подобного белка картофеля, использованные в работе

№	Мишень	Последовательность
1	146r_S: 146r_A:	gattgTCTCAAAGATGGAAACAGAG AAACctctgtttccatcttgagaC
2	360r_S: 360r_A:	gattgTGTCACCTTCTGGTCTTGTG AAACcacaagaccagaaggtgacaC
3	510r_S: 510r_A:	gattgGAGGAGCAAGCATCATCCTG AAACcaggatgatgcttgctctcC
4	816r_S: 816r_A:	gattgGTAAGTGCAGAACAGCATCA AAACtgatgctgttctgcagttacC

Обозначения: S - смысловая последовательность; A - антисмысловая последовательность. Для удобства восприятия в смысловой (S) последовательности заглавные буквы обозначают 20 буквенную мишень, в антисмысловой (A) последовательности заглавные буквы обозначают липкие концы, предназначенные для клонирования мишени.

Таким образом, биоинформатический анализ намечаемого к редактированию локуса желательно выполнять с привлечением нескольких программ для отбора эффективных мишеней и минимизации побочных эффектов. В итоге были отобраны 4 варианта мишеней, находившиеся в верхней десятке

мишеней, ранжированных по эффективности редактирования во всех четырех биоинформатических программах. Последовательности мишеней гена EDS1-подобного белка картофеля приведены в табл.

Для успешной экспрессии мишени двудольных растений довольно часто используют экспрессионные вектора, в который протоспейсер РНК-гида находится под контролем конститутивного промотора U3 или U6 арабидопсиса, а для однодольных - под контролем U3 или U6 промоторов риса или кукурузы. Тем не менее, для более высокой специфичности в каждом конкретном случае рекомендуют использовать собственный промотор. Именно поэтому мы решили переклонировать промотор U6-6 арабидопсиса на промотор U6-6 картофеля. Контрольные ПЦР, подтверждающие успешность замены промотора в векторе pBAtC, представлены на рис.6 (левая часть).

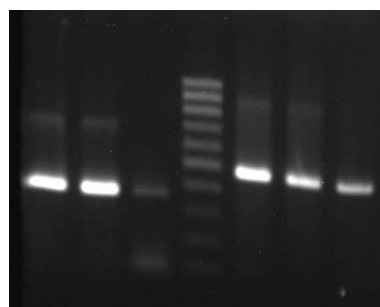


Рис.6. Анализ с помощью ПЦР, подтверждающий переклонирование промотора pStU6-6 323 п.о. в плазмиде pBAtC. Контроль - промотор pStU6-6 размером 323 п.о. (левая часть), контроль - фрагмент гена Bar размером 424 п.о. (правая часть)

Контрольные ПЦР на выделенных плаزمидях подтверждают наличие фрагмента гена Bar размером 424 п.о., характерного для вектора pBAtC (правая часть рис.6). На заключительном этапе мы выполнили секвенирование мишени №3, которое подтвердило правильность нуклеотидной последовательности (рис. 7).

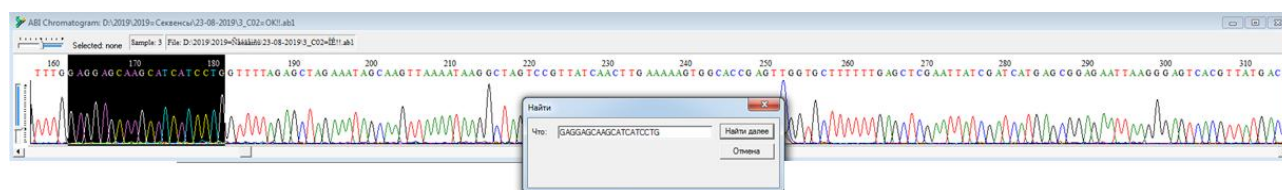


Рис.7. Клонирование мишени №1 гена EDS1 в векторе pBAtC

Актуальность представленной работы обусловлена тем, что гетеродимерные комплексы, содержащие липазоподобный белок EDS1, рассматриваются как центральные регуляторы врожденного иммунитета растений. Так, летом 2019 г. появилась статья [Gantner et al., 2019], посвященная изучению взаимодействию белка EDS1 с белком PHYTOALEXIN DEFICIENT4 (PAD4) в растениях *Nicotiana benthamiana* семейства Solanaceae. Авторы показали, что белковые комплексы на основе EDS1 необходимы для всех тестируемых TNL-зависимых иммунных ответов у *N.benthamiana*. Созданный нами вектор будет использован для биобаллистической трансформации растений картофеля *in vitro*. Таким образом, наша работа будет способствовать выяснению генетических функций белка EDS1 в функционировании иммунитета растений.

Заключение

В результате выполненной работы осуществлен подбор геномной мишени для введения мутаций (последовательности 20 п.н.) в ортолог гена EDS1-подобного белка. Осуществлен дизайн одноцепочечной гидПНК. Для минимизации вариантов ложно-целевых мутаций использованы онлайн биоинформационные ресурсы, такие как CRISPR DESIGN TOOLS, CRISPR GE, CRISPROR, CHOP-CHOP 2.0. Заменен исходный промотор арабидопсиса pAtU6-6 на промотор картофеля pStU6-6 размером 323 п.о.; клонирована мишень №1 гидПНК гена EDS1. Проведена верификация проведенных манипуляций методами ПЦР и секвенирования ДНК.

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) с использованием оборудования ЦКП «Агидель» УФИЦ РАН» по гранту ФЦП №2019-05-595-000-058.

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. DOI: 10.1134/S0026898420010061
2. Макарова С.С., Макаров В.В., Тальянский М.Э., Калинина Н.О. Устойчивость картофеля к вирусам: современное состояние и перспективы //

Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(1):62-73. DOI 10.18699/VJ17.224

3. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Кулуев Б.Р., Рожнова Н.А., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Биоинформатические ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов // *Биомика*. 2017. Т.9(3). С. 202-226.
4. 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. Vol. 31. p. 2456–2474. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00099>
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. 10.1111/jipb.12474
7. 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 Mar;29(5):569-79.
8. Rogers E.E., Ausubel F.M. Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 gene expression // *Plant Cell*. 1997 Mar;9(3):305-16. DOI: 10.1105/tpc.9.3.305
9. Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. Mechanisms of plant resistance to viruses // *Nat Rev Microbiol*. 2005 Oct;3(10):789-98. DOI: 10.1038/nrmicro1239

References

1. Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Gerashchenkov G.A., Kuluev B.R., Rozhnova N.A., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Gubaidullin I.M., Chemeris A.V. Bioinformatic resources for CRISPR/Cas genome editing, *Biomics*, 2017, vol. 9, no. 3, pp. 203-228. (In Russian)
2. Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Kuluev B.R., Kiryanova O.Yu., Gumerova G.R., Knyazev A.V., Vershinina Z.R., Mikhailova E.V., Chemeris D.A., Matniyazov R.T., Baimiev An.Kh., Gubaidullin I.M., Baimiev Al.Kh., Chemeris A.V. Design of guide RNA for CRISPR/Cas plant genome editing. *Molecular Biology*. 2020. V.54(1).
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. Vol. 31. p. 2456–2474. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00099>

4. Green, M. and Sambrook, J. (2012) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
5. 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. 10.1111/jipb.12474
6. Makarova S.S., Makarov V.V., Taliansky M.E., Kalinina N.O. Resistance to viruses of potato: current status and prospects. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017. V.21(1). P. 62-73. DOI 10.18699/VJ17.224 (In Russian)
7. 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 Mar;29(5):569-79.
8. Rogers E.E., Ausubel F.M. Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 gene expression // *Plant Cell.* 1997 Mar;9(3):305-16. DOI: 10.1105/tpc.9.3.305
9. Soosaar J.L., Burch-Smith T.M., Dinesh-Kumar S.P. Mechanisms of plant resistance to viruses // *Nat Rev Microbiol.* 2005 Oct;3(10):789-98. DOI: 10.1038/nrmicro1239