



ЭКСПРЕССИОННЫЕ ВЕКТОРА ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ КАФИРИНОВ (*k1C5*, *gKAF1*) И ГЕНА *AMEIOTIC 1* У СОРГО С ПОМОЩЬЮ АГРОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

¹Герашенков Г.А., ²Эльконин Л.А., ¹Рожнова Н.А.

¹ 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

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный аграрный научный центр сельского хозяйства Юго-Востока», Россия, 410010, г. Саратов, ул. Тулайкова, 7

Резюме

Одним из эффективных подходов для улучшения питательной ценности зерна сорго является получение мутантов с частично или полностью заблокированным синтезом или измененным аминокислотным составом запасных белков – кафиринов. Использование метода геномного редактирования позволяет решить эту проблему путем внесения мутаций в нуклеотидные последовательности генов α - и γ -кафиринов (*k1C5* и *gKAF1*). Другим важным направлением в генетике и селекции сельскохозяйственных растений является разработка и использование технологий апомиксиса для фиксации гетерозиса у гибридов F₁. Ген *DYAD* арабидопсиса и его гомолог *AMEIOTIC 1* – это потенциальные гены-кандидаты апомиксиса, вовлеченные в нормальное протекание мейоза, индукция мутаций в которых является одним из путей для решения данной проблемы. В ходе исследований осуществлен подбор геномных мишеней (последовательности 20 п.н.) для введения мутаций в гены α - и γ -кафиринов сорго и гена *AMEIOTIC 1* посредством технологии геномного редактирования CRISPR/Cas. Дизайн гидовых РНК выполнен с использованием биоинформатических программ CRISPROR и CHOPCHOP. Клонирование мишеней α - и γ -кафиринов сорго и *AMEIOTIC 1* в вектор pBatC осуществляли по сайтам AarI. Валидацию успешности клонирования мишеней выполняли секвенированием ДНК. Генно-инженерные конструкции были перенесены посредством электропорации в агробактериальный штамм AGL0. В настоящее время созданные вектора используются для агробактериальной трансформации растений сорго.

Ключевые слова: CRISPR, геномное редактирование, α -кафирин, γ -кафирин, *AMEIOTIC 1*, вектор pBatC, секвенирование ДНК, сорго

Цитирование: Герашенков Г.А., Эльконин Л.А., Рожнова Н.А. Экспрессионные векторы для редактирования генов кафиринов (*k1C5*, *gKAF1*) и гена *AMEIOTIC 1* у сорго с помощью агробактериальной трансформации // Биомика. 2020. Т.12(4). С. 520-531. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-46

© Авторы

EXPRESSION VECTORS FOR EDITING KAFIRIN (*k1C5*, *gKAF1*) AND *AMEIOTIC 1* GENES IN SORGHUM BY AGROBACTERIAL TRANSFORMATION

¹Gerashchenkov G.A., ²Elkonin L.A., ¹Rozhnova N.A.

¹Institute 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

²Federal Agricultural Scientific Center of the South-East, 7 Tulaikov Street, 410010, Saratov, Russia

Resume

One of the effective approaches to improve the nutritional value of sorghum grains is the production of mutants with partially or completely blocked synthesis or the altered amino acid composition of seed storage proteins - kafirins. The usage of the genomic editing method allows to solve this problem by introducing mutations into the nucleotide sequences of the genes encoding α - and γ -kafirins (*k1C5* and *gKAF1*). Another important area in the genetics and selection of agricultural plants is the development and use of apomixis technologies to fix

heterosis in F₁ hybrids. The *DYAD* arabidopsis gene and its homolog *AMEIOTIC 1* are the potential apomixis candidate genes involved in the normal course of meiosis, the induction mutations in which is one of the way to solve this problem. In the course of research, the genomic targets (20 bp sequences) were selected to introduce mutations into the genes of α - and γ -kafirins of sorghum and *AMEIOTIC 1* gene through CRISPR/Cas genomic editing technology. Guide RNA design was performed using bioinformatic programs CRISPROR and CHOPCHOP. Cloning of the α - and γ -kafirins and *AMEIOTIC 1* targets of sorghum into vector pBatC was carried out at sites *AarI*. Validation of the success of target cloning was performed by DNA sequencing. The created constructions were transferred by electroporation to the agrobacterial strain AGL0. Currently, the created vectors are used for the agrobacterial transformation of sorghum plants.

Keywords: CRISPR, genomic editing, α -kafirin, γ -kafirin, *AMEIOTIC 1*, pBatC vector, DNA sequencing, sorghum

Citation: Gerashchenkov G.A., Elkonin L.A., Rozhnova N.A. Expression vectors for editing kafirin (*k1C5*, *gKAF1*) and *AMEIOTIC 1* genes in sorghum by agrobacterial transformation. *Biomcs*. 2020. Vol. 12(4). P. 520-531.

DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-46 (In Russian)

© The Authors

Введение

Среди множества биотехнологических подходов для улучшения свойств сельскохозяйственных растений ключевое место принадлежит геномному редактированию. В отличие от традиционных стратегий и методов селекции, технология CRISPR/Cas обеспечивает быстрый путь к созданию модифицированных генотипов за счет точного редактирования нуклеотидных последовательностей нужных генов [Zhu et al., 2020]. К настоящему времени использование технологии CRISPR/Cas позволило модифицировать множество агрономически-важных признаков у основных возделываемых культур, таких как кукуруза, рис, пшеница, картофель, соя, сахарный тростник и др. [Zhang et al., 2018; Kim, Kim, 2019].

Сорго (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) входит в число пяти важнейших злаковых культур, возделываемых на Земном шаре, и является источником питания для сотен миллионов людей. В связи с глобальным потеплением климата значение этой культуры будет неуклонно возрастать. Зерно сорго не содержит белков клейковины (глютена) и может служить источником белка для больных целиакией (непереносимость глютена), которые вынуждены соблюдать безглютеновую диету. Однако, в отличие от других злаков, зерно сорго имеет более низкую питательную ценность, главной причиной которой является устойчивость запасных белков зерна (кафиринов) к протеолитическому расщеплению [Belton et al., 2006; Henley et al., 2010; Bean et al., 2018].

Использование технологии CRISPR/Cas открывает заманчивые перспективы для решения этой проблемы. Индукция мутаций в генах, кодирующих разные классы кафиринов, в том числе, нокаут этих генов с помощью методов редактирования генома, может существенно улучшить перевариваемость белков зерна сорго и повысить его питательную ценность, поскольку подавление синтеза отдельных

классов кафиринов ведет к изменению ультраструктуры белковых телец и повышению их перевариваемости протеазами [Da Silva et al., 2011a; Kumar et al., 2012; Эльконин и др., 2016], а также к увеличению содержания лизина [Da Silva et al., 2011b; Эльконин и др., 2016] за счет балансировки протеома зерновок и усиления синтеза других белков, в том числе, с более высоким содержанием незаменимых аминокислот [Kumar et al., 2012]. Недавно опубликованная работа по индукции мутаций в нуклеотидной последовательности α -кафирина показала перспективность использования системы CRISPR/Cas9 для улучшения питательной ценности зерна сорго [Li et al., 2018]. Анализ многочисленных работ показывает, что использование подходов CRISPR/Cas для редактирования геномов растений имеет ряд особенностей, которые необходимо учитывать в экспериментах [Кулуев и др. (Kuluev et al.), 2019; 2019a].

Ген *AMEIOTIC 1* является одним из ключевых генов, контролирующих мейоз у растений. Как было показано у кукурузы, этот ген влияет на установление структуры мейотической хромосомы, поведение мейозных теломер, мейотическую рекомбинацию, спаривание, синапсис и формирование мейоз-специфического цитоскелета [Pawlowski et al., 2009; Nan et al., 2011]. В результате этой активности у большинства мутантов по гену *AMEIOTIC 1* премейотические клетки попадают в митоз вместо мейоза. Это особенность может стать ключевой для биоинженерии апомиксиса.

Цель работы - создание высокоэффективных векторов и агробактериальных штаммов для редактирования нуклеотидных последовательностей генов α - и γ -кафиринов и *AMEIOTIC 1* сорго.

Материалы и методы

В качестве базового вектора для введения мишеней использовали pBatC [Kim et al., 2016]. Биоинформатический анализ нуклеотидных

последовательностей вектора вели с помощью программы SnapGene Viewer. Анализ нуклеотидных последовательностей генов кафиринов сорго и выбор мишеней проводили с использованием данных ГенБанка <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (GeneBank accession no. X62480 и Y17556.1, для γ - и 22 kDa α -кафиринов, соответственно), при этом в качестве мишеней для редактирования были выбраны участки сигнальных последовательностей этих генов.

Последовательность гена *AMEIOTIC 1* получена на сайте NCBI, NCBI Reference Sequence: NM_001146066.1. Подбор мишеней осуществляли с помощью биоинформационных программ CRISPOR и CHOPCHOP, довольно подробно рассмотренных нами ранее [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2017; Геращенко и др. (Gerashchenkov et al.), 2020].

В работе использовали общепринятые методы молекулярного клонирования [Green, Sambrook, 2012]. Выделение и очистку препаратов ДНК плазмид выполняли, используя наборы для очистки ДНК ISOLATE II PCR and Gel Kit (BIOLINE) и Quantum PrepTM Freeze'N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Columns (Bio-Rad Laboratories). Вектор pBAtC обрабатывали рестриктазой *AarI* (New England

Biolabs). Лигирование мишеней и плазмид с выступающими 5'-концами осуществляли, используя T4 ДНК лигазу (Thermo Scientific). Созданные конструкции вводили в бактериальные клетки *E. coli* XL-1 Blue методом трансформации. Рекомбинантные плазмиды были подвергнуты секвенированию с праймером -486_RSP: ccttctccgtcgaactttctct, используя генетический анализатор ABI 3130 (Applied Biosystems). Созданные вектора были перенесены посредством электропорации в агробактериальный штамм AGL0.

Результаты и обсуждение

Для успешного создания генно-инженерных конструкций нам предстояло решить следующие задачи:

1. Выполнить биоинформатический анализ и подобрать мишени в генах кафиринов *k1C5* и *gKAF1* и *AMEIOTIC 1* сорго.
2. Клонировать мишени гидРНК в вектор pBAtC, генетическая карта которого представлена на рис.1.
3. Выполнить верификацию вновь сконструированных векторов посредством секвенирования ДНК.

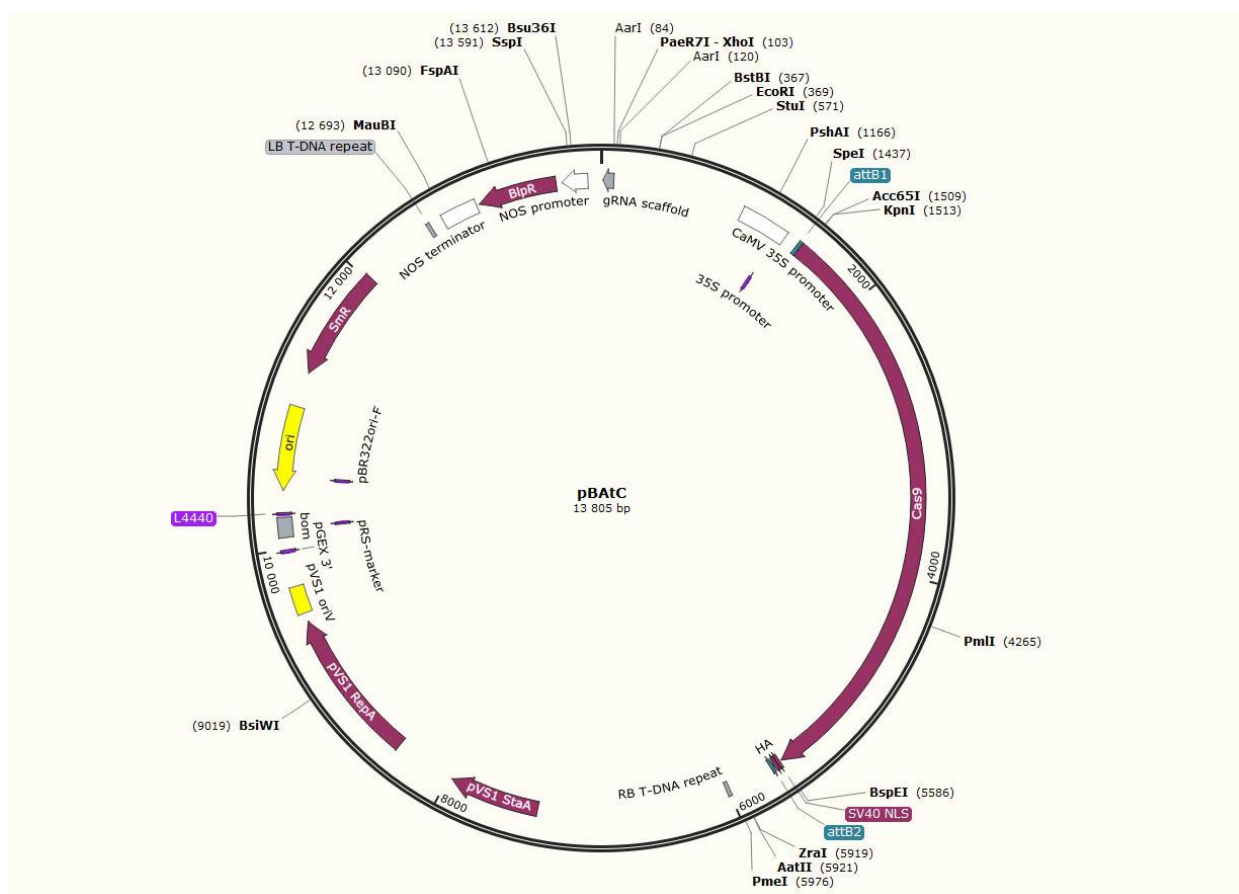


Рис.1. Вектор pBAtC, используемый для создания серии экспрессионных векторов.

Figure 1. The pBAtC vector used to create a series of expression vectors.

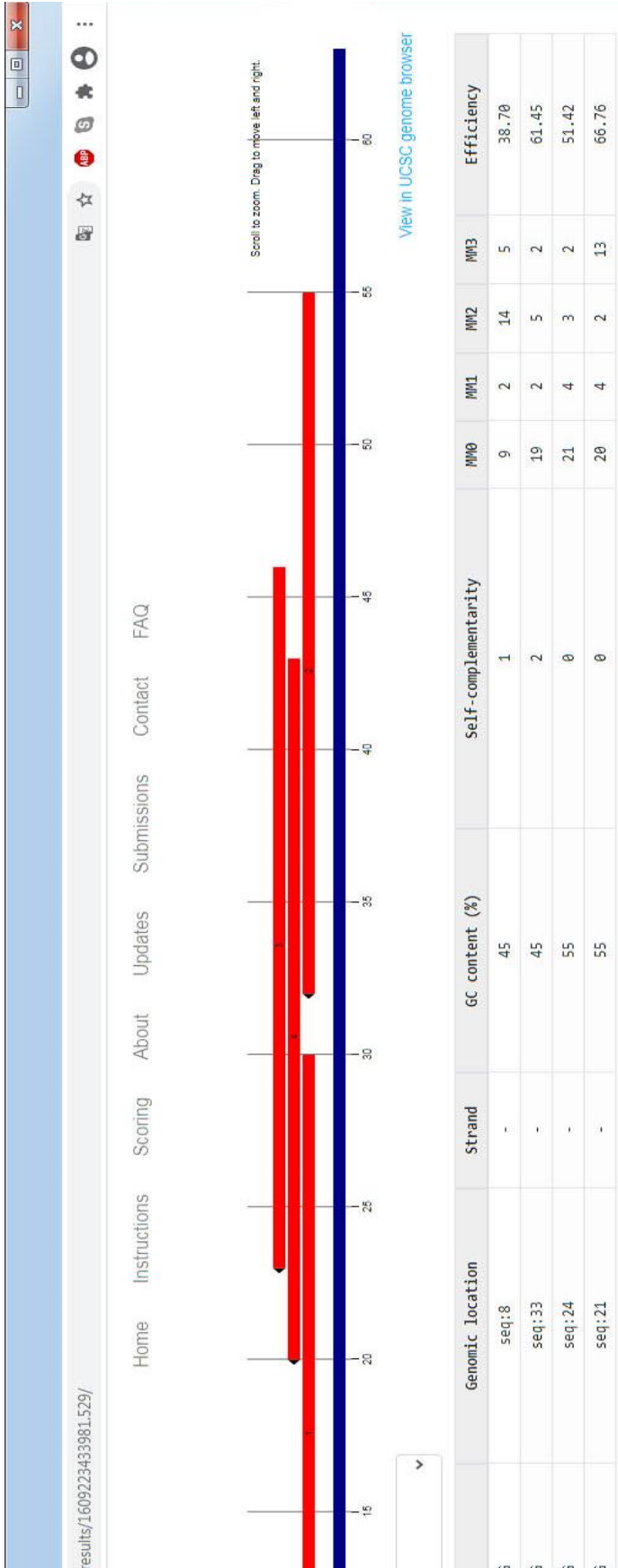


Рис. 1. Биоинформатический поиск мишеней в сигнальной последовательности гена альфа-кафиринов сорго (ChopChop).
Figure 1. Bioinformatic search for targets in the signal peptide-encoding sequence of the α -KAFIRIN gene using the ChopChop online tool.

Predicted guide sequences for PAMs

Ranked by default from highest to lowest specificity score (Hsu et al., Nat Biot 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 ☐ Only G- ☐ Only GG- ☐ Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency Doench '16 	Outcome Out-of-Frame Indel	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM 	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score
32 / fw	GCTGCTGCTCTGCTCTCC TGG Enzymes: <i>SpyDI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>MwoI</i> , <i>BstNI</i> Cloning / PCR primers	94	97	37	53	64	4:chromosome_3 45.32 Mbp 3:chromosome_6 45.72 Mbp 4:chromosome_5 12.29 Mbp show all...
41 / fw	CCTGCTGCTCTGCTCTCG CGG Enzymes: <i>BspFNI</i> , <i>TauI</i> , <i>MwoI</i> , <i>Fsp4HI</i> , <i>BstC8I</i> Cloning / PCR primers	89	93	57	58	78	3:chromosome_1 66.84 Mbp 4:chromosome_1 72.31 Mbp 4:chromosome_5 26.36 Mbp show all...
30 / rev	CGGCGCTGCGCCGAGAGCC AGG Inefficient High GC content Enzymes: <i>SpyDI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>MwoI</i> , <i>BstNI</i> Cloning / PCR primers	84	83	32	53	71	4:super_13 2.52 Mbp 3:chromosome_9 12.74 Mbp 4:chromosome_6 51.84 Mbp show all...
20 / rev	CGGAGAGCCAGGAGCGCA GGG Enzymes: <i>MwoI</i> Cloning / PCR primers	77	88	54	40	73	4:chromosome_7 53.66 Mbp 4:chromosome_1 70.39 Mbp 4:chromosome_8 2.93 Mbp show all...
21 / rev	CCGCGAGAGCCAGGAGCG AGG Enzymes: <i>MwoI</i> Cloning / PCR primers	59	80	49	41	81	4:chromosome_3 12.35 Mbp 4:chromosome_3 8.96 Mbp 2:chromosome_3 4.06 Mbp show all...

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

Рис. 2. Биоинформатический поиск мишеней в сигнальной последовательности гена гамма-кафиринов сорго (CRISPOR).
Figure 2. Bioinformatic search for targets in the signal peptide-encoding sequence of the γ -KAFIRIN gene using the CRISPOR online tool.



Рис.3. Отбор мишеней в гене *AME10T1C1* с использованием программы ChopChor
Figure 3. Selection of targets in the *AME10T1C1* gene using ChopChor online tool

Биоинформационный анализ и дизайн праймеров.

Учитывая, что сигнальные последовательности играют важную роль в упаковке кафиринов в белковые тельца, и, следовательно, в накоплении белка в зерне сорго, в качестве мишеней для гидРНК нами были выбраны нуклеотидные последовательности, кодирующие эти части молекул α - и γ -кафиринов. Именно точечная мутация в сигнальной последовательности 22 kDa α -кафирина отличает мутант *hdhl* с высокой перевариваемостью кафиринов и высоким содержанием лизина от других сортов сорго [Wu et al., 2013].

Биоинформатический анализ сигнальной последовательности α -кафирина размером 63 нуклеотида (ATGGCTACCAAGATATTTGTCCTCCTTGCGCTCC TTGCTCTTTCAGTGAGCACAACAAGTCA) на геномной цепи *Sorghum bicolor* (pz9Sbicolor) chromosome_5:58133820-58133882 с использованием программ CRISPOR (данные не приведены) и

ChopChop (рис.1) позволил выявить 4 мишени, из которых были отобраны две с лучшими показателями.

Такой же анализ сигнальной последовательности γ -кафирина размером 57 нуклеотидов (ATGAAGGTGTTGCTCGTTGCCCTCGCTCTCCTGG CTCTCGCGGCGAGCGCCGCTCC) на геномной цепи *Sorghum bicolor* (pz9Sbicolor) chromosome_2:60425298-60425354 с использованием программ CRISPOR (рис.2) и ChopChop (данные не приведены) позволил выявить 5 мишеней, из которых были отобраны тоже две с лучшими показателями. На основе этих мишеней был осуществлен дизайн олигонуклеотидов для последующего клонирования гидРНК/Cas9 векторов.

Биоинформатический анализ, направленный на поиск мишеней в гене *AMEIOTIC 1*, был выполнен с использованием программ ChopChop (рис.3) и CRISPOR (данные не приведены).

Олигонуклеотиды, использованные для формирования мишеней, приведены в таблице.

Таблица.

Мишени генов кафиринов и гена *AMEIOTIC 1* сорго, использованные в работе

Targets of the kaffirin and *AMEIOTIC 1* sorghum genes used in the study

№№ Nos	Название мишени Target name	Нуклеотидная последовательность Nucleotide sequence	Созданный вектор Created vector
1	α 33r_F	GATTGttgtgctcactgaaagagca	p05
	α 33r_R	AAACtgctctttcagtgagcacaac	
2	α 24r_F	GATTGctgaaagagcaaggagcgca	p06
	α 24r_R	AAACtgctgctcttgctcttcagc	
3	γ 12f_F	GATTGgctcgttgccctgctctcc	p07
	γ 12f_R	AAACggagagcgagggaacgagcC	
4	γ 21f_F	GATTGcctcgtctctctgctctcg	p08
	γ 21f_R	AAACcgagagccaggagagcgaggC	
5	705rZmAm1_F	GATTGggcgccatcgacttcaacg	p09
	705rZmAm1_R	AAACcgttgaagtgcgatggcgccC	
6	745rZmAm1_F	GATTGgcccgtccaatgtacctgacg	p10
	745rZmAm1_R	AAACcgtcaggtacattggacggcC	

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

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

Дизайн и клонирование гидРНК/Cas9 векторов для редактирования генов кафиринов сорго. Использовали оптимальный сайт мишени N20-NGG (сайт гидРНК + PAM). Для эффективной транскрипции гидРНК под контролем промотора OsU3 (ДНК полимераза III), используя G как 5' терминальные нуклеотиды гидРНК. 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 N₂₀-NGG (gRNA + PAM site). Дизайн прямых олигонуклеотидов имеет вид: 5'-GATTG - N₁₋₂₀ -3'. Дизайн обратных

олигонуклеотидов выглядит следующим образом: 5'-AAAC - последовательность, комплементарная N₁₋₂₀ -3'. Двучепочный олигонуклеотид в качестве мишени может быть легко получен отжигом прямого и обратного праймеров (Таблица).

Секвенирование мишеней генов кафиринов и гена *ameiotic 1*. Успешное клонирование мишеней при получении векторов p05, p06, p07, p08, p09 и p10 было подтверждено секвенированием, используя праймер -486_RSP: ccttctccgtcgaaatttctct. Результаты секвенирования подтвердили успешность клонирования для всех выбранных мишеней (рис. 4 - рис. 9).

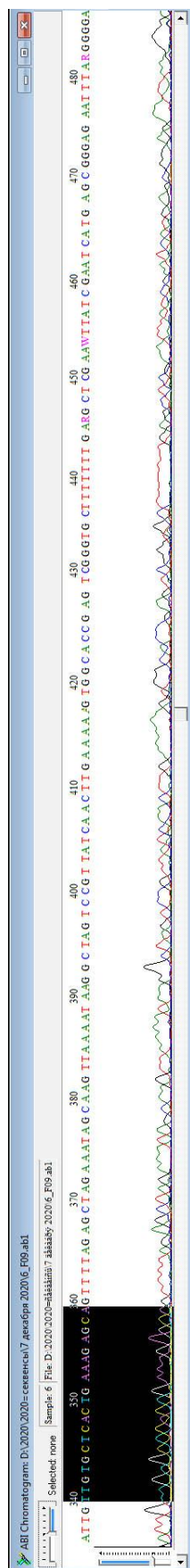


Рис. 4. Верификация результатов клонирования мишени 05 гена альфа-кафирина в rVAtC вектор, используя ДНК секвенирование

Figure 4. Verification of cloning results of target 05 of alpha-kafrin gene into pBAtC vector using DNA sequencing

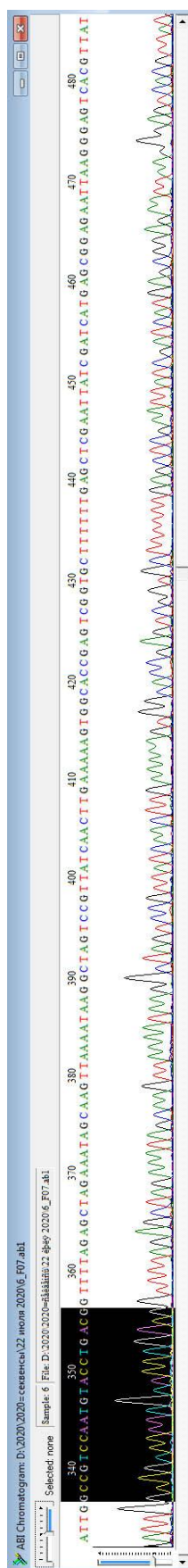


Рис. 5. Верификация результатов клонирования мишени 06 гена альфа-кафирина в rBAtC вектор, используя ДНК секвенирование

Figure 5. Verification of cloning results of target 06 of alpha-kafirin genes into pBatC vector using DNA sequencing

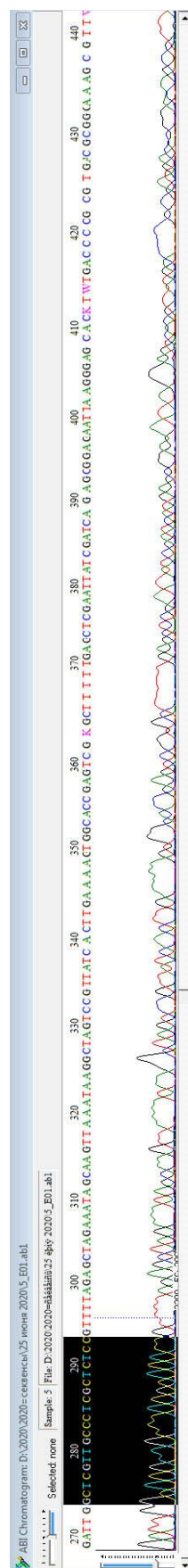


Рис. 6. Верификация результатов клонирования мишени 07 гена гамма-кафирина в rVAtC вектор, используя ДНК секвенирование

Figure 6. Verification of cloning results of target 07 of gamma-kafirin genes into pBAtC vector using DNA sequencing

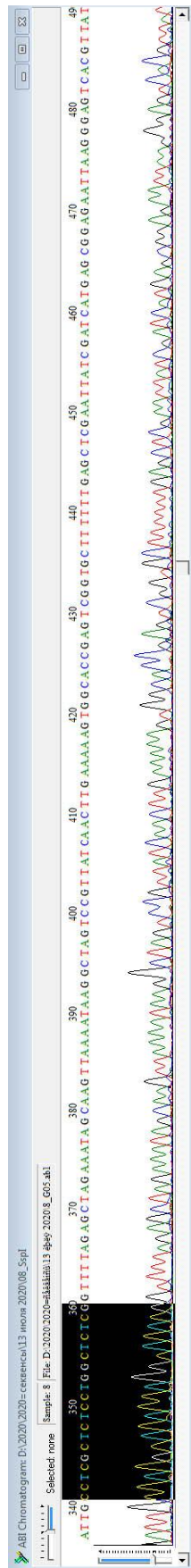


Рис. 7. Верификация результатов клонирования мишени 08 гена гамма-кафирин в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование
Figure 7. Verification of cloning results of target 08 of gamma-kafirin genes into pBAtC vector using DNA sequencing

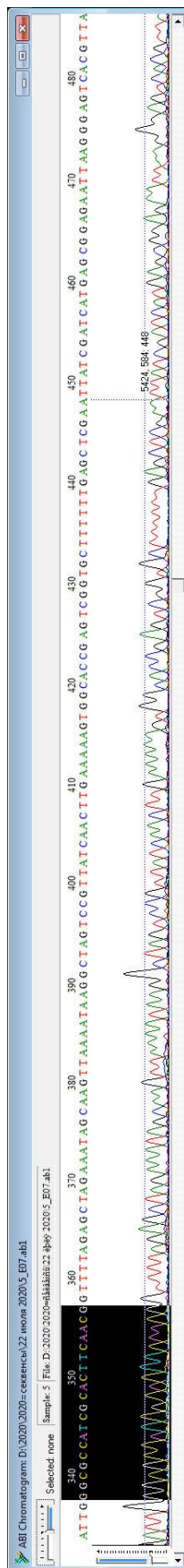


Рис. 8. Верификация результатов клонирования мишени 09 гена AMEJOTC 1 в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование
Figure 8. Verification of cloning results of target 09 AMEJOTC 1 gene into pBAtC vector using DNA sequencing

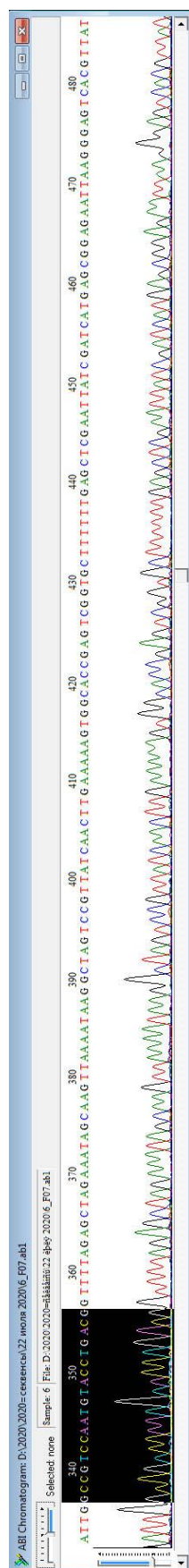


Рис. 9. Верификация результатов клонирования мишени 10 гена AMEJOTC 1 в pBAtC вектор, используя ДНК секвенирование
Figure 9. Verification of cloning results of target 10 AMEJOTC 1 gene into pBAtC vector using DNA sequencing

Заключение

Известно, что уже к середине этого столетия население Земли достигнет 9,6 млрд. чел., и потребности в основных выращиваемых культурах увеличатся до 60% [Tilman et al., 2011]. При этом, наиболее перспективным подходом для создания новых сортов сельскохозяйственных культур представляется использование методов геномного редактирования, которые позволяют вносить изменения непосредственно в гены, кодирующие нужные признаки [Koerppel et al., 2019; Kim, Kim, 2019]. CRISPR/Cas подход, в частности, открывает новые возможности для решения проблем улучшения качества зерна сорго за счет модификации нуклеотидных последовательностей генов кафиринов [Эльконин и др. (Elkonin et al.), 2019], а также создания линий с элементами апомиксиса на основе мутаций гена *AMEIOTIC 1* [Pawlowski et al., 2009; Nan et al., 2011]. В настоящее время созданные вектора используются в агробактериальной трансформации растений сорго.

Благодарности

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, грант №19-016-00117 «Редактирование генов гамма- и альфа-кафиринов для создания линий сорго с улучшенной питательной ценностью» (научный руководитель Эльконин Л.А.). 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., Гумерова 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 РНКгидов для CRISPR/CAS редактирования геномов растений // Молекулярная биология. 2020. Т.54(1). С. 29-50. DOI: 10.1134/S0026898420010061
2. Кулуев Б.Р., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Доставка CRISPR/Cas-компонентов в клетки высших растений для редактирования их геномов // Физиология растений. 2019. Т.66, № 5. С. 339-353. doi: 10.1134/S0015330319050117
3. Кулуев Б.Р., Кирьянова О.Ю., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Гумерова Г.Р., Вершинина З.Р., Матниязов Р.Т., Ахметзянова Л.У., Князев А.В., Михайлова Е.В., Гарафутдинов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Губайдуллин И.М., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Некоторые новшества в CRISPR/Cas геномном редактировании и в смежных областях // Биомика. 20196. Т.11(3). С. 315-343. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-27
4. 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
5. 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.
6. Эльконин Л.А., Итальянская Ю.В., Доманина И.В., Селиванов Н.Ю., Ракитин А.Л., Равин Н.В. Трансгенное сорго с улучшенной перевариваемостью запасных белков, полученное путем агробактериальной трансформации // Физиология растений. 2016. Т.63. №5. С.721-734. DOI: 10.7868/S0015330316050043
7. Эльконин Л.А., Панин В.М., Кенжегулов О.А., Геращенко Г.А. Улучшение питательных свойств зернового сорго на основе методов современной генетики и биотехнологии. Биотехнология и селекция растений // 2019. Т.2(3). С.41-48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-06
8. Bean S.R., Iorger B.P., Wilson J.D. et al. (2018) Structure and chemistry of sorghum grain // In: W Rooney (ed.). Achieving sustainable cultivation of sorghum. Vol. 2: Sorghum utilization around the world. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing. p. 1-27.
9. Belton PS, Delgadillo I, Halford NG, Shewry PR (2006) Kafirin structure and functionality. *J. Cereal Sci.* 44: 272–286. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.05.004
10. da Silva L.S., Taylor J., Taylor J.R. (2011) Transgenic sorghum with altered kafirin synthesis: kafirin solubility, polymerization, and protein digestion // *J. Agric. Food Chem.* 59: 9265–9270. DOI: 10.1021/jf201878p
11. da Silva L.S., Jung R., Zhao Z., Glassman K., Taylor J., Taylor J.R.N. (2011a). Effect of suppressing the synthesis of different kafirin subclasses on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines // *J. Cereal Sci.* V. 54. P. 160–167. doi: 10.1016/j.jcs.2011.04.009
12. Green, M. and Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, 2012. V. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
13. Henley E.C., Taylor J.R.N., Obukosia S.D. (2010) The Importance of Dietary Protein in Human Health: Combating Protein Deficiency in Sub-Saharan Africa through Transgenic Biofortified Sorghum // In: SL Taylor (ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. Burlington, USA: Academic Press, 60: 21–52. DOI: 10.1016/S1043-4526(10)60002-2

14. 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
15. Kim, J., Kim, J. New era of precision plant breeding using genome editing // *Plant Biotechnol. Rep.* V.13, 419–421 (2019). doi: 10.1007/s11816-019-00581-w
16. Koeppel I., Hertig C., Hoffie R., Kumlehn J. Cas endonuclease technology - a quantum leap in the advancement of barley and wheat genetic engineering // *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20: 2647. DOI: 10.3390/ijms20112647
17. Kumar T, Dweikat I, Sato S., Ge Z., Nersesian N., Chen H., Elthon T., Bean S., Ioerger B.P., Tilley M. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V.10: 533–544. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x
18. Li A., Jia S., Yobi A., Ge Z., Sato S.J., Zhang C., Angelovici R., Clemente T.E., Holding D.R. Editing of an alpha-kafirin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum // *Plant Physiol.* 2018. V.177(4). P. 1425-1438. DOI: 10.1104/pp.18.00200
19. Nan G.-L., Ronceret A., Wang R.C., Fernandes J. F., Cande W.Z., Walbot V. Global transcriptome analysis of two ameiotic1 alleles in maize anthers: defining steps in meiotic entry and progression through prophase I // *BMC Plant Biol.* 2011. 11: 120. doi: 10.1186/1471-2229-11-120
20. Pawlowski W.P., Wang C.-J. R., Golubovskaya I.N., Szymaniak J.M., Shi L., Hamant O., Zhu T., Harper L., Sheridan W.F., Cande W.Z. Maize AME10TIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. V.106(9). P.3603-3608. doi: 10.1073/pnas.0810115106
21. Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. & Befort, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V.108. P. 20260–20264. doi: 10.1073/pnas.1116437108
22. Wu Y., Yuan L., Guo X., Messing J. Mutation in the seed storage protein kafirin creates a high-value food trait in sorghum // *Nature Commun.* 2013. V. 4. P. 2217 DOI: 10.1038/ncomms3217
23. Zhu H., Li C. & Gao C. Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2020). doi: 10.1038/s41580-020-00288-9
24. Zhang Y., Massel K., Godwin I.D., Gao C. Applications and potential of genome editing in crop improvement // *Genome Biology.* 2018. V.19: 210. doi: 10.1186/s13059-018-1586-y

References

1. Bean S.R., Ioerger B.P., Wilson J.D. et al. (2018) Structure and chemistry of sorghum grain // In: W Rooney (ed.). Achieving sustainable cultivation of sorghum. Vol. 2: Sorghum utilization around the world. Cambridge, UK: Burleigh Dodds Science Publishing. p. 1-27.
2. Belton PS, Delgadillo I, Halford NG, Shewry PR (2006) Kafirin structure and functionality. *J. Cereal Sci.* 44: 272–286. DOI: 10.1016/j.jcs.2006.05.004
3. 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. V.9(3). P. 203-228. (In Russian)
4. da Silva L.S., Taylor J., Taylor J.R. Transgenic sorghum with altered kafirin synthesis: kafirin solubility, polymerization, and protein digestion. *J. Agric. Food Chem.* 2011. V.59. P.9265–9270. DOI: 10.1021/jf201878p
5. da Silva L.S., Jung R., Zhao Z., Glassman K., Taylor J., Taylor J.R.N. Effect of suppressing the synthesis of different kafirin subclasses on grain endosperm texture, protein body structure and protein nutritional quality in improved sorghum lines. *J. Cereal Sci.* 2011a. V. 54. P. 160–167. doi: 10.1016/j.jcs.2011.04.009
6. Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Domanina I.V., Selivanov N.Yu., Rakitin A.L., Ravin N.V. Transgenic Sorghum with Improved Digestibility of Storage Proteins Obtained by *Agrobacterium*-mediated Transformation. *Russ J. Plant Physiol.* 2016. V. 63(5). P. 678-689. DOI: 10.1134/S1021443716050046
7. Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Gerashchenkov G.A. Improvement of grain sorghum nutritive properties using modern genetic and biotechnological methods. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2019. V.2(3). P.41-48. DOI: 10.30901/2658-6266-2019-3-o6 (In Russian)
8. 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., and Chemeris A. V. Design of Guide RNA for CRISPR/Cas Plant Genome Editing. *Russian Journal of Molecular Biology.* 2020. V. 54, No. 1, P. 24–42. doi: 10.1134/S0026893320010069
9. Green, M. and Sambrook, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th Edition, 2012. V. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
10. Henley E.C., Taylor J.R.N., Obukosia S.D. (2010) The Importance of Dietary Protein in Human Health: Combating Protein Deficiency in Sub-Saharan Africa through Transgenic Biofortified Sorghum. In: SL

- Taylor (ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. Burlington, USA: Academic Press, 60: 21–52. DOI: 10.1016/S1043-4526(10)60002-2
11. Kim H., Kim S.T., Ryu J., Choi M.K., Kweon J., Kang B.C., Ahn H.M., Bae S., Kim J.S., Kim S.G. 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
12. Kim, J., Kim, J. New era of precision plant breeding using genome editing. *Plant Biotechnol. Rep.* 2019. V.13. P. 419–421. doi: 10.1007/s11816-019-00581-w
13. Koeppel I., Hertig C., Hoffie R., Kumlehn J. Cas endonuclease technology - a quantum leap in the advancement of barley and wheat genetic engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, 20: 2647. DOI: 10.3390/ijms20112647
14. Kuluev B. R., Gumerova G. R., Mikhaylova E. V., Gerashchenkov G. A., Rozhnova N. A., Vershinina Z. R., Khyazev A. V., Matniyazov R. T., Baymiev An. Kh., Baymiev Al. Kh., and Chemeris A. V. Delivery of CRISPR/Cas Components into Higher Plant Cells for Genome Editing. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019. V. 66, No. 5, P. 694–706. doi: 10.1134/S102144371905011X
15. Kuluev B.R., Kiryanova O.Yu., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Gumerova G.R., Vershinina Z.R., Matniyazov R.T., Akhmetzyanova L.U., Knyazev A.V., Mikhaylova, E.V., Garafutdinov R.R., Baymiev An.Kh., Gubaydullin I.M., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Some novelties in CRISPR/Cas genome editing and related areas. *Biomics*. 2019b. V. 11(3). P. 315-343. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2019-27 (In Russian)
16. Kumar T, Dweikat I, Sato S., Ge Z., Nersesian N., Chen H., Elthon T., Bean S., Ioerger B.P., Tilley M. Modulation of kernel storage proteins in grain sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Plant Biotechnol. J.* 2012. V.10: 533–544. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2012.00685.x
17. Li A., Jia S., Yobi A., Ge Z., Sato S.J., Zhang C., Angelovici R., Clemente T.E., Holding D.R. Editing of an alpha-kafirin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum. *Plant Physiol.* 2018. 177(4): 1425-1438. DOI: 10.1104/pp.18.00200
18. Nan G.-L., Ronceret A., Wang R.C. , Fernandes J. F., Cande W.Z., Walbot V. Global transcriptome analysis of two ameiotic1 alleles in maize anthers: defining steps in meiotic entry and progression through prophase I. *BMC Plant Biol.* 2011. 11: 120. doi: 10.1186/1471-2229-11-120
19. Pawlowski W.P., Wang C.-J. R., Golubovskaya I.N., Szymaniak J.M., Shi L., Hamant O., Zhu T., Harper L., Sheridan W.F., Cande W.Z. Maize AMEITIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. V.106(9). P.3603-3608. doi: 10.1073/pnas.0810115106
20. 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 (In Russian)
21. Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. & Befort, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. P. 20260–20264. doi: 10.1073/pnas.1116437108
22. Wu Y., Yuan L., Guo X., Messing J. Mutation in the seed storage protein kafirin creates a high-value food trait in sorghum. *Nature Commun.* 2013. V. 4. P. 2217 DOI: 10.1038/ncomms3217
23. Zhu, H., Li, C. & Gao, C. Applications of CRISPR–Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. doi: 10.1038/s41580-020-00288-9
24. Zhang Y., Massel K., Godwin I.D., Gao C. Applications and potential of genome editing in crop improvement. *Genome Biology.* 2018. V.19: 210. doi: 10.1186/s13059-018-1586-y