

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ им. М. АКМУЛЛЫ»

ЕСТЕСТВЕННО-ГЕОГРАФИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра генетики

Направление 06.03.01

Биология (уровень бакалавриата)

Направленность (профиль)

Генетика

Курс IV

СУХАРЕВА АННА СТАНИСЛАВОВНА

**МОДИФИКАЦИЯ ГЕНОМА РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ CRISPR/Cas  
С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ СОРТОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ  
АНТОЦИАНОВ**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Научный руководитель:

к.б.н., Михайлова Е.В.

Регистрационный номер \_\_\_\_\_

Заведующий кафедрой \_\_\_\_\_

Дата защиты \_\_\_\_\_

Оценка \_\_\_\_\_

Уфа – 2019

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ТЕХНОЛОГИЯ CRISPR/Cas И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ СОРТОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТОЦИАНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ).....	9
1.1. Методы направленного редактирования генома.....	9
1.2. Технология CRISPR/Cas.....	14
1.3. Транскрипционный фактор MYB биосинтеза антоцианов.....	17
1.4. Ген <i>ANT1</i> .....	18
1.5. Общая характеристика антоцианов.....	19
1.6. Антиоксидативные свойства антоцианов.....	23
1.7. Бинарная векторная CRISPR-плазмида pTC223.....	24
1.8. Методы доставки векторных конструкций.....	24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	29
2.1. Материалы исследования.....	29
2.1.1. Трансформируемые растения.....	29
2.1.2. Приготовление питательных и селективных сред для культивирования и регенерации трансгенных растений.....	29
2.1.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> и <i>A. rhizogenes</i> .....	32
2.1.4. Плазмида pTC223.....	32
2.2. Методы исследования.....	33
2.2.1. Бактериологические методы.....	33
2.2.2. Генно-инженерные методы.....	37
2.2.3. Молекулярно-генетические методы.....	41
2.2.4. Методы изучения антоцианов.....	46
2.2.5. Биоинформатические методы.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	50

3.1. Схема эксперимента.....	50
3.2. Биоинформатический анализ.....	50
3.3. Агробактериальная трансформация <i>in vitro</i> .....	52
3.4. Получение регенерантов.....	54
3.5. ПЦР-анализ линий бородатых корней.....	57
3.6. Изменение окраски спиртовых экстрактов антоцианов.....	58
3.7. Спектрофотометрическое рН-дифференциальное исследование.....	62
3.8. Агробактериальная трансформация томата <i>in planta</i> .....	64
3.9. Агробактериальная трансформация рапса ( <i>Brassica napus</i> ) с использованием рТС223.....	65
3.10. Планирование эксперимента по модификация рТС223 для трансформации растений из семейства <i>Brassicaceae</i> .....	67
<b>ГЛАВА 4. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ В ШКОЛЬНОМ КУРСЕ «БИОЛОГИЯ».....</b>	<b>70</b>
4.1. Роль и значение биологии в системе школьного образования.....	70
4.2. Анализ программ и учебников по реализации материалов ВКР в школьном курсе «Биология» основного общего образования.....	72
4.3. Разработка урока по биологии в 5 классе на тему «Разнообразие, распространение, значение растений».....	81
4.4. Использование логико-смыслового моделирования в образовательном процессе.....	87
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>91</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>93</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ.....</b>	<b>108</b>

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

БАП	- бензиламинопурин
ИУК	- индолилуксусная кислота
НУК	- нафтилуксусная кислота
п.н.	- пары нуклеотидов
ЭДТА	- этилендиаминтетрауксусная кислота
Ас	- ацетосерингон
CaMV	- вирус мозаики цветной капусты
СТАВ	- цетилтриэтиламмоний бромид
Сх	- цефотаксим
Км	- канамицин
МОРS	- 3-морфолинопропансульфоновая кислота
MQ	- деионизированная вода MilliQ
Rf	- рифампицин
ТАЕ	-Tris-ацетат

## ВВЕДЕНИЕ

В последнее время наблюдается все ускоряющийся рост населения планеты. Вместе с тем, растет и потребность в продуктах питания, имеющих наилучшую биодоступность и высокое содержание нутриентов. Для этого требуется быстрое создание сортов растений, адаптированных к изменяющимся условиям среды и с резистентностью к новым фитопатогенам (Хлесткина и др., 2016). Существует несколько способов получения растений с ценными для человека признаками.

Вот уже множество столетий человечество проводит селекцию растений на продуктивность и стрессоустойчивость, а также совершенствует технологии возделывания для достижения максимальной плодовитости хозяйственно ценных культур. Совершенствуются и методы селекции. Огромные временные затраты - главный недостаток традиционных методов селекции (массовый и индивидуальный отбор, комбинационная селекция) – в среднем, для выведения нового сорта растения требуется от 7 до 12 лет (Сухарева и др., 2018). Ускорение темпов создания сортов позволяет также сократить посевные селекционные площади и снизить финансовые затраты (Хлесткина и др., 2016). Маркер-опосредованная селекция (Marker-Assisted Selection, MAS) (Азарин и др., 2012) и геномная селекция (Genomic Selection, GS) (Хлесткина, 2013), в основе которых лежит исследование ДНК-маркеров, рассматриваются как наиболее перспективные направления селекции, помогающие не только сократить временные затраты, но и повысить эффективность селекционной работы (Сухарева и др., 2018).

**Актуальность проблемы.** Помимо селекции существуют более современные и эффективные способы создания новых хозяйственно ценных сортов растений, например, с помощью методов генетической инженерии и геномного редактирования. Эти методы позволяют получить новые генотипы в рамках естественного генетического разнообразия вида (замена аллелей в

соответствии с существующими в природе вариантами) или его расширения путем переноса чужеродных генов (Хлесткина и др., 2016).

При создании трансгенных растений, из-за невозможности проведения сайт-направленного встраивания, зачастую имеет место низкая экспрессия встроенного гена (за счет эффекта положения) или полное отсутствие продукта этого гена (сайленсинг) (Хлесткина и др., 2016). К тому же, встраивание чужеродных последовательностей ДНК в структурную или регуляторную область функционально важных генов, может привести к нарушению метаболизма у растения-реципиента (Gelvin, 1998).

В последние десятилетия были разработаны подходы позволяющие проводить направленное изменение и встраивание генов путем внесения сайт-специфических двуцепочечных разрывов ДНК (Хлесткина и др., 2016). В качестве направляющего агента могут выступать как белковые молекулы (мегануклеазы, ZFN, TALEN), так и нуклеиновые кислоты (химерные ДНК-РНК олигонуклеотиды, CRISPR/Cas) (табл. 1).

Целесообразно использовать для выведения новых сортов растений новейшие технологии, такие как CRISPR/Cas, в первую очередь потому, что эта технология позволяет производить сайт-направленное высокоточное редактирование одновременно несколько генов.

**Научная новизна исследования.** Несмотря на стремительное распространение технологии CRISPR/Cas, её возможности чаще всего используются для целенаправленного удаления участков ДНК, тогда как в представленном исследовании будет осуществлено встраивание донорной ДНК в определенное место растительного генома (нокин).

**Цель исследования:** разработка методики создания генетически трансформированных растений (прежде всего *Brassicaceae*) на основе векторной CRISPR-конструкции рTC223 и её дальнейшая модификация для создания сортов, с повышенным содержанием антоциановых пигментов.

### **Задачи исследования:**

1. Проверка CRISPR-плазмиды pTC223 для агробактериальной трансформации томата (*Solanum lycopersicum*) сорта Micro-Tom, табака (*Nicotiana tabacum*) сорта Havana линии SR1 дикого типа и рапса (*Brassica napus*) сортов Риф и Ярило;
2. Трансформация растений при помощи *A.tumefaciens* штамма AGL0 и *A.rhizogenes* штаммов A4 и 15834;
3. ПЦР-анализ полученных линий бородатых корней;
4. Экстракция и определение концентрации антоциановых пигментов в полученных линиях бородатых корней методом pH-дифференциальной спектрофотометрии;
5. Поиск генов-мишеней для модификации pTC223 и трансформации растений из семейства капустных (*Brassicaceae*);
6. Разработка методических рекомендаций по применению материалов ВКР в школьном курсе «Биология».

**Практическая значимость.** Появление антоциановой окраски различных частей растения может служить визуальным маркерным признаком успешной модификации растительного генома, а также повышает стрессоустойчивость самого растения, его декоративную и пищевую ценность в контексте профилактического питания.

**Апробация.** По материалам дипломной работы были опубликованы две научные работы в рамках ежегодной конференции «Вавиловские чтения» 2018 г. в БГПУ им. Акмуллы (Сухарева А.С., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Роль антоциановых пигментов в растительных и животных организмах// Вавиловские чтения - 2018. - С. 67-76. [РИНЦ]) и международной научной конференции «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» PLAMIC2018 в ИБГ УФИЦ РАН (Mikhaylova E.V., Kuluev B.R., Sukhareva A.S., Chemeris A.V. Prospects for genome editing in Brassicaceae // Plants and microbes: the future of biotechnology: abstract book International Scientific

Conference PLAMIC2018 (Russia, Ufa, 13-17 June 2018). - Ufa, 2018. - P. 56.  
ISBN 978-5-6041302-1-6 [<http://plamic.ru/sbornik/>] [РИНЦ]).

Выпускная квалификационная работа выполнена в лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.



# **ГЛАВА 1. ТЕХНОЛОГИЯ CRISPR/Cas И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ СОРТОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ АНТОЦИАНОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРНЫХ ДАННЫХ)**

## **1.1. Методы направленного редактирования генома**

Из всех методов направленной модификации генома, наиболее эффективным является технология CRISPR/Cas (Кулуев и др., 2017). Она имеет ряд преимуществ над ранее разработанными методами (табл. 1) (Lozano-Juste, 2014).

## Сравнение методов направленной модификации геномов

Название и краткое описание метода	Преимущества	Недостатки	Успешное применение
<p><b>Мегануклеазы (meganucleases) или самонаводящиеся эндонуклеазы (homing endonucleases, HEs)</b></p> <p>Разработаны на основе мобильных элементов прокариот (Smith и др., 2006). Нуклеазы узнают участки длиной в 12-45 нуклеотидов и вносят двуцепочечный разрыв на месте которого, с участием клеточных систем репарации и рекомбинации, возникает вставка (Salomon et al., 1998) или делеция.</p>	<p>Внесение двуцепочечных разрывов на 2 порядка увеличивают эффективность рекомбинации (Puchta et al., 1993; 1996).</p> <p>Довольно длинный сайт узнавания снижает вероятность внесения неспецифических разрывов (Вершинина и др., 2017).</p> <p>Не требуют РНК-затравки.</p>	<p>Способны «узнавать» только одну последовательность.</p>	<p>Кукуруза (D'Halluin, 2008), хлопчатник (2013), ячмень (Watanabe, 2016).</p>
<p><b>ZFN (zinc-finger nuclease)</b></p> <p>Химерный белок, состоящий из ДНК-узнающего домена типа «цинковые пальцы» (Deng et al., 2010) и каталитического домена рестриктазы <i>FokI</i> (Kim et al., 1996). Изменение последовательности ДНК достигается за счет внесения двуцепочечного разрыва и последующей стимуляции репарации или гомологичной рекомбинации между хромосомой и внехромосомным донором ДНК (Urnov et al., 2005).</p>	<p>Фермент имеет два домена: направляющий и эффекторный (Li, 1992), что делает возможным использование данного белка в качестве универсальной рестрикционной эндонуклеазы, заменяя узнающий домен (Podhajska, 1985).</p> <p>Возможна не только репарация, но и гомологичная рекомбинация и внедрение донорной ДНК (Bibikova et al., 2003) или одноцепочечного олигонуклеотида (Chen et al., 2011). Существует серия бинарных</p>	<p>Требуется предварительный синтез и сборка химерного белка, что само по себе трудоемкий процесс (Вершинина и др., 2016). Для внесения двуцепочечного разрыва требуются два химерных белка (Vitinaite et al., 1998), разделяющая их спейсерная последовательность составляет 5-7 нуклеотидов (Smith et al., 2000; Mani et al., 2005).</p>	<p>Табак (Wright et al., 2005; Townsend et al., 2009; Cai et al., 2009), арабидопсис (Lloyd et al., 2005; De Pater et al., 2009), кукуруза (Shukla et al., 2009), соя (Curtin, 2011), томат (Hilioti, 2016), яблоня и инжир (Peer, 2015).</p>

	<p>векторов для геномного редактирования опосредованного <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Товkach, 2009).</p> <p>В обзоре Вершининой и соавт. (2017) собрана подробная информация о специализированных ZFN web-ресурсах и программах для дизайна нуклеаз, а также для поиска таргетных или нецелевых сайтов редактирования в геномах модельных организмов.</p>	<p>Высокий уровень ошибок (Ramirez, 2008).</p>	
<p><b>TALEN</b> (transcription activator-like effector nuclease)</p> <p>- Эффекторная нуклеаза, подобная активаторам транскрипции. Состоит из двух доменов: узнающий TALE-белок и каталитического домена рестрикционной эндонуклеазы <i>FokI</i> (Miller et al., 2011). Являются важными факторами вирулентности фитопатогенных бактерий <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (Bonas et al., 1989; White, 2016) и действуют как активаторы экспрессии собственных генов-мишеней за счет связывания с ДНК в ядре растительной клетки-хозяина (Boch et al., 2009).</p>	<p>Количество узнаваемых нуклеотидов обычно достигает 18-20, что обеспечивает уникальность выбранной последовательности (Вершинина и др., 2017). Для упрощения конструирования различных генно-инженерных конструкций, несущих различные TAL мотивы, существует высокоэффективная система изготовления векторов Gateway, в том числе <b>Platinum Gate TALEN kit</b> (Kusano et al., 2016). Существует огромное множество компьютерных программ для поиска мест редактирования и off-target сайтов, а также дизайна генно-инженерных конструкций. Более подробную информацию о специализированных TALEN</p>	<p>Высокая вероятность возникновения ненаправленных мутаций, что отчасти можно исключить тщательным биоинформатическим анализом (Вершинина и др., 2017). При использовании TALEN гораздо чаще возникают делеции, нежели инсерции (89% против 1,6%) (Kim et al., 2013).</p>	<p>Пшеница (Wang et al., 2014), рис (Shan et al., 2015, Li et al., 2012), кукуруза (Char et al., 2015), ячмень и табак (Zhang et al., 2013), картофель (Clasen et al., 2016), соя (Haun et al., 2014), сахарный тростник, томат, арабидопсис (Christian et al., 2013, Cermak et al., 2011), табак Бенджамина, злак <i>Brachypodium</i> (Malzahn et al., 2017); сахарный тростник (Jung et al., 2016).</p>

	порталах и программах можно получить из обзора Вершининой и соавт. (2017).		
<p><b>Химерные ДНК-РНК олигонуклеотиды</b></p> <p>Дезоксирибо- и рибонуклеотидные основания со вторичной структурой в виде шпилек с короткими петлями из тиминов на концах и одним ником, способствующие событиям гомологичной рекомбинации (Кмиец, 1994).</p>	<p><b>MODEST</b> (MAGE, Multiple Automated Genome Engineering) Oligo Design Tool) – web-ресурс, позволяющий конструировать олигонуклеотиды для геномного редактирования (Bonde, 2014).</p>	<p>Низкая эффективность мутагенеза (Ruiter, 2003) – вероятность рекомбинации в 10-20 раз выше, чем вероятность возникновения случайных мутаций (Dong, 2006).</p> <p>Механизм остается до конца не ясным (Вершинина и др., 2017).</p> <p>Затруднен отбор растений, с новыми желательными признаками (Вершинина и др., 2017).</p>	<p>Табак (Beetham et al., 1999), кукуруза (Zhu et al., 1999; 2000; Kochevenko, 2003), рис (Okuzaki, 2004) <sup>1</sup>.</p>
<p><b>CRISPR/Cas</b></p> <p>Система, состоящая из расположенных регулярными кластерами коротких палиндромных повторов CRISPR (clustered regulatory interspaced short palindromic repeats), ассоциированных с CRISPR-кассетой нуклеаз Cas (CRISPR-associated) и единой гидовой РНК (single guided RNA) (Cong et al., 2013; Кулуев и др., 2017) .</p>	<p>Не требует белково-инженерных операций (Хлесткина и др., 2016). Создано множество специализированных порталов, компьютерных программ, используемых в экспериментах по CRISPR/Cas технологии, в частности, при дизайне направляющей РНК, а также баз данных. Более подробную информацию о специализированных CRISPR/Cas порталах и программах можно получить из обзора Чемерис и соавт. (2017). Возможно встраивание как</p>	<p>Для растений, чей геном в процессе эволюции подвергся полиплоидизации (Masterson, 1994; Wolfe, 2001), важно учитывать наличие дублированных генов при модификации (Хлесткина и др., 2016) Эффективность получения мутаций зависит от ряда факторов, среди которых: особенности генов-мишеней, структура гидовой РНК и стратегия её экспрессии, версия эффекторной</p>	<p>Арабидобсис (Gao, 2014; Jia et al., 2014; Schiml et al., 2014), рис (Xu et al., 2015; Zhang et al., 2014; Zhou et al., 2014), томат (Brooks et al., 2014; Cermak et al., 2015), кукуруза (Svitashev et al., 2015), пшеница (Wang et al., 2014).</p>

	<p>коротких, так и протяженных фрагментов ДНК (Schiml et al., 2014).</p> <p>Позволяет создавать нетрансгенные растения, со специфически заданными мутациями (Feng et al., 2014) .</p> <p>Возможность одновременного (мультиплексного) редактирования сразу нескольких генов (Li et al., 2013; Mao et al., 2013).</p> <p>Технология позволяет редактировать метилированные участки ДНК (Hsu et al., 2013).</p>	<p>нуклеазы Cas и способ доставки конструкции в клетку (Li et al., 2013; Shan et al., 2013; Xie, 2013).</p>	
--	---	---	--

## 1.2. Технология CRISPR/Cas

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) - расположенные регулярными кластерами короткие палиндромные повторы. Являются особыми локусами геномов бактерий и архей, обеспечивающими им приобретенный иммунитет против бактериофагов. Первые упоминания в научной литературе об обнаружении таких повторов при частичном секвенировании генома *Escherichia coli* датируются 1987 годом (Ishino et al., 1987). Группа японских ученых обнаружила протяженный некодирующий участок, содержащий повторяющиеся последовательности ДНК перемежающиеся спейсерами – специфичными варибельными последовательностями. Такой участок позже стали называть CRISPR кассетой (CRISPR cassette или CRISPR array). CRISPR кассеты и гены CRISPR-ассоциированных нуклеаз Cas (Crispr associated) в виде оперона вместе составляют CRISPR locus в геноме бактерий. Таргетирование определяют спейсеры (spacers), входящие в состав крРНК (crRNA, crispr RNA). Варибельная часть крРНК связывается со специфичным участком в составе генома вируса или редактируемого генома, называемым протоспейсером (protospacer), т.е. с целевым сайтом (on-target site), но она также может связаться и с неспецифичными последовательностями (off-target sites) в геноме (Кулуев и др., 2017).

Упрощенная схема механизма защиты своих геномов у бактерий и архей состоит из трех стадий: адаптации, транскрипции и интерференции (Кулуев и др., 2017). Первая стадия – адаптация, заключается в формировании спейсера, происходит при проникновении чужеродной ДНК (бактериофага) и последующего встраивания небольшого участка генома фага (протоспейсера) в соответствующий CRISPR locus генома инфицированной клетки. Новый спейсер будет располагаться впереди остальных ранее встроенных аналогичных последовательностей. Важно отметить, что каждая бактериальная клетка встраивает в качестве спейсера

разные участки генома одного и того же патогена. Это обусловлено существованием множества пригодных в качестве мишеней последовательностей при последующих инфекциях и несогласованностью действий бактерий и архей. Это несет в себе и защитный механизм, ведь в случае мутации протоспейсерной последовательности у фага появляется возможность обойти иммунную систему клетки-хозяина, если в качестве спейсера эта клетка содержит смутировавший участок ДНК. Тогда как остальные микроорганизмы из этой популяции, захватившие другие немутировавшие участки, все еще будут устойчивы к атаке вируса (Van Houte et al., 2016). На второй стадии происходит транскрипция всего CRISPR локуса и процессинг, в результате которого образуются короткие крРНК. Далее крРНК связывается с транс-активирующей РНК (тракрРНК, *tracrRNA*, *trans-activated CRISPR RNA*). На стадии интерференции посредством тракрРНК происходит формирование комплекса крРНК и белка Cas, в котором вариабельный участок крРНК (спейсер) узнает и связывается с протоспейсером, а фермент Cas его разрушает. Обязательным условием распознавания является наличие мотива РАМ (Protospacer Adjacent Motif) смежного с протоспейсером на комплементарной цепи (для нуклеаз разного типа может располагаться как с его 5'-, так и с 3'-конца). ДНК бактерии не содержит РАМ, что позволяет отличать чужеродные молекулы от собственных. Для системы CRISPR/Cas9 РАМ последовательность имеет вид NGG, где N – любой нуклеотид. В присутствие ионов магния Cas9 образует два одноцепочечных разрыва на расстоянии трех нуклеотидов от РАМ. Нуклеаза Cas9 имеет два каталитических домена – RuvC и HNH. RuvC вносит одноцепочечный разрыв в целевой участок генома (протоспейсер), а HNH – в участок гомологичный протоспейсеру и связывающийся с крРНК (Кулуев и др., 2017). Репарация образовавшегося двуцепочечного разрыва может происходить двумя способами: за счет негомологичного соединения концов фрагментов ДНК (NHEJ - Non-Homologous End Joining) и путем гомологичной рекомбинации (HDR - Homology Directed Repair). При NHEJ

часто возникают инделы (инсерции или делеции) одного или нескольких нуклеотидов, что может привести к сдвигу рамки считывания и нарушению функциональности белка, кодируемого этим участком. Такое нарушение работы какого-либо гена навывают нокаут (knock-out, KO). HDR позволяет осуществить редактирование или вставку в целевой сайт генома фрагмента ДНК несущего желаемый для экспериментатора признак, но для этого необходимо присутствие такого фрагмента в месте действия. Такое внедрение какого-либо гена в геном называют нокин (knock-in, KI). (Кулуев и др., 2017).

Существует большое разнообразие CRISPR/Cas систем. В настоящее время их делят на 2 класса, 6 типов и 19 подтипов (Кулуев и др., 2017). Первый класс CRISPR/Cas систем характеризуется наличием мультисубъединичного комплекса ферментов, называемого Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defence). К этому классу относятся системы I, III и IV типов. Системы второго класса имеют один мультидоменный эффекторный белок и представлены II, V и VI типами.

Наиболее удобной для проведения геномного редактирования оказалась система с эффекторной нуклеазой Cas9 (тип II) и именно она сейчас широко используется (Кулуев и др., 2017). Массовое применение данной системы на практике произошло после того, как было предложено объединить крПНК и тракрПНК в единую направляющую или гидПНК (гидовая ПНК, sgRNA, single guided RNA, gRNA) (Jinek et al., 2012). В области геномного редактирования растений первые успешные результаты использования системы CRISPR/Cas9 были опубликованы в 2013 г. (Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Nekrasov et al., 2013; Shan et al., 2013; Xie, 2013). При использовании этой технологии ошибочные мутации возникают редко (Xie, 2013) или вовсе не выявляются (Хлесткина и др., 2016). Существенно повысить точность и эффективность модификации помогают тщательный подбор гидПНК (Li et al., 2014) и выбор в качестве мишеней регуляторных



генов, поскольку их изменение чаще всего связано с изменчивостью на фенотипическом уровне (Doebley, 1993; 1998; Хлесткина и др., 2008; Purugganan, 1998) и такие последовательности имеют более существенный уровень дивергенции, по сравнению со структурными (Purugganan, 1998).

На сегодняшний день существует множество компьютерных программ и баз данных для дизайна экспериментов по CRISPR/Cas и подбору гидРНК с учетом нецелевых сайтов связывания (Чемерис и др., 2017). Также, большое разнообразие плазмид, используемых для CRISPR/Cas редактирования геномов, представлено в репозитории Addgene (<http://www.addgene.org>), в специальном разделе CRISPR (<http://www.addgene.org/crispr/>).

### **1.3. Транскрипционный фактор MYB биосинтеза антоцианов**

Как уже было отмечено ранее, при редактировании в геноме растений регуляторных областей имеют место незначительные изменения фенотипа, вследствие изменения экспрессии целого каскада генов, которые часто очень сложно наблюдать невооружённым глазом. Такими регуляторными последовательностями являются гены, кодирующие факторы транскрипции – особые белки, специфически связывающиеся с ДНК и контролирующие синтез мРНК. Таким образом, они могут уменьшать константу связывания РНК-полимеразы с регуляторными последовательностями (репрессоры) или повышать (активаторы). Существует три типа транскрипционных факторов, непосредственно контролирующих биосинтез антоциановых пигментов: с доменом MYB, с доменом helix-loop-helix (bHLH) и с WD-повторами (MBW-комплекс) (Стрыгина и др., 2017).

Самым многочисленным классом транскрипционных факторов растений являются белки MYB (myeloblastosis) (Медведев, 2010). Это семейство включает около 200 белков, члены которого характеризуются наличием структурно консервативного ДНК-связывающего мотива - домена MYB, названного так по его сходству с протоонкогеном c-MYB (Martin et al.,

1999).

Этот домен специфически взаимодействует с генами, содержащими (С/Т)ААС(Г/Т)G-нуклеотидные последовательности (Медведев, 2010). Функции MYB-белков в растениях включают: регуляцию вторичного метаболизма, контроль клеточного морфогенеза, регуляцию образования меристемы и клеточного цикла (Jin et al., 1999), а также циркадных ритмов и передачу фитохромного сигнала (Медведев, 2010).

Группа ученых (Mathews et al., 2003) разработала эффективный метод инсерционного мутагенеза Т-ДНК у томатов сорта Micro-Tom с использованием активационного мечения для идентификации генов, которые регулируют метаболические пути. Одна из линий приобрела пурпурную пигментацию с самой ранней стадии формирования побега в культуре, отражая активацию пути биосинтеза, приводящего к накоплению антоцианов. Это обусловлено сверхэкспрессией *ANT1*, который кодирует транскрипционный фактор MYB, в трансгенном томате под контролем конститутивного промотора. Вегетативные ткани растений проявляли интенсивный пурпурный цвет, а плоды имели пурпурные пятна на эпидермисе и околоплоднике. Таким образом, было подтверждена роль транскрипционного фактора MYB, продукта гена *ANT1*, в биосинтезе и накоплении антоциановых пигментов в различных тканях томата (Mathews et al., 2003).

#### 1.4. Ген *ANT1*

Ген *ANT1* (anthocyanin 1 или MYB transcription factor ANT1) локализуется в геноме *Solanum lycopersicum* на 10 хромосоме, кодирует мРНК – NM\_001247488.1 и белок - NP\_001234417.1, имеет 3 экзона (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/543897>) (Рис. 1).

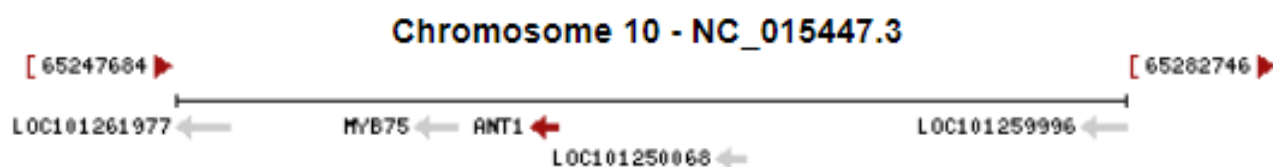


Рис. 1. Локализация гена *ANT1* томатного генома (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/543897>).

Белок ANT1 демонстрирует гомологию с продуктом гена *AN2* из *Petunia hybrida* и с рядом других факторов транскрипции растений, которые регулируют пути биосинтеза антоцианов, такие как PAP1, PAP2 и TT2 из *Arabidopsis* и белки PL и C1 кукурузы (Kiferle et al., 2015).

Ген *Arabidopsis PAP1* (*At1g56650*, *AtPAP1*) кодирует транскрипционный фактор MYB75. Было установлено, что сверхэкспрессия этого гена приводит к накоплению антоцианов в листьях арабидопсиса. Встраивание *PAP1* в геном табака (Zhou et al., 2008) и томата (Zuluaga et al., 2008) приводило к значительному накоплению антоцианов во всём растении, включая корни. Были созданы растения *B.napus* с конститутивной экспрессией гена *AtPAP1* под контролем промотора 35S CaMV, но такие модифицированные рапсы не имели столь значительного изменения окраски (Li et al., 2010).

Появление антоциановой окраски у трансформированных частей растения (накопление в каллусе или корнях) служит отличным маркерным признаком, наблюдаемым визуально. Помимо этого, антоцианы выполняют в растениях структурные, защитные и сигнальные функции, а также участвуют в процессах дыхания и фотосинтеза (Запрометов, 1974).

### 1.5. Общая характеристика антоцианов

Антоцианы или антоцианины – являются самой многочисленной группой водорастворимых растительных пигментов принадлежащих к семейству, известному как флавоноиды, которые являются частью ещё большей группы соединений, называемой полифенолы. Они обуславливают

красную, розовую, фиолетовую и синюю окраску как вегетативных, так и генеративных органов растения. Отсюда следует одна из функций: привлечение насекомых опылителей и распространителей семян яркоокрашенными венчиками цветов и плодами (Хлесткина, 2012).

Антоцианы содержатся в растительных клетках преимущественно в виде гликозидов (Карабанов, 1981), т.е. состоят из агликона и углеводного остатка (Рис. 2). Углеводная часть (моно-, ди-, трисахариды) соединяется с агликоном (антоцианидином) в положении 3' или в 3' и 5' (Чуб, 2008).

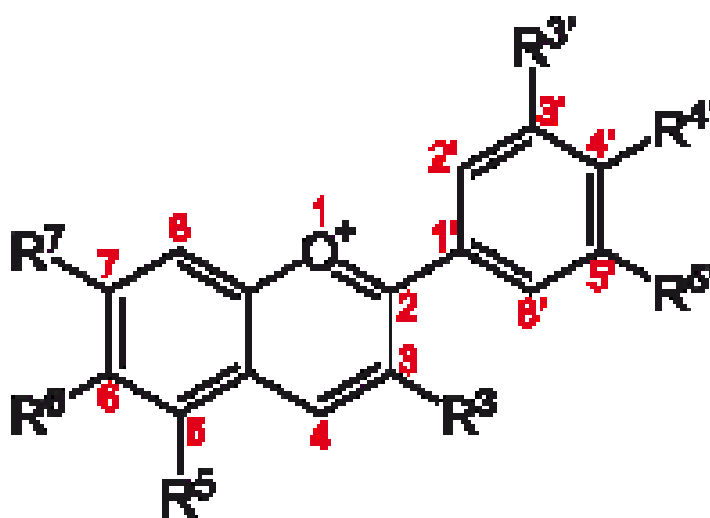


Рис. 2. Общее строение антоцианидинов

(<https://tradiatio.wiki/files/thumb/c/cd/Anthocyanidine.svg/200px-Anthocyanidine.svg.png>).

Окраску большинства природных антоцианов определяют 6 основных агликонов (табл. 2).

Таблица 2

**Основные агликоны антоцианов (Andersen et al., 2006)**

Название	R						Окраска
	3	5	7	3'	4'	5'	
Пеларгонидин (Pg)	ОН	ОН	ОН	Н	ОН	Н	Оранжевая
Цианидин	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	Н	Оранжево-

(Cy)							красная
Дельфинидин (Dp)	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	ОН	Красно-синяя
Пеонидин (Pn)	ОН	ОН	ОН	OCH <sub>3</sub>	ОН	Н	Оранжево-красная
Петунидин (Pt)	ОН	ОН	ОН	OCH <sub>3</sub>	ОН	ОН	Красно-синяя
Мальвидин (Mv)	ОН	ОН	ОН	OCH <sub>3</sub>	ОН	OCH <sub>3</sub>	Красно-синяя

Окраска антоцианов варьирует от ряда факторов. В первую очередь, в зависимости от рН среды (Andersen et al., 2006; Макаревич и др., 2010). Эта зависимость продемонстрирована на рис. 3 и в табл. 3.

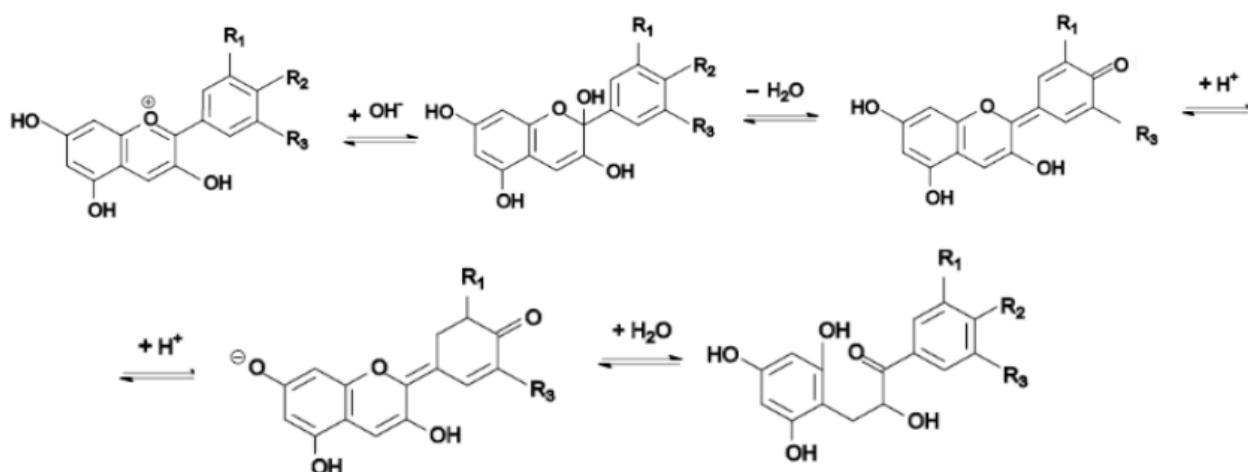


Рис. 3. Зависимость структуры антоцианидинов от рН среды (Andersen, 2006).

Таблица 3

### Зависимость окраски антоциановых пигментов от рН среды

рН	Присоединение (+) / Отщепление (-)	Форма	Цвет
рН<3	-	Флавилиевая	Красный
рН=4-5	+ОН <sup>-</sup>	Псевдооснование	Бесцветный

pH=6-7	-H <sub>2</sub> O	Хиноидная	Синий
pH=7-8	+H <sup>+</sup>	Фенолят хиноидной формы	Пурпурный
pH>8	+H <sub>2</sub> O	Халкон	Желтый

Известно, что в генетическом контроле биосинтеза антоцианов участвуют структурные гены ферментов халконсинтазы (CHS), халконфлаванонизомеразы (CHI), дигидрофлавонол-4-редуктазы (DFR), флаванон-3-гидроксилазы (F3H), флавоноид-3'-гидроксилазы (F3'H), флавоноид-3',5'-гидроксилазы (F3'5'H) и антоцианидинсинтазы (ANS) (Holton et al., 1995).

Имеются данные о том, что уровень иммунитета растений к любым заболеваниям зависит от количества органических и ароматических кислот (в частности антоцианов и дубильных веществ - проантоцианидинов). Чем выше их содержание в клеточном соке, тем устойчивее растение (Курсанова, 1988). Сорты мягкой пшеницы, имеющие интенсивную фиолетовую окраску стебля и пыльников, обусловленную накоплением антоцианов, обладают устойчивостью к твердой и пыльной головне (Хлесткина, 2012). Отмечено фунгицидное действие некоторых проантоцианидинов на примере *Sclerotinia fructigena* (Pers.) Schrot – возбудителя коричневой гнили плодов (Курсанова, 1988).

Молекулы антоцианов также способны экранировать УФ, что было показано на примере суспензионной культуры клеток *Rosa damascena* Mill. (Запрометов, 1993) и *Centaurea cyanus* L. (Takahashi et al., 1991). Клетки *Rosa damascena*, которые выживали после селекции на устойчивость к УФ-излучению, содержали примерно в 15 раз больше флавоноидов, в т.ч. антоцианов. Эпидермальные антоцианы зрелых листьев красной разновидности рода *Coleus* способствовали меньшему повреждению органов

растения от УФ-лучей, в отличие от зеленых аналогов *Coleus*, не содержащих антоцианов (Burger, 1996).

В ходе фотосинтетических процессов в хлоропластах образуются активные формы кислорода (АФК) – ионы кислорода, свободные радикалы и перекиси (Масленников и др., 2011). Антоцианы могут нейтрализовывать образующиеся АФК, однако их локализация ограничивает область их деятельности в пределах вакуоли и, частично, клеточной стенки (Ehrlenfeldt, 2001).

### **1.6. Антиоксидативные свойства антоцианов**

Длительное воздействие оксидативного стресса вызывает повреждение клеток и нарушение в работе организма, как у растений, так и у животных. У последних, в т.ч. и у человека, наблюдается развитие хронических заболеваний (атеросклероза, сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, воспалений), злокачественных опухолей и преждевременное старение организма (Pandey, 2009). Было обнаружено, что агликоны наиболее распространенных в пище антоцианов, цианидина и дельфинидина, ингибируют рост опухолевых клеток человека *in vitro* (Meiers et al., 2001)<sup>3</sup>. Следует отметить, что в значительной части исследований, доказывающих полезное действие флавоноидов, эксперименты проводились *in vitro*, и поэтому не стоит прямо экстраполировать результаты экспериментов на организм человека (Zverev, 2017).

В обзоре Steinmetz и соавт. (1996) о взаимосвязи между потреблением овощей и фруктов и риском развития рака представлены результаты 206 эпидемиологических исследований человека и 22 исследований на животных. Были рассмотрены онкологии ЖКТ, пищевода, легких, полости рта и глотки, эндометрия, поджелудочной железы и толстой кишки. В списке веществ, которые предположительно могут защищать от рака, имеются изофлавоны и флавоноиды. Полученные данные свидетельствуют о

защитных эффектах увеличения в рационе доли продуктов богатых веществами полифенольного ряда от различных видов онкологии.

### **1.7. Бинарная векторная CRISPR-плазмида pTC223**

В работе Cermak и соавт. (2015) использованы технологии TALEN и CRISPR/Cas9 для создания наследуемых модификаций генома. Несмотря на стремительное распространение технологии CRISPR/Cas, её возможности чаще всего используются для целенаправленного удаления участков ДНК (нокаут), тогда как в представленной работе было осуществлено встраивание донорной ДНК (нокин) в определенное место растительного генома при помощи бинарной векторной CRISPR-плазмиды pTC223. В данном случае, самореплицирующийся вектор на основе геминивируса способен одновременно нарабатывать гидРНК (нацеливающая на промоторн гена *ANT1*), Cas9 и донорную матричную последовательность (donor template), содержащую промотор 35S и ген резистентности к канамицину (*KanR*) (Рис. 5). Таким образом, перед геном, контролирующим биосинтез антоцианов (*ANT1*), был вставлен сильный промотор 35S вируса мозаики цветной капусты (ВМЦК, cauliflower mosaic virus, CaMV), что привело к избыточной экспрессии и эктопическому накоплению антоциановых пигментов в тканях томатов. Более двух третей вставок были точными и не имели непредвиденных модификаций последовательности. Кроме того, целевая модификация была передана потомству менделевским способом, т.е. характеризовалась классическим расщеплением 3:1, а это означает, что трансген встроился в единичной копии (Cermak et al., 2015). Эта работа обеспечивает основу для эффективного редактирования генома сельскохозяйственных растений без случайной интеграции чужеродной ДНК.

### **1.8. Методы доставки векторных конструкций**

Доставка векторных конструкций в клетки растения-донора осуществляется несколькими способами. Их делят на прямые и непрямые способы (Rap, 2017). К прямым относятся: трансфекция, микроинъекция,



электропорация, метод «мини-клеток», упаковка в липосомы и метод биологической баллистики (биобаллистики). Непрямой способ предполагает использование промежуточного организма, которым чаще всего выступают *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*, несущие генетические конструкции с нужными генами (Кулуев и др., 2017). Они представляют собой почвенные бактерии, онкогенные штаммы которых в участках поранения двудольных растений вызывают заболевания, называемые «корончатым галлом» (crown gall) (рис. 4B) и «косматым/бородатым/волосистым корнем» (hairy roots) соответственно (рис. 4A). Опухолевые ткани синтезируют опины – производные аминокислот и сахаров, используя их в качестве источников углерода и азота (Otten et al., 2008).

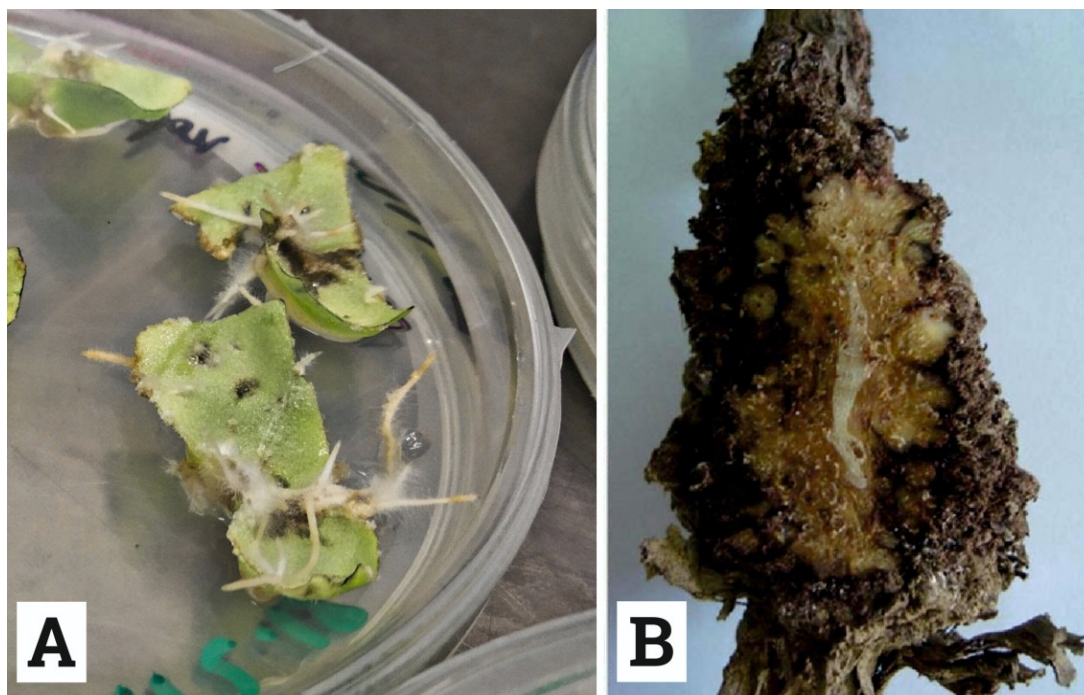


Рис. 4. Образование бородатых корней (A) из инфицированных *A. tumefaciens* листовых эксплантов табака *in vitro* и развитие корончатого галла (B) на пораженной *A. rhizogenes* виноградной лозе *in vivo*. (<https://www.semanticscholar.org/paper>)

Как индукция опухолей, так и синтез опинов, обусловлены бактериальными мегаплазмидами – Ti (Tumor induced) у *A. tumefaciens* и Ri (Root induced) в случае *A. rhizogenes* (Дрейпер и др., 1991).

Переносимую область плазмиды называют Т-ДНК (Transferred-DNA). Перенос и интеграция Т-ДНК не требуют онкогенеза или белков, кодируемых Т-ДНК. Этот факт позволил генным инженерам использовать *Agrobacterium* для переноса полезных генов в растения вместо онкогенов Т-ДНК (Ream, 2008). Контакт агробактерий с соединениями, выделяющимися из поврежденной ткани растения, приводит к транскрипции *vir*-области плазмиды. Эта область кодирует вирулентные (*Vir*) белки, которые ответственны за вырезание переносимой области Т-ДНК из плазмиды и интеграцию в геном растительной клетки. Они также обеспечивают поддержание целостности интегрированных генов и снижение частоты дупликаций и перегруппировок, которые часто влияют на экспрессию трансгена (Ziemienowicz et al., 2008). Некоторые из генов R- и T-плазмидных онкогенов, по-видимому, являются гомологами, происходящими от одного предка. К ним относятся гены Ti: *tms1 / iaaM*, *ons*, *tml2*, *5*, *6a* и *6b*, а также гены Ri: *rolB*, *rolBTR*, *rolC*, *ORF8*, *ORF13*, *ORF14* и *ORF18* (Britton et al., 2008).

Во время процесса инфекции Т-ДНК экспортируется из агробактериальной клетки в ядро растительной клетки, где он интегрируется в хромосомную ДНК и экспрессируется. Трансформация растительных клеток приводит к повышению выработки и чувствительности к гормонам ауксину и цитокинину. Оба запускают аномальную пролиферацию, приводящую к опухолевому росту или аномальному укоренению (Ream, 2008). Опухоли обычно состоят из неорганизованной ткани, но иногда они дифференцируются в корни или побеги. Это зависит от растения-хозяина, положения на зараженном растении или вызывающей бактерии (Otten et al., 2008).

Трансформация растений влечет за собой не только доставку и интеграцию сконструированной ДНК в растительные клетки, но также и регенерацию трансгенных растений из этих генетически измененных клеток.

Самые ранние успехи в генной инженерии растений имели место у видов для которых было известно много об условиях, необходимых для регенерации целых растений, например у табака, петунии, моркови и подсолнечника (Banta, 2008). Часто именно технология выращивания растительной ткани, а не сам процесс трансформации, является ограничивающим шагом в достижении эффективной генетической модификации.

Агробактериальная трансформация имеет ряд преимуществ над физическими методами доставки ДНК в клетки донора (однокопийность вставки, возможность трансформации *in vivo* или *in planta*). Классическим физическим методом является бомбардировка клеток или тканей металлическими частицами, покрытыми ДНК. Минус этого метода в том, что если «обстрел» ведется не CRISPR-плазмидой, целевая последовательность встраивается в случайный участок генома и может либо повредить важные регуляторные или структурные гены клетки донора, либо возможно ингибирование экспрессии в результате действия эффекта положения. Также в результате многокопийной вставки может происходить сайленсинг трансгена. Следует также учесть и повреждения клеток металлическими частицами и их гибель. Еще один распространенный физический метод переноса генов – электропорация. Электрические разряды повышают проницаемость клеточной мембраны за счет перераспределения зарядов на ее поверхности и образования пор, через которые ДНК может проникнуть в клетку. Этот метод имеет те же минусы, что и бомбардировка ДНК и не подходит для трансформации *in vivo* или *in planta* (Апарцин, 2016).

Помимо всего вышеперечисленного *Agrobacterium* используются для накопления биомассы в промышленной биотехнологии (Михайлова и др., 2017). Особенно широкое распространение получило создание при помощи *A. rhizogenes* корневых культур, которые способны к длительному росту в условиях *in vitro* на безгормональных питательных средах.

Таким образом, агробактериально-опосредованная трансформация растений является предпочтительным способом трансформации растительных клеток, а появление антоциановой окраски у трансформированных растений является не только удобным маркерным признаком, но и повышает устойчивость растения к различным стрессам, а также повышает пищевую ценность таких растений.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы исследования

#### 2.1.1. Трансформируемые растения

Для модификации генома были выбраны нетрансгенные растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana линии SR1 дикого типа и томата *Solanum lycopersicum* L. сорта Микро-Том. Табак – удобный модельный объект с надежными протоколами трансформации и регенерации. Томат – одна из самых важных и распространенных продовольственных культур в мире (Bovy et al., 2002; Willits et al., 2005). Томат сорта Микро-Том, изначально выращенный для домашнего садоводства (Scott et al., 1989), хороший объект для геномного редактирования и крупномасштабного мутагенеза благодаря своему небольшому размеру, быстрому жизненному циклу и простоте трансформации (Meissner et al., 1997; 2000). Взрослое растение имеет высоту от 10 до 20 см, к тому же, данный сорт способен к цветению и плодоношению в лабораторных условиях. Семена взяты из коллекции лаборатории биоинженерии растений и микроорганизмов ИБГ УФИЦ РАН.

Для индукции каллусо- и ризогенеза и введения в культуру *in vitro* использовались листовые экспланты молодых растений томата и табака.

#### 2.1.2. Приготовление питательных и селективных сред для культивирования и регенерации трансгенных растений

Для приготовления питательных сред использовали реактивы с высокой степенью очистки. В целях экономии времени были приготовлены концентрированные маточные растворы (Табл. 4).

Таблица 4

Пропись минеральных компонентов среды MS  
(Murashige and Skoog)

Вещества	Концентрация г/л
Макросоли (x20) – брать 50 мл/л	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5
KNO <sub>3</sub>	19
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	3,7

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,7
Микросоли (x100) – брать 2,5 мл/л	
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,496
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	1,784
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,688
KJ	0,0664
$(\text{Na}_2\text{MoO}_4)_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,02
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,002
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,002
Раствор хелата железа – брать 5 мл/л	
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,558
Na2 EDTA	0,746
Концентрат $\text{CaCl}_2$ - брать 50 мл/л	
$\text{CaCl}_2$ безводный	3,3
или	
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	4,4

Таблица 5

**Пропись компонентов среды MS для эксплантов табака и томата**

Вещества	Концентрация г/л
Сахароза	30
Агар	7,5
Соли MS (табл. 3)	полная
Концентрация мл/л	
Инозитол	4,8
Витамины Гамбурга (B5)	2
pH=5,8	
Добавляются после автоклавирования (121° С в течении 25 мин):	
Гормоны	
Концентрация мл/л	
БАП	2
НУК	0,02
Концентрация г/л	
Антибиотики	Концентрация г/л
Амоксиклав (для томата)	0,3
Концентрация мл/л	
Цефотаксим (для табака)	5
Канамицин (для селективной среды)	1

Таблица 6

**Пропись компонентов среды MS для корней табака и томата**

Вещества	Концентрация г/л
Сахароза	30
Агар	8
Соли MS (табл. 3)	полная
Концентрация мл/л	

Инозитол	4,8
Витамины Гамбурга (B5)	2
pH=5,8	
Добавляются после автоклавирования (121° С в течении 25 мин):	
Антибиотики	Концентрация г/л
Амоксиклав (для томата)	0,3
	Концентрация мл/л
Цефотаксим (для табака)	5
Канамицин (для селективной среды)	1

Таблица 7

### Пропись компонентов среды LB (Lysogeny Broth)

Вещества	Концентрация г/л
Триптон	10
Агар	17
Дрожжевой экстракт	5
NaCl	10
Добавляются после автоклавирования (121° С в течении 35 мин):	
Антибиотики	Концентрация мл/л
Рифампицин	1
Канамицин	5

Таблица 8

### Пропись компонентов среды Z (0,5; 1; 2)

Вещества	Концентрация г/л
Сахароза	20
Агар	5,2
Соли MS (табл. 3)	полная
	Концентрация мл/л
Инозитол	4
Витамины Nitsch	1
или	
Витамины Гамбурга (B5)	2
pH=6	
Добавляются после автоклавирования (121° С в течении 25 мин):	
Гормоны	Концентрация мг/л
Зеатин	0,5 (0,5Z)      1 (1Z)      2 (2Z)
ИУК	0,02
Антибиотики	Концентрация г/л
Амоксиклав	0,3
	Концентрация мл/л
Канамицин	1

**Пропись компонентов среды YM Agar (Yeast Malt Agar)**

Вещества	Концентрация г/л
Маннитол	10
Агар	20
Дрожжевой экстракт	0,04
Добавляются после автоклавирования (121°C в течении 35 мин):	
NaCl	0,01
MgSO <sub>4</sub>	0,01
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O	0,005

**2.1.3. *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes***

В качестве трансформирующего агента были выбраны *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0 и *A. rhizogenes* штаммов A4 и 15834.

**2.1.4. Плазмида pTC223**

Вектором служит CRISPR-плазмида pTC223 (Рис. 5), которая ранее была использована Сермак и соавт. (2015) для трансформации генома томата. Плазмида заказана с сайта AddGene (<https://www.addgene.org/>). Далее полученная плазмида была размножена в *E.coli* и встроена в *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0 и *A. rhizogenes* штаммов A4 и 15834.

Общий размер вектора 17961 п.н., размер вставки – 11728 п.н. Плазмида содержит ДНК-последовательности, кодирующие эффекторную нуклеазу Cas9, гидРНК (-TCGTTTATAATTTGTAGAG-) нацеленную на промоторную область гена *ANT1* томатного генома, донорную молекулу с 5' гомологичным плечом Pnos: NptII-35S: ANT1 и с 3' гомологичным плечом в качестве репликона геминивируса (*GVR*). Селективным маркером является ген устойчивости к антибиотику канамицину (*KanR*).



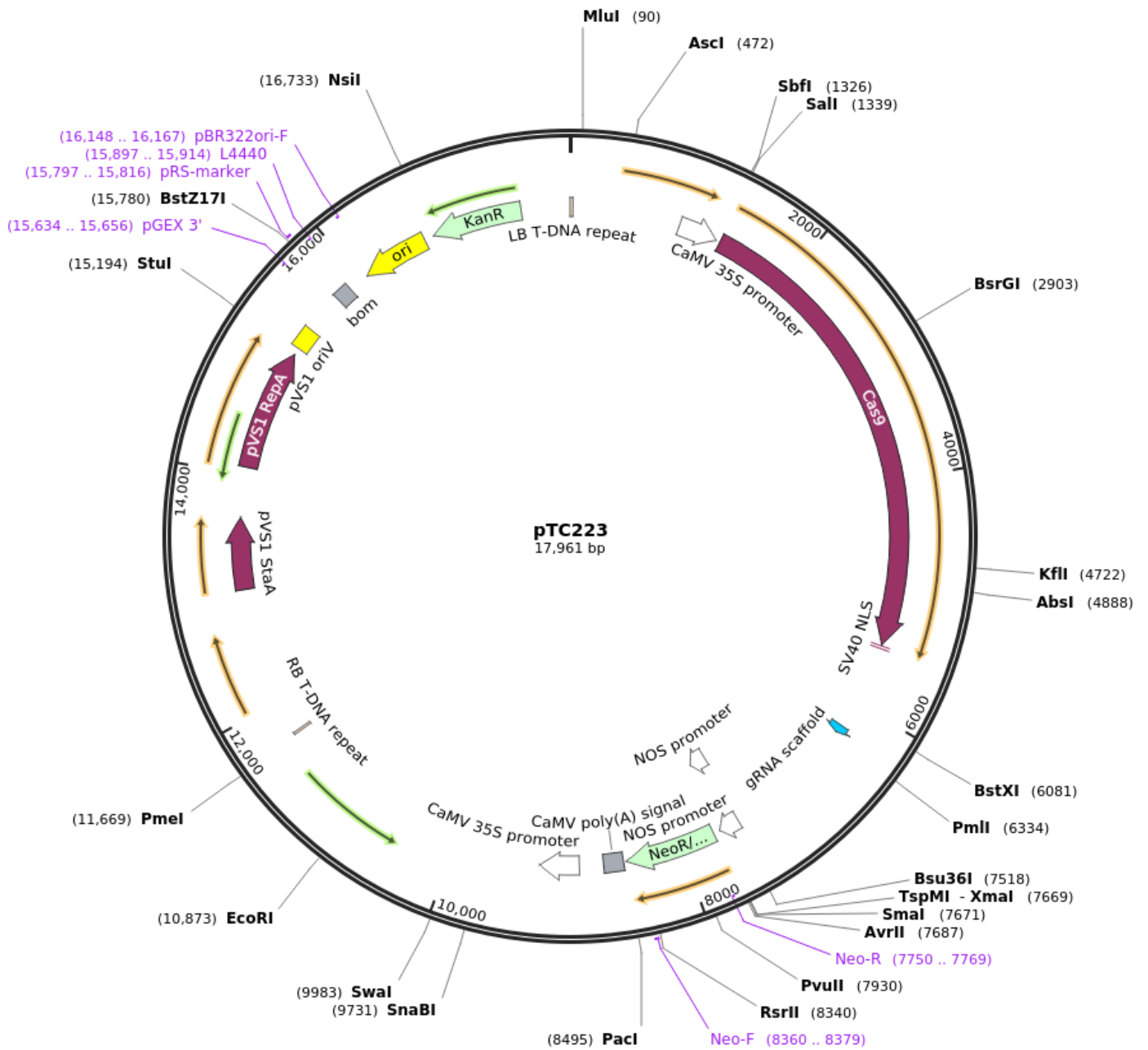


Рис. 5. Плазмида pTC223 (<https://www.addgene.org/70019/>).

## 2.2. Методы исследования

### 2.2.1. Бактериологические методы

#### Наращивание ночных бактериальных культур

С помощью раскаленной до ярко-красного цвета и охлажденной до комнатной температуры микробиологической петли переносят отдельную

бактериальную колонию со свежей чашки, содержащей селективные антибиотики, в пробирку со стерильной средой LB (табл. 7) с теми же антибиотиками.

а) *E.coli*: инкубируют 8-16 ч при 37°C с аэрацией, используя качалку с круговым вращением (амплитуда 5-10 см и скорость вращения 150-200 об/мин).

б) *Agrobacterium*: наращивают 20-48 ч при 28°C с помощью аналогичной качалки.

### Метод химической индукции компетентности *E. coli*

*Escherichia coli* (*E. coli*, кишечная палочка) не обладает природной компетентностью, но существуют методы, позволяющие придавать искусственную компетентность. Наибольшую известность приобрел кальциевый метод.

В колбу на 250 мл со 100 мл среды LB (табл. 7) с соответствующим антибиотиком вносят 1 мл ночной культуры нужного штамма. Инкубируют на шейкере при 37°C 2-3 ч до  $D_{350} = 0,5$  (небольшое помутнение). Центрифугируют в стерильном холодном стакане на 100 мл при температуре 4°C 2,5 т. об/мин 8-10 мин. Супернатант аккуратно сливают в стакан и переворачивают на фильтровальную бумагу для удаления остатков супернатанта. Суспензируют в 25 мл буфера I (табл. 10) при 0°C (снег). Центрифугируют 10 мин при 4°C, осадок суспендируют в 5 мл 10%-ного буфера II (табл. 10). Расфасовывают в охлажденные стерильные эппендорфы по 200-400 мкл при 0°C (на снегу) и сразу помещают в морозильную камеру - 70°C. Клетки становятся компетентными только после заморозки.

Таблица 10

### Состав солевых буферов для придания компетентности *E.coli*

Вещество	Концентрация	Стоковая концентрация	Количество вещества
Буфер I (pH=5,8)			на 25 мл буфера
К-ацетат	30 mM	2 M	375 мкл
CaCl <sub>2</sub>	10 mM	3 M	83 мкл

KCl	100 mM	2 M	1,25 мл
Глицерин	15%	100%	3,75 мл
H <sub>2</sub> O (mQ)	-	-	18,3 мл
Автоклавировать, охладить до температуры менее 60°C			
MnCl <sub>2</sub>	50 mM	1 M	1,25 мл
Буфер II (pH=5,8)			на 5 мл буфера
MOPS	10 mM	1 M	50 мкл
CaCl <sub>2</sub>	75 mM	3 M	125 мкл
KCl	10 Mm	2 M	25 мкл
Глицерин	15%	100%	0,75 мл
H <sub>2</sub> O (mQ)	-	-	4 мл

Всё стерилизуется автоклавированием, кроме MnCl<sub>2</sub> (выпадает в осадок). Растворы хранятся в холодильнике.

### Метод экстракции ДНК Chelex-100

Смола Chelex – сорбент предназначенный для очистки и выделения ДНК из крови, бактерий, тканей и волос. Ионнообменная смола удаляет ионы тяжелых металлов и прочие ингибиторы ПЦР. Компоненты раствора смолы, используемого для выделения ДНК, представлены в табл. 11.

Таблица 11

#### Состав Chelex

Вещество	Количество вещества на 50 мл
Triton x-100	500 мкл
Tween 20	500 мкл
Chelex-100	0,5 г
Tris (1 M, pH=9,1)	1 мл
Крезоловый красный	0,002 г
H <sub>2</sub> O (mQ)	до 50 мл

Порядок выделения ДНК (из *E.coli*):

1. Необходимо раствор Chelex достать из холодильника и встряхнуть;
2. Взять пипеткой 30-50 мкл и поместить в пробирку с образцом, перемешать;
3. Инкубировать 5 мин при 95°C;
4. Центрифугировать 5 мин на 13 т. об/мин;

5. Отобранный супернатант можно использовать для ПЦР-анализа.

#### **Метод подготовки компетентных клеток *Agrobacterium***

Посев агробактерий производится со стока (хранится в морозильной камере при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ ) на 50 мл жидкой селективной среды LB+Rf (с добавлением антибиотика рифампицина) (табл. 7) и инкубируют сутки при  $25-28^{\circ}\text{C}$  при постоянном перемешивании в шейкере. Далее 1 мл культуры переносят на 100 мл среды Ym+Rf (табл. 9) и инкубируют сутки при  $25-28^{\circ}\text{C}$  на шейкере. Далее все манипуляции проводят на холоде (в снегу). Через сутки центрифугируют в стерильной  $4^{\circ}\text{C}$  (на 50 мл) и 4 раза промывают в охлажденном до  $0^{\circ}\text{C}$  10%-ном стерильном глицерине (сначала в 40 мл, перемешивают, осаждают, потом в 30 мл, 20 мл и 10 мл). Далее осадок растворяют в 1 мл стерильного охлажденного 1М сорбитола, разливают по 40 мкл в стерильные пробирки и хранят в морозильной камере при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **Электропорация компетентных клеток *Agrobacterium* для внедрения рекомбинантного бинарного вектора**

Принцип действия основан на способности билипидной клеточной мембраны формировать гидрофильные поры под действием электрического импульса и, тем самым, становиться проницаемой для фрагментов ДНК.

Перед проведением процедуры берут очищенный препарат нужной плазмиды, электрокомпетентные клетки *Agrobacterium tumefaciens* или *A. rhizogenes*, стерильную пробирку, стерильную жидкую среду LB (табл. 7), кювету и все помещают в холод (на снег). Менее 1 мкл плазмиды наливают в пробирку с *Agrobacterium*, перемешивают кончиком стерильного наконечника и держат на снегу 3 мин. Далее отбирают 60 мкл бактерий без воздуха и наливают в щель кюветы, вставляют в электропоратор (режим AgrB) и нажимают кнопку «Pulse» (параметры электропорации: 2.2 kV, время импульса - 5.7 mS). Далее берут 1 мл жидкой стерильной среды LB и вымывают ею бактерии из кюветы в стерильную пробирку (потребуется

пипетировать 2-3 раза). Пробирка перемешивается в ротаторе 3 часа при комнатной температуре и центрифугируется 1 мин при 4 т. об/мин. Из пробирки следует слить две трети жидкости и осадок перемешать на ротаторе. На твердую среду LB+Rf+Km шпателем осуществляют посев полученных бактерий.

### **2.2.2. Генно-инженерные методы**

#### **Стерилизация семян томата и табака**

Для трансформации требуются стерильные части растений, поэтому трансформируемые растения должны быть выращены в стерильных условиях в чашках Петри или в любой другой удобной стеклянной ёмкости на питательной среде MS (табл. 4). Перед посадкой семена стерилизуют следующим образом: выдерживают в течение 1 минуты в 70%-ном этаноле, далее 5 минут в 15%-ной белизне, и промывают 5 раз в стерильной деионизированной воде MilliQ (MQ).

#### **Агробактериальная трансформация стерильных эксплантов растения**

Для трансформации большинства видов растений используют суспензию растительных клеток или различные органы растений (листья, семядоли, стебли, цветки, эпикотели, гипокотили), в зависимости от вида растения и от типа *Agrobacterium*.

Очень важно использовать стерильный растительный материал, чтобы избежать контаминации трансформированной растительной ткани посторонними микроорганизмами. Контаминация может привести к гибели растительных клеток, а также исказить результаты любых биохимических и молекулярных исследований, проводимых на трансформированном материале (Дрейпер и др., 1991).

#### **Агробактериальная трансформация эксплантов табака**

Перед началом трансформации следует подготовить нужное количество гормональной среды MS (БАП – 2 мл/л, НУК – 0,02 мл/л) (для трансформации *A.tumefaciens*) (табл. 5) и безгормональной среды MS (для

трансформации *A.rhizogenes*) без антибиотиков (Табл. 6), стерильных инструментов и емкостей, а также простерилизовать кусочки фильтровальной бумаги. Цитокин и ауксин добавляются в среду после автоклавирования, поскольку гормоны разрушаются под действием высоких температур.

Далее следует нарезать экспланты из стерильных частей здоровых растений. Все манипуляции проводятся в заранее простерилизованном ламинаре стерильными инструментами (пинцеты и скальпели). Листовые пластинки табаков следует обрезать со всех краев и нарезать на более мелкие фрагменты размером приблизительно 0,5 x 0,5 или 1 x 1 см. Все экспланты помещаются на заранее подготовленную среду MS, герметизируются лабораторной пленкой и инкубируются сутки при температуре 25°C.

Следующим шагом является приготовление агробактериальной суспензии непосредственно перед трансформацией. Для этого понадобится стерильная пробирка, стерильная чашка Петри и фильтровальная бумага, 10 мл жидкой среды MS, 50 мкл ацетосирингона (20 мМ) – повышает вирулентность агробактерий, и небольшое количество *Agrobacterium* (размером со спичечную головку) трансформированных бинарным вектором pTC223. Стерильная среда MS наливается в пробирку, добавляется ацетосирингон и агробактерии, все тщательно перемешивается до растворения агробактериального комка. Полученный инокулянт выливают в чашку Петри, помещают на суспензию листовые экспланты табака нижней стороной листа кверху и выдерживают 10-15 мин (не допуская попадание инокулянта на нижнюю сторону листа). Затем просушивают экспланты на фильтровальной бумаге в течение нескольких секунд и возвращают на чашки со средой MS для дальнейшего сокультивирования.

Через 2-4 суток сокультивирования экспланты промываются в 10 мл стерильной воды качества MilliQ с добавлением 20 мг амоксиклава или 250-400 мкг/мл цефотаксима, после чего просушиваются на фильтровальной бумаге и переносятся на чашки с селективной средой MS (с добавлением

канамицина - 100 мг/л и амоксиклава - 300 мг/л). В последующем требуется тщательное наблюдение за чашками на предмет зарастания эксплантов бактериями. Если чашки зарастают, то экспланты промываются в растворе антибиотиков (амоксиклава) и пересаживаются на новые селективные чашки.

Пересадку эксплантов на свежую селективную среду MS следует проводить каждые 5 дней, поскольку именно за этот период разлагается амоксилав.

При успешной трансформации в опытных чашках через 3-4 недели наблюдается рост каллусов, затем, еще примерно через неделю, из каллусов должны появиться проростки-регенераты. Наиболее быстрорастущие и здоровые трансформанты высотой 3-5 см переносят на среду MS для укоренения.

Еще через 3-4 недели трансформанты с наиболее развитой корневой системой и высотой не менее 5 см переносят в почву для акклиматизации. Из полученных растений выделяют ДНК и проверяют на наличие целевого и маркерных генов при помощи ПЦР-анализа.

#### **Агробактериальная трансформация эксплантов томата**

Необходимо заранее приготовить среду KCMS (pH=5,5) для трансформированных эксплантов (0,5 мг/л ИУК, 100 мг/л инозитол/кинетин, 1,3 мг/л тиамин моногидрат (B1), 200 мг/л  $\text{KН}_2\text{PО}_4$ , однократные матричные растворы солей MS, 0,52%-ный агар, 3%-ая сахароза, 5 мл/л 20 мМ ацетосирингон). Все манипуляции производят в стерильных условиях в ламинарном боксе. Для трансформации отбирают листовые экспланты томата, обрезают кончики на смоченной жидкой MS стерильной фильтровальной бумаге сверху и снизу, дополнительно наносят повреждения в нескольких местах пластины стерильной иглой или пинцетом. В тот же день экспланты инокулируют суспензией агробактерий в 10 мл жидкой MS с добавлением 50 мкл ацетосирингона (20 мМ) и сокультивируют в течение 48 ч в темноте. Далее экспланты переносят на неселективную среду 2Z (зеатин - 2мг/л, амоксилав – 0,3 г/л) (Табл. 8) и культивируют в течение 5 дней при

фотопериоде 16 часов. Затем переносят на селективную среду 2Z (с добавлением 1 мг/л канамицина) и культивируют 2 недели до появления пурпурных каллусных тканей. Каллусы отделяют от эксплантов и пересаживают на неселективную среду 1Z (зеатин - 1мг/л, амоксилав - 0,3 г/л), культивируют 2 недели. Следующая пересадка производится на среду 0,5Z (зеатин - 0,5 мг/л, амоксилав - 0,3 г/л). Через 2 недели каллусная ткань переносится на среду для побегообразования (2Z, но вместо зеатина - 0,1 мг/л гиббереллиновой кислоты, амоксилав - 0,3 г/л) и пересаживают на свежие среды каждые 2 недели. Самые большие и сильные регенеранты переносят на среду для укоренения (соли MS, 3%-ая сахароза, 0,8%-ый агар, 1 мл/л витамины Nitsch). Трансформанты с наиболее развитой корневой системой переносят на почву для акклиматизации. Из полученных растений выделяют ДНК и проверяют на наличие целевого и маркерных генов при помощи ПЦР-анализа.

### **Агробактериальная трансформация томата *in planta***

#### **Метод инъекции плодов *in vivo***

Для приготовления суспензии понадобится небольшое количество агробактерий и 9%-ный раствор NaCl. Всё смешивают в стерильной пробирке. Инокулировать плоды можно с помощью шприца или пипетки 2 раза подряд, предпочтительнее в верхнюю часть плода, возле чашелистика. Трансформация проходит эффективнее при введении суспензии агробактерий в плоды на ранней стадии зрелости (Yasmeen et al., 2009).

#### **Метод погружения цветков (Floral dip)**

Для приготовления инокулянта понадобится небольшое количество агробактерий и 30%-ный раствор сахарозы. Всё смешать в стерильной пробирке. Инокулировать плоды можно с помощью пипетки, без разрывов органов цветка, или при помощи инсулинового шприца. Трансформация проходит эффективнее при инокуляции нераскрытых цветков до опыления (Yasmeen et al., 2009).



### **2.2.3. Молекулярно-генетические методы**

#### **Выделение ДНК методом СТАВ**

Метод СТАВ (Cetyltrimethylammonium bromide) подходит для выделения ДНК из взрослых листьев и корней растений. Экстракция проводится в два дня. Состав реактивов для СТАВ приведен в табл. 12.

Первый день:

1. В пробирки с фрагментами корней помещают 2 стальных шарика и измельчают образцы в гомогенизаторе.
2. Приливают 600 мкл 2хСТАВ, инкубируют 1 час при 65°C предварительно перемешав.
3. Охлаждают до комнатной температуры, приливают в пробирки 600 мкл раствора хлороформа и изоамилового спирта (24:1), мешают 20 мин.
4. Центрифугируют на 5 т. об/мин в течение 10 мин.
5. Удаляют шарики, сливают водную фазу в новые пробирки и добавляют к ней 0,2 объема водной фазы 5хСТАВ, перемешивают и инкубируют 10 мин при 65°C.
6. Добавляют равный объем хлороформа и изоамилового спирта (24:1), мешают 10 мин.
7. Центрифугируют при 8 т. об/мин в течение 10 мин.
8. Если раствор мутный или средняя фаза слишком большая, то следует повторить пункт 6 и 7.
9. Отбирают верхнюю фазу в чистые пробирки и добавляют 2 объема буфера для преципитации, перемешивают и оставляют на ночь при комнатной температуре.

Второй день:

1. Центрифугируют пробирки на 12 т. об/мин при комнатной температуре в течении 20 мин. Должна выпасть ДНК. Если осадок не выпал – добавляют буфер для преципитации, оставляют на 1 час при комнатной температуре и снова центрифугируют.
2. Жидкую фазу аккуратно сливают (осадок должен остаться в

пробирке) и сушат пробирки с открытой крышкой на бумаге.

3. Осадок растворяют в 500 мкл HS-TE буфера и перемешивают.
4. Добавляют 2 объема 96%-ого этанола и держат при температуре -20°C 2 ч или при -70°C 1 ч.
5. Центрифугируют на 12 т. об/мин при температуре 4°C, сливают жидкую фазу.
6. К осадку добавляют 100 мкл MQ и 50 мкл NH<sub>4</sub>Ac pH=7,5, перемешивают, держат 20 мин при 0°C.
7. Центрифугируют на 13 т. об/мин при температуре 4°C 10 мин, и отбирают надосадочную жидкость в новые пробирки. Далее добавляют 2 объема 96%-ого этанола и держат час при температуре -20°C или 20 мин при температуре -70°C.
8. Центрифугируют на 13 т. об/мин при температуре 4°C 20 мин.
9. Промывают осадок в 80%-ном эталоне, жидкую фазу отбирают аккуратно микропипеткой, просушивают на бумаге.
10. Осадок растворяют в 30-50 мкл MQ и убирают в морозилку (-20°C).

Таблица 12

**Состав реактивов для СТАВ**

Вещество	Концентрация /л
2х СТАВ буфер	
СТАВ (CetilTrimetylAmmoniumBromid)	20 г
NaCl	81,75 г
TrisHCl pH=8	1 мл
EDTA (0,5 М)	40 мл
5х СТАВ	
СТАВ	50 г
EDTA (0,5 М)	700 мл
Буфер для преципитации	
СТАВ	10 г
TrisHCl pH=8	50 мл
EDTA (0,5 М)	20 мл
HS-TE буфер	
NaCl	58,8 г
TrisHCl pH=8	10 мл
EDTA (0,5 М)	2 мл

## Амплификация ДНК

Амплификация ДНК - увеличение малых концентраций определенных молекул нуклеиновой кислоты в пробе, проводится методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Реакционная смесь для ПЦР объемом 30 мкл содержит следующие компоненты: 1 ед. Таq-полимеразы («Евроген», Россия), 3 мкл 10-кратного буфера Таq-полимеразы, 0,25 ммоль каждого dNTP, 90 пМ праймера, 1-1,5 мкл тотальной ДНК, 20 мкл MQ. Смесь покрывали каплей минерального масла.

Реактивы добавляются в каждую пробирку или сначала смешиваются в одной пробирке (все, кроме минерального масла и ДНК) с учетом плюс и минус контролей с запасом на одну пробирку, и затем раскапываются по 28,5-29 мкл. Далее добавляют минеральное масло и образец ДНК, откручивают и оставляют для проведения реакции в термоциклере производства компании «ДНК-технология» (Россия) с использованием следующих протоколов.

Далее представлены параметры ПЦР с праймером Km1217 (табл. 13) и праймером VirC (табл. 14) в 30 мкл. Основные характеристики праймеров представлены в табл. 15.

Таблица 13

**Параметры ПЦР с праймером Km1217 в 30 мкл**

Этап	Температура,	Время		Число циклов
Денатурация	94°C	3 мин	-	1
Отжиг праймера	94°C	-	40 сек	35
	60,4°C	-	40 сек	
	72°C	-	40 сек	
Элонгация	72°C	2 мин	-	1
Хранение	16°C	-	-	-

Таблица 14

**Параметры ПЦР с праймером VirC в 30 мкл**

Этап	Температура,	Время		Число циклов
Денатурация	94°C	5 мин	-	1
Отжиг	94°C	-	30 сек	35

Праймера	55°C	-	30 сек	
	72°C	1 мин	-	
Элонгация	72°C	3 мин	-	1
Хранение	16°C	-	-	-

Таблица 15

### Характеристики праймеров Km1217 и VirC

Km1217	
Forward (5' – 3')	-CTCTTCAGCAATATCACGGGTAGC-
Reverse (3' – 5')	-GATGGATTGCACGCAGGTTCT-
Функция гена	Устойчивость к канамицину
Размер продукта	681 п.н.
Температура отжига	60,4°C
VirC	
Forward (5' – 3')	ATCATTTGTAGCGACT
Reverse (3' – 5')	AGCTCAAACCTGCTTC
Функция гена	Специфичный белок вирулентности <i>A.rhizogenes</i>
Размер продукта	730 п.н.
Температура отжига	55°C

### Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез в гелях – метод разделения макромолекул на основе их размера, электрического заряда и других физических свойств. Движущей силой электрофореза является напряжение, прикладываемое к электродам на каждом конце геля. Множество биологических молекул (аминокислоты, пептиды, белки, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты) обладают ионизируемыми группами и, при любом рН, существуют в растворе как электрически заряженные частицы: как катионы (+), либо как анионы (-). В зависимости от природы заряда среды, заряженные частицы будут мигрировать либо к катоду (-), либо к аноду (+) (Westermeier, 1997). Силы трения материала, образующего гель, действуют как «молекулярное сито», разделяя молекулы по размеру (Sambrook et al., 1989).

Для проведения фореа понадобятся амплифицированные фрагменты ДНК, ДНК-маркеры известной длины, прибор для горизонтального или вертикального электрофореза, источник тока, СВЧ печь, микропипетки, весы для взвешивания навесок, шпатели, стеклянная и мерная посуда,

ультрафиолетовый (УФ) трансиллюминатор, фотоаппарат для документирования результатов.

### **Приготовление агарозного геля**

Агароза – природный коллоид, который выделяют из морских водорослей, является линейным полисахаридом. Агарозные гели имеют «поры» большого размера и используются преимущественно для разделения больших молекул (с молекулярной массой больше 200кДа) (Sambrook et al., 1989).

Таблица 16

#### **Пропись компонентов агарозного геля**

Концентрация геля	1%	1,2%
Дистиллированная вода	100 мл	60 мл
ТАЕ (Tris-ацетат) 50х рН=8	2 мл	1,2 мл
Агароза	1 г	0,72 г

Все компоненты из табл. 16. помещаются в колбу объемом 250 мл и нагреваются в СВЧ печи до растворения агарозы и прозрачности (1,5 – 2 мин). Содержимое колбы выливают в предварительно выровненную чистую и сухую подставку. Далее погружаем гребёнки на расстоянии 0,5 – 1 мм от дна подставки. Гель застывает за 20 мин. Вынимаем гребёнки, переносим гель в камеру для фореа и заливаем буфером ТАЕ.

### **Приготовление буфера ТАЕ**

На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В отсутствие ионов, электропроводность минимальная и перемещение ДНК происходит медленно или совсем не происходит. В буфере с высокой ионной силой очень высокая электропроводность и активная выработка тепла. В таком случае есть риск денатурации ДНК и плавления геля (Sambrook et al., 1989).

Для приготовления ТАЕ буфера в литровый стакан наливают примерно 800 мл дистиллированной воды, мерным цилиндром приливают 20 мл ТАЕ х50 и размешивают стеклянной палочкой. Доводят оставшейся водой до

литра. Буфер можно использовать несколько раз (но не более двух раз для RAPD-анализа).

ТАЕ (Tris-ацетат) x50 pH=8 готовят следующим образом. В мерную колбу на 1 л добавляют дистиллированную воду чуть ниже максимальной метки, добавляют и растворяют Tris-основание 242 г, ледяную уксусную кислоту 89,6 мл и Na<sub>2</sub>ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Доводят водой до литра.

### **Визуализация результатов электрофореза**

Локализация ДНК в геле может быть определена путем окрашивания бромистым этидием (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>BR) – флуоресцентным интеркалярным красителем, в низких концентрациях. Экспозиция геля 6-8 мин. Является сильным мутагеном/канцерогеном и умеренно токсичен (Sambrook et al., 1989).

Раствор бромистого этидия (10 мг/мл) готовят под тягой в перчатках. Срок хранения не более 12 месяцев (в темной посуде при температуре 4-5°C).

### **Документирование результатов электрофореза**

Окрашенный гель помещают в темный бокс УФ-транслюминатора, подключенному к ПК, делают снимок с помощью фотоаппарата, обрабатывают и сохраняют снимок с помощью пакета программ *Lab Works* 4.0 (UVP).

## ***2.2.4. Методы изучения антоцианов***

### **Экстракция антоцианов раствором 96% этанола**

Вытяжку антоцианов проводили модифицированным способом бескислотного экстрагирования 96% этанолом (Пат. 2228344, 2003). Способ предусматривает предварительную сушку и измельчение биоматериала. Экстракцию осуществляют 2 раза 96% этанолом с нагреванием до 80-100°C в термостате или на водяной бане. Экстракты концентрировались до содержания сухих веществ 50-65% путем выпарки этанола и фильтровались через бумагу.

### **Экстракция антоцианов раствором соляной кислоты**

Способ предусматривает предварительную сушку, взвешивание и измельчение биоматериала. Перед экстракцией исследуемый материал измельчали в гомогенизаторе в пыль. Вытяжку антоцианов проводили 0,1 М водным раствором соляной кислоты. Экстракцию осуществляют 2 раза. Залитые раствором кислоты экстракты выдерживаются сутки, а затем фильтруются через бумагу, возвращаются в пробирки и заливаются снова на сутки. Соотношение сырьё – экстрагент (1:50).

### **Метод рН-дифференциальной спектрофотометрии**

Данный метод используется в мировой практике для определения массовой концентрации (массовой доли) суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозид. Метод основан на изменении поглощении света с длиной волны 510 нм при изменении кислотности растворов от 1,0 до 4,5 рН. В спектре 510-540 нм антоцианы имеют специфичные максимумы поглощения. Измерение оптической плотности при 700 нм проводят для установления величины поглощения света посторонними примесями.

Условия проведения измерений:

- а) Температура окружающего воздуха -  $25 \pm 5^\circ\text{C}$ ;
- б) Атмосферное давление -  $97 \pm 10$  кПа;
- в) Относительная влажность воздуха -  $65 \pm 25\%$ ;
- г) Частота переменного тока -  $50 \pm 5$  Гц;
- е) Напряжение сети -  $220 \pm 10$  В.

Кислотность среды определяют с помощью рН-метра. Полученные экстракты доводятся до значения рН=1,0 (для перехода антоцианов в окрашенную флавилиевую форму, обуславливающую красную окраску) и рН=4,5 (окраска антоцианов практически исчезает из-за образования псевдооснования, которое находится в равновесии с двумя *цис*- и *транс*-халконными формами) (Лапшова и др., 2014).

Результатом измерений является разность оптической плотности растворов ( $\Delta D$ ) с 1,0 и 4,5 рН при длинах волн 510 и 700 нм соответственно, которая пропорциональна массовой концентрации антоцианов в растворе (ГОСТ 32709-2014). Значения оптической плотности должны находиться в пределах 0,2-1,0. Если значение более 1,0 – уменьшают объем аликвоты разбавлением, если менее 0,2 – увеличивают.

Разность оптической плотности растворов вычисляют как разность оптических плотностей растворов при разных длинах волн и соответствующих значениях рН по формуле 1.1.

$$\Delta D = (D_{510} - D_{700})_{pH1,0} - (D_{510} - D_{700})_{pH4,5}, \quad (1.1)$$

где:  $D_{510}$  – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 510 нм;

$D_{700}$  – оптическая плотность раствора пробы при длине волны 700 нм.

Массовую концентрацию антоцианов в г/100 г исходного сырья, в пересчёте на цианидин-3- глюкозид, вычисляют по формуле 1.2.

$$C = \frac{\Delta D * M * V_1 * P * 100}{V_2 * \varepsilon * l * m}, \quad (1.2)$$

где:  $\Delta D$  – разность оптической плотности раствора;

$M$  – молекулярная масса цианидин-3-глюкозида (449,2 г/моль);

$V_1$  – объём экстрагента, мл;

$P$  – коэффициент разбавления;

$V_2$  – объём аликвоты, взятый на определение, мл;

$\varepsilon$  – молярный коэффициент экстинкции цианидин-3-глюкозида (26900 дм<sup>3</sup>\*моль<sup>-1</sup> \*см<sup>-1</sup>);

$l$  – длина оптического пути кюветы, см;

$m$  – масса пробы, взятой для определения, г.



### **2.2.5. Биоинформатические методы**

Для успешной генетической модификации растений с помощью CRISPR-плазмиды в геноме должны содержаться последовательности, гомологичные гидРНК (нацеленные на специфичные регуляторные последовательности) и *homology arms* (последовательности, фланкирующие вставку). Поиск таких последовательностей позволяет проводить BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK\\_LOC=blasthome&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastn](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastn)).

Нуклеотидные последовательности получали из базы данных «GeneBank» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Схема эксперимента

Этапы создания генетически модифицированных растений томата и табака представлены в виде схемы эксперимента (Рис. 6).

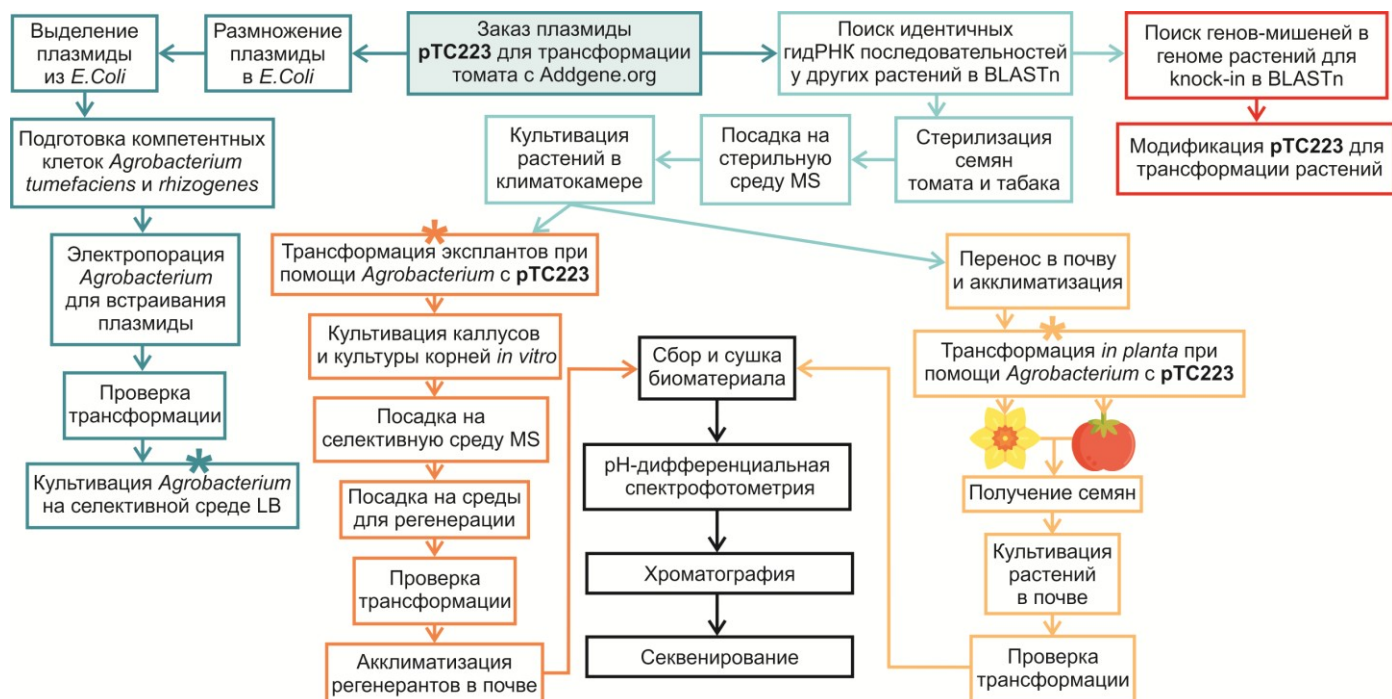


Рис. 6. Схема эксперимента по модификации генома растений, с целью получения сортов с повышенным содержанием антоцианов.

CRISPR-плазмида pTC223 была заказана с AddGene (<https://www.addgene.org/>). Полученные штаммы *A.tumefaciens* AGL0 и *A.rhizogenes* штамма A4 и 15834, трансформированные pTC223, использовались для приготовления инокулянта и трансформации эксплантов *in vitro* и генеративных органов *in planta*.

### 3.2. Биоинформатический анализ

При анализе генома *Solanum lycopersicum* были найдены регуляторные гены, участвующие в биосинтезе антоциановых пигментов в различных частях растения. Группа ученых (Kiferle et al., 2015) сравнивала предполагаемые белки MYB томата с основными регуляторными факторами MYB, участвующими в синтезе антоцианов у других видов растений. Четыре различных MYB-белка томата SlAN2, SlANT1, SlANT1like и SlAN2like,

кодируемых генами Solyc10g086250, Solyc10g086260, Solyc10g086270 и Solyc10g086290 соответственно, оказались гомологичными MYB-белкам табака (*Nicotiana tabacum*), петунии (*Petunia*) и картофеля (*Solanum tuberosum*) – представителей семейства паслёновые (*Solanaceae*). Из этого можно сделать предположение о том, что встраивание перед этими генами сильных конститутивных промоторов (например, 35S вируса мозаики цветной капусты) может привести к накоплению антоцианов в различных тканях и органах растений.

Для генетической модификации генома растений с помощью рТС223 в геноме должна содержаться последовательность, гомологичная гидРНК (TCGTTTATAATTTGTAGAG) (рис. 7 и 8) и homology arms – последовательности, фланкирующие вставку - донорную матричную последовательность (donor template) (35S и ген резистентности к канамицину) из рТС223. Поиск таких последовательностей позволяет проводить BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)).

The screenshot shows a BLASTn search result for the sequence TCGTTTATAATTTGTAGAG. The search was performed against the Solanum lycopersicum cultivar Heinz 1706 chromosome 10, SL3.0. The sequence ID is NC\_015447.3, with a length of 65633393 and 1315 matches. The top match is at range 65261848 to 65261865. The score is 36.2 bits (18), with an expect value of 0.032, 18/18 (100%) identities, 0/18 (0%) gaps, and a plus/minus strand. Features include 104 bp at the 5' side (anthocyanin 1) and 5877 bp at the 3' side (transcription factor MYB113). The alignment shows a perfect match between the query and the subject sequence.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
36.2 bits(18)	0.032	18/18(100%)	0/18(0%)	Plus/Minus

Features: [104 bp at 5' side: anthocyanin 1](#)  
[5877 bp at 3' side: transcription factor MYB113](#)

```

Query 1          TCGTTTATAATTTGTAGA 18
Sbjct 65261865  TCGTTTATAATTTGTAGA 65261848
  
```

Рис. 7. Последовательность в геноме томата, гомологичная гидРНК рТС223, найденная с помощью BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Download ▾ GenBank Graphics sort by: E value ▾				
Nicotiana tabacum chalcone synthase (CHS6) gene, promoter region				
Sequence ID: <a href="#">KX304061.1</a> Length: 2000 Number of Matches: 2				
Range 1: 1824 to 1835 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
24.3 bits(12)	36	12/12(100%)	0/12(0%)	Plus/Plus
Query 4	TTTATAATTTGT	15		
Sbjct 1824	TTTATAATTTGT	1835		
Range 2: 976 to 985 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>			▼ Next Match	▲ Previous Match ▲ First Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
20.3 bits(10)	564	10/10(100%)	0/10(0%)	Plus/Plus
Query 7	ATAATTTGTA	16		
Sbjct 976	ATAATTTGTA	985		

Рис. 8. Последовательность в геноме табака, гомологичная гидРНК рТС223, найденная с помощью BLASTn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX304061.1>).

\*\*\*

Таким образом, при помощи BLASTn в геноме *Nicotiana tabacum* был найден участок, гомологичный гидРНК рТС223 (рис. 8), причем, данный участок кодирует промоторный регион гена халькон-синтазы (CHS) – фермента, который принимает непосредственное участие в процессе биосинтеза антоцианов. Воздействие CHS на молекулу Р-кумароила-коэнзима А инициирует в дальнейшем синтез нарингенин-халькона и далее флавоноидов (Щербаков и др., 2012). Поэтому табак был выбран в качестве объекта трансформации в настоящем исследовании.

### 3.3. Агробактериальная трансформация *in vitro*

Далее приведена статистика по листовым эксплантам томатов и табаков, подвергшихся трансформации:

1. Табак 1 А4: 15 эксплантов;
2. Табак 1 15834: 13 эксплантов – 6 корней;
3. Табак 2 AGL0: 26 эксплантов;
4. Томат 1 А4: 10 эксплантов – 2 корня;

5. Томат 1 15834: 9 эксплантов – 3 корня;
6. Томат 1 AGL0: 20 эксплантов;
7. Томат 2 А4: 8 эксплантов – 3 корня;
8. Томат 2 15834: 9 эксплантов – 2 корня;
9. Томат 2 AGL0: 33 экспланта – появилась розоватая окраска (исчезла через 12 дней);
10. Томат 3 AGL0: 21 эксплант – появилась розоватая окраска (исчезла через 12 дней).

Экспланты томата после обработки инокулянтом с *A.tumefaciens* AGL0 рТС223 на 2-3 день приобрели окраску в виде розовато-сиреневого налета (Рис. 9), который исчез через 12 дней. В контрольных чашках наблюдалось аналогичное изменение окраски. Из этого можно сделать вывод, что появление окраски – результат выработки естественных антоцианов, в ответ на воздействие стресса (например, наличие антибиотиков в составе питательной среды).

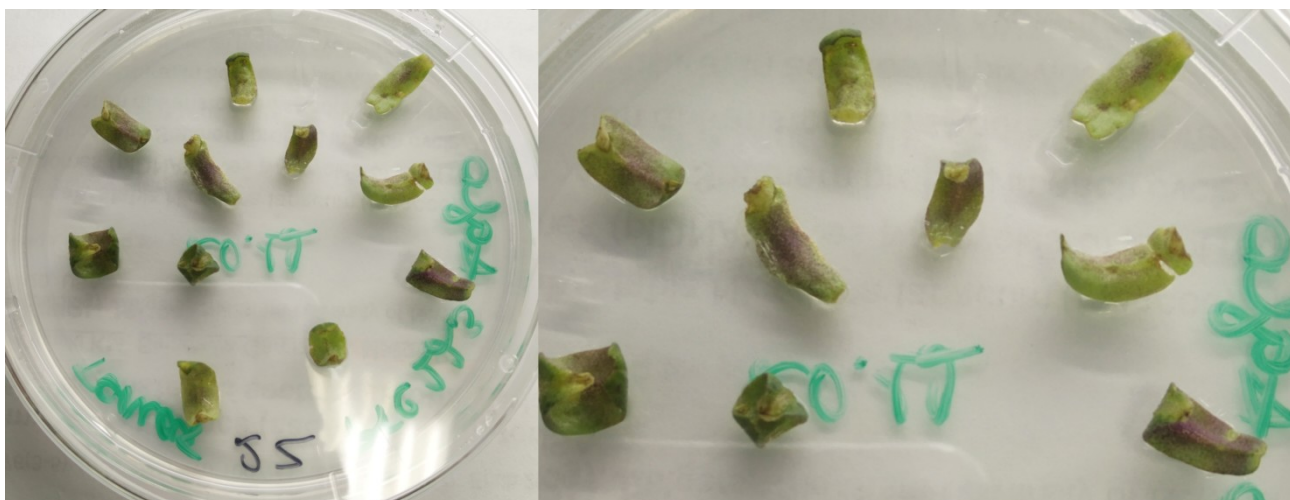


Рис. 9. Появление антоциановой окраски у эксплантов томата.

Установлено, в качестве неселективного антибиотика для культуры томатных тканей больше подходит амоксиклав, чем цефотаксим. Но при

использовании данного антибиотика требуется пересадка эксплантов на свежую среду каждые 5 дней, т.к. амоксиклав довольно быстро разрушается.

Точное количество и ПЦР-анализ линий, трансформированных штаммом *A.tumefaciens* AGL0 pTC223, будут проводиться после получения регенерантов, поскольку в культуре каллуса каждая клетка потенциально может регенерировать в целое растение. Предварительно нами получено 10 линий табака и 2 линии каллусной культуры томата. Предпочтительными для регенерации являются темноокрашенные ткани, предположительно накапливающие антоцианы.

\*\*\*

Таким образом, с использованием *A.rhizogenes* штамма A4 pTC223 было получено 6 линий бородатых корней табака и 1 линия томата. С использованием штамма 15834 pTC223 было получено 19 линий корней табака и 9 линий томата. Всего линий бородатых корней: томата - 10, табака - 25. Образование корней у эксплантов табаков и томатов обработанных *A.rhizogenes* штамма 15834 проходит эффективнее чем у эксплантов, обработанных штаммом A4. С использованием *A.tumefaciens* штамма AGL0 pTC223 получено 10 линий табака и 2 линии каллусной культуры томата.

### **3.4. Получение регенерантов**

Регенерация у табака происходит на той же среде, что и культивация каллуса и корней (MS+Km). Она может происходить как в культуре каллусов (Рис. 10), так и в культуре корней (Рис. 11 и 12), но требуется перенос регенерантов в сосуд с большим объемом.

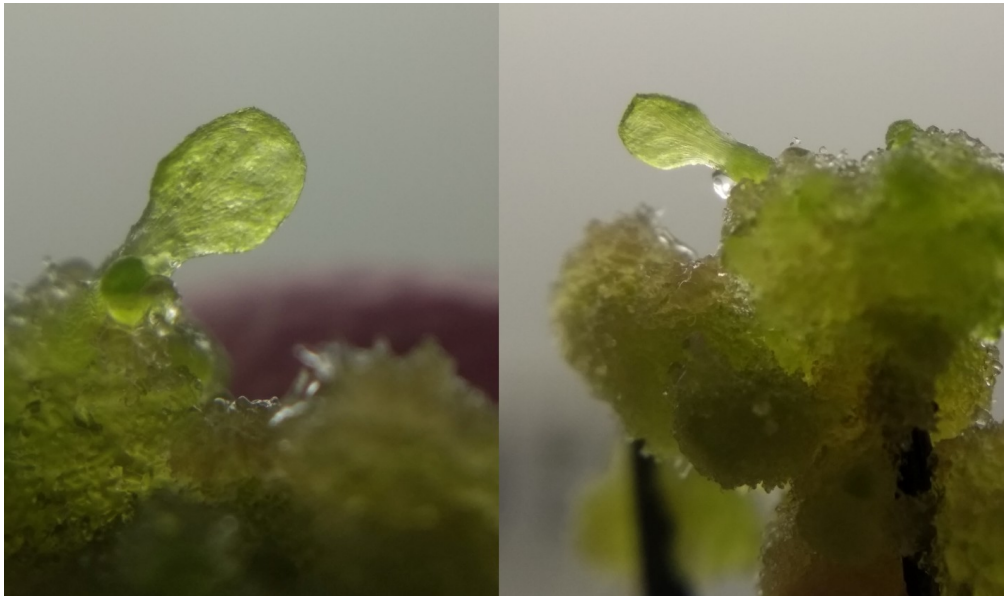


Рис. 10. Начальная стадия регенерации растений табака из культуры каллуса



Рис. 11. Появление регенерантов табака из культуры корней.



Рис. 12. Развитие каллусов и регенерация табака из культуры корней.

Для регенерации томата (рис.13) требуется постепенное снижение концентрации зеатина (2, 1 и 0,5 мг/л) в составе питательной среды Z и пересадка в более просторный сосуд. Для переноса на среду для регенерации выбирают темноокрашенные ткани. Регенерации из культуры бородатых корней у томата не наблюдалось.



Рис. 13. Регенерация томата из каллусной культуры на среде 1Z.

Далее самые жизнеспособные и темноокрашенные регенеранты будут перенесены на почву для акклиматизации. На данном этапе станет возможен ПЦР-анализ ДНК регенерантов, а также идентификация и количественное определение антоцианов из вытяжки различных органов и тканей растения.

\*\*\*

Таким образом, в ходе эксперимента были подобраны оптимальные условия и составы гормональных питательных сред для регенерации целых растений из культуры каллусов томата и табака. Регенерация растений из культуры бородатых корней наблюдается только у табака.



### 3.5. ПЦР-анализ линий бородатых корней

Для проверки трансформации из полученных линии корней выделяли ДНК методом СТАВ, а затем проводили ПЦР-анализ на наличие в образцах специфичных последовательностей и контаминации *A.rhizogenes* и *A.tumefaciens*.

Для выявления содержания в образцах ДНК из корней томатов и табаков гена устойчивости к канамицину и, соответственно, проверки трансформации растений, была проведена ПЦР с использованием праймера Km1217. Параметры ПЦР представлены в табл. 13.

После электрофоретического разделения продуктов амплификации, окрашивания и визуализации были получены следующие результаты (рис. 14).

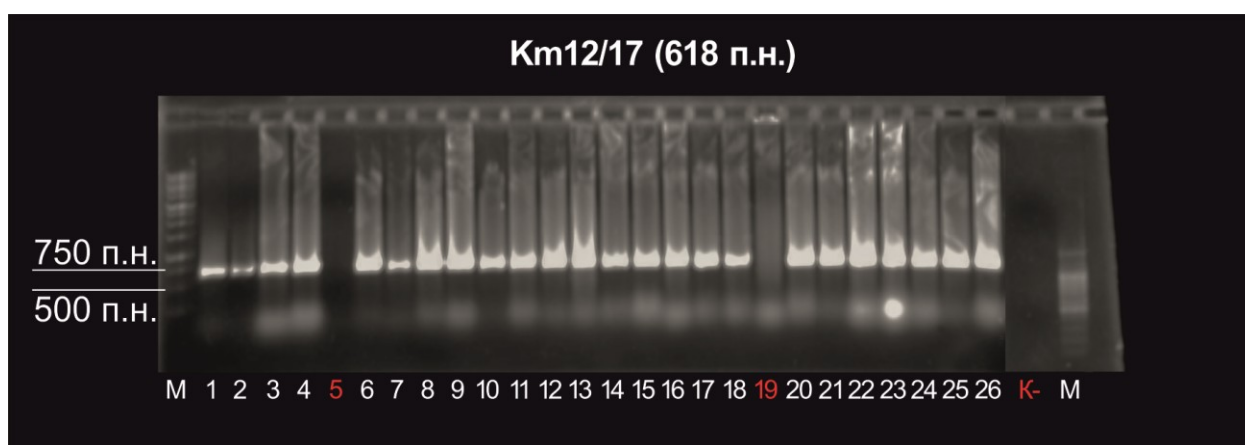


Рис. 14. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК из корней томатов и табаков с праймером Km1217.

Как видно на рис. 14, образцы 5 и 19 не содержат искомую последовательность. Следовательно, в этих образцах трансформация не произошла, и они были исключены из дальнейшего анализа и использовались в качестве контроля (К-).

Для выявления контаминации *A.rhizogenes* образцов ДНК из корней томатов и табаков была выполнена амплификация образцов с

использованием праймера VirC и получены следующие результаты (рис. 15).  
Параметры ПЦР представлены в табл. 14.

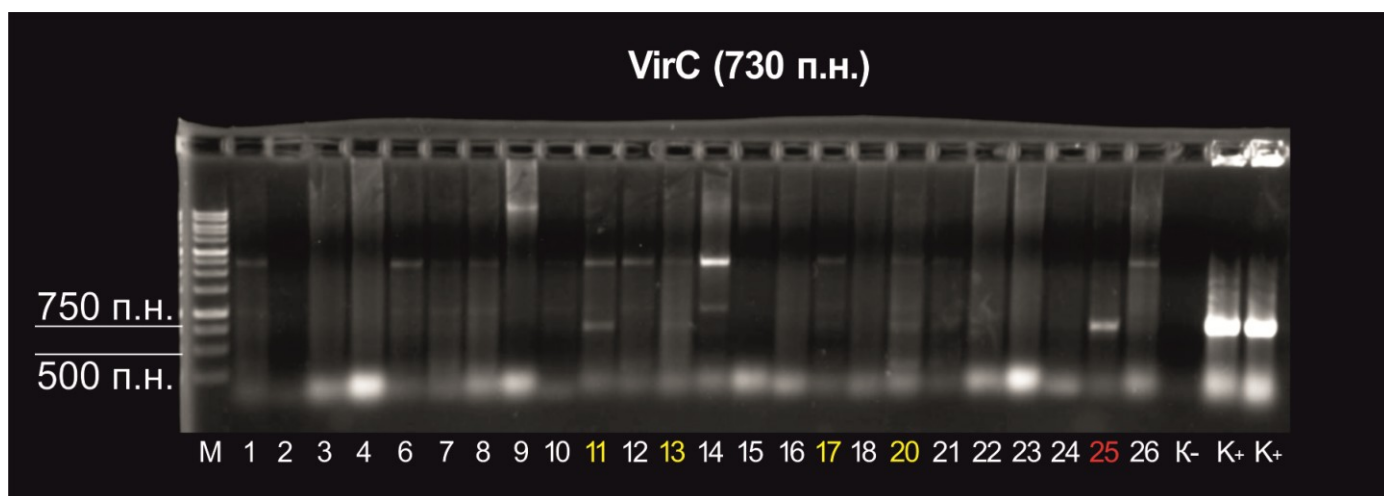


Рис. 15. Электрофореграмма продуктов амплификации образцов ДНК из корней томатов и табаков с праймером VirC

В результате анализа продуктов амплификации обнаружена контаминация ДНК из корней клетками *A.rhizogenes* образца под номером 25 и, возможно, 11, 13, 17 и 20 образцов. Поэтому нельзя утверждать, что в данных образцах произошла трансформация.

\*\*\*

Таким образом, можно сделать вывод, что из 26 линий бородатых корней табака и томата 19 могут оказаться генетически модифицированными (что составляет примерно 73%). Для уточнения результата потребуются секвенирование ДНК образцов или продолжении культивирования культуры корней на среде с антибиотиком до полной элиминации бактерий.

### 3.6. Изменение окраски спиртовых экстрактов

В качестве контроля были взяты образцы корней томатов и табаков, трансформированные *A.rhizogenes* штаммами А4 и 15834, не несущих рТС223 (К-), и сушеные листья бегонии королевской (*Begonia Rex*) (К+).

Известно, что окраска антоциановых пигментов зависит от pH среды. Для проверки наличия антоцианов в полученных спиртовых вытяжках из корней производилось изменение pH раствора, путем постепенного добавления в него 1% соляной кислоты и 0,001% NaOH. Опыт лучше начинать с добавления кислоты.

Для опыта были выбраны вытяжки:

1. (K-) из корня томата А4;
2. из корня томата 1 линии 5 ДНК 9 А4 рТС223;
3. из корня табака 1 15834 рТС223;
4. (K+) из сушеных листьев *Begonia Rex*.

Для анализа отбирались наиболее темноокрашенные образцы корней. Различие в окраске экспериментальных и контрольных культур корней заметно как на среде в чашке (Рис. 16), так после высушивания биоматериала (Рис. 17).

Также отмечается потемнение самой питательной среды, что может быть следствием накопления и окисления фенольных соединений (Jones et al., 2013), к которым, в частности, относятся и антоциановые пигменты. Окислительное потемнение (oxidative browning) является распространенным явлением в культуре тканей растений и может негативно сказываться на росте и развитии *in vitro* культуры.

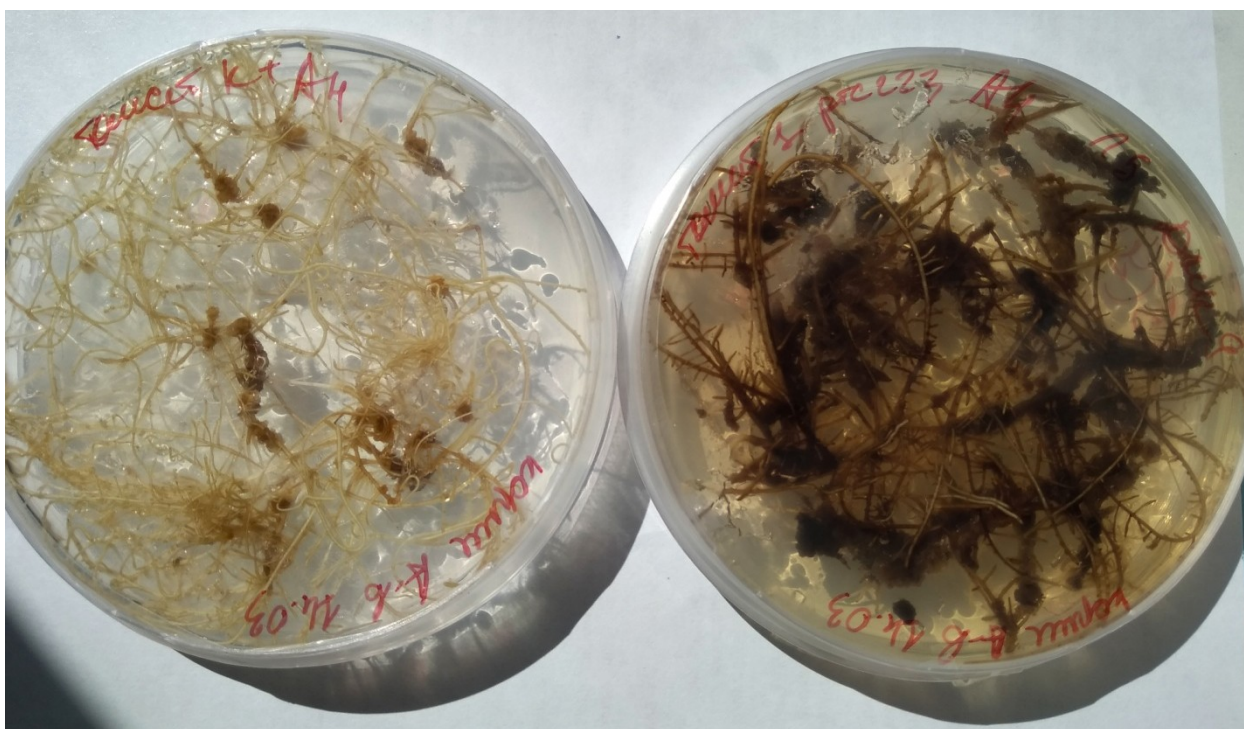


Рис. 16. Корни томатов К- А4 и томата 1 линии 5 ДНК 9 А4 рТС223. Наблюдается визуальные различия степени окраски корней.



Рис. 17. Корни томатов и табаков перед экстракцией. Самым темноокрашенным является образец корней томата 1 линии 5 ДНК 9 А4 рТС223.

После экстракции из корней были получены вытяжки бледно-желтого цвета (Рис. 18). При постепенном добавлении к экстрактам по капле 1% соляной кислоты не наблюдалось значительного изменения окраски: вытяжка

становилась лишь светлее. Экстракт из *Begonia Rex* имел буроватую окраску. При добавлении кислоты окраска изменялась на красновато-розовый (Рис. 19). При добавлении 0,001% едкого натра окраска изменялась неравномерно: нижняя фракция окрашивалась в зеленый, тогда как верхняя - в фиолетово-синий.

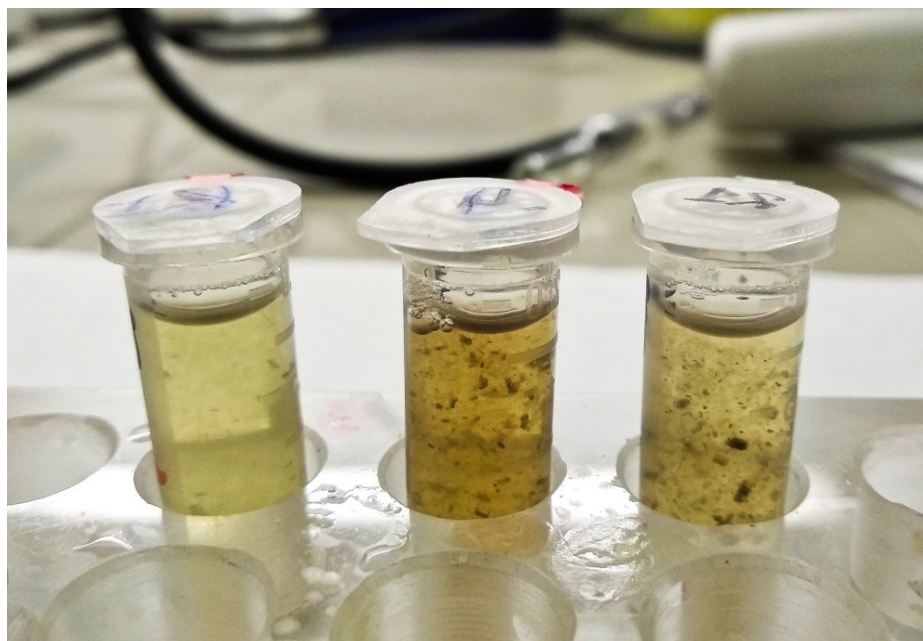


Рис. 18. Экстракты из корней томата и табака (слева-направо: томат К- А4, томат 1 линии 5 ДНК 9 А4 рТС223, табак 1 15834 рТС223).

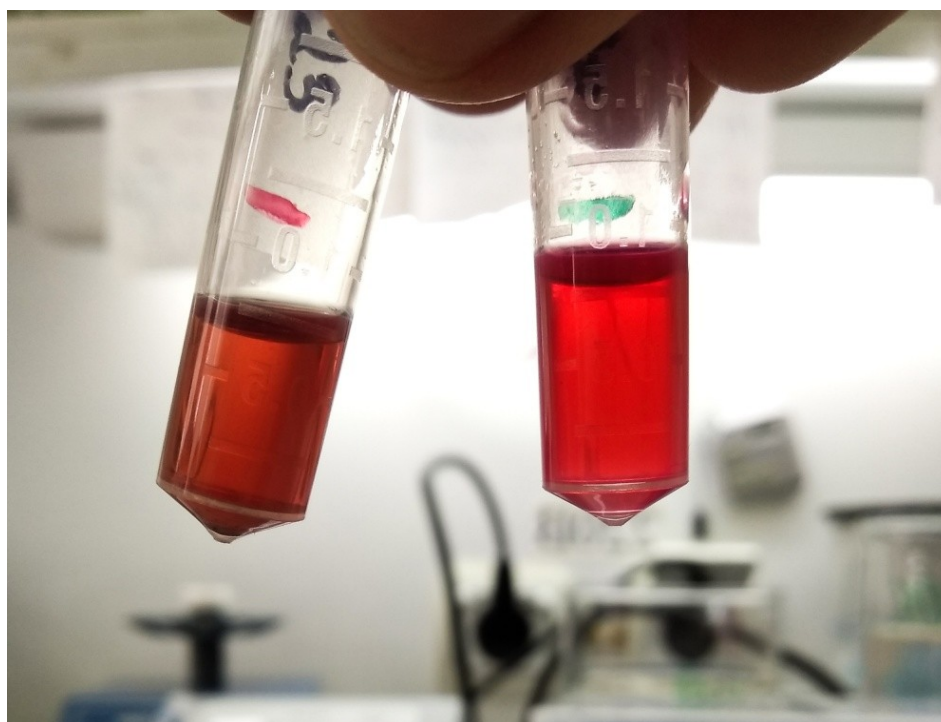


Рис. 19. Экстракты (K<sup>+</sup>) из листьев *Begonia Rex* (слева-направо: свежесделанный экстракт, экстракт с добавлением 1% HCl).

\*\*\*

Таким образом, установлено что, экстракты из корней табака и томата не изменяли окраску под действием кислоты и щелочи, в отличие от контрольного образца из *Begonia Rex*. На это может быть две причины. Первая - концентрация антоцианов в экстракте слишком мала и изменение окраски может быть визуально неразличимо, из-за маскировки антоциановой окраски другими балластными веществами и пигментами. Вторая – экспрессии данного гена и накопления антоцианов в корнях не происходит. Антоциановая окраска в трансформированных *A.rhizogenes* бородатых корнях наблюдается обычно только в тех случаях, когда пигменты в больших количествах содержатся и в интактных растениях. Для точного установления присутствия, концентрации и идентификации антоциановых пигментов потребуются хроматографические и рН-дифференциальные спектрофотометрические методы исследования экстрактов антоцианов.

### 3.7. Спектрофотометрическое рН-дифференциальное исследование

Для проведения исследования использованы вытяжки из корней томатов и табаков, полученные с помощью 0,1 М раствора соляной кислоты (рис. 20). В качестве плюс контроля – экстракт из сушеных листьев *Begonia Rex* (K+).

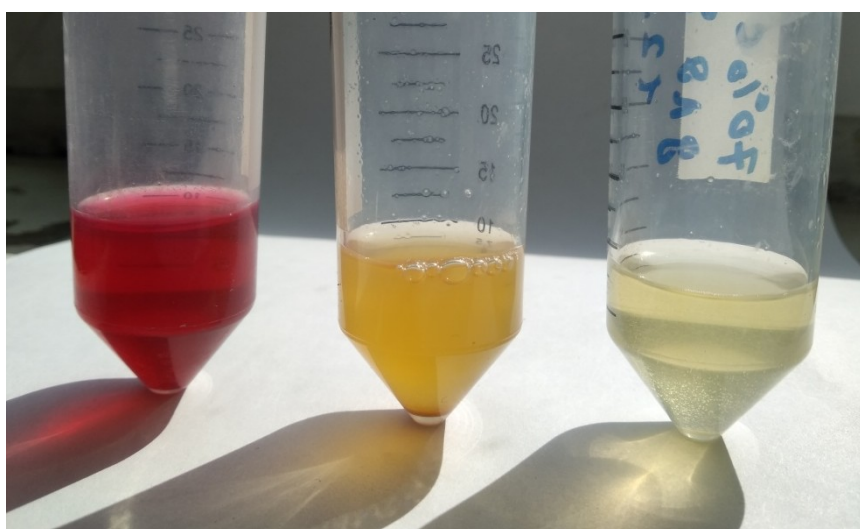


Рис. 20. Вытяжки, полученные с помощью 0,1 М раствора соляной кислоты (слева-направо: бегония (K+), табак 1 ДНК 6 линия 2, томат 2 ДНК 22 линия 6)

При работе использовали спектрофотометр SmartSpec Plus (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Спектры записывали в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см. Измерения проводили с длиной волны 510 и 700 нм. В качестве раствора сравнения – 0,1 М водный раствор соляной кислоты. Объем пробы, отобранной для анализа, составляет 100 мкл. Кислотность среды определяли с помощью рН-метра HI 83141 (Hanna Instruments). Экстракты доводились до нужного значения рН водными растворами 0,1 М HCl и 0,7 М КОН. Снимали спектры и записывали максимумы поглощения. При необходимости разбавляли экстракт и повторяли измерение. Разность оптической плотности ( $\Delta D$ ) рассчитывалась по формуле 1.1. Результаты измерений и вычислений представлены в табл. 17.

Таблица 17

**Изменения спектра поглощения экстрактов  
в зависимости от рН и длины волны (D, нм)**

Растение	ДНК	Образец			рН=1		рН=4,5		$\Delta D$
		Линия	Штамм <i>A.rhiz.</i>	Сухая масса, г	D=510	D=700	D=510	D=700	
Томат	К-	-	A4	0,094	0,696	0,449	0,939	0,601	-0,091
Табак	К-	-	A4	0,1864	0,191	0,068	0,405	0,153	-0,129
<b>Бегония</b>	<b>К+</b>	-	-	<b>0,2962</b>	<b>0,890</b>	<b>0,014</b>	<b>0,491</b>	<b>0,062</b>	<b>0,447</b>
Табак	1	1	15834	0,2410	0,164	0,044	0,283	0,093	-0,07
Томат	2	1	15834	0,2442	0,101	0,060	0,136	0,039	-0,056
Томат	3	2	15834	0,1545	0,151	0,065	0,252	0,130	-0,036
Томат	4	3	15834	0,1947	0,460	0,185	0,590	0,307	-0,008
Табак	6	2	15834	0,3663	0,270	0,158	0,478	0,219	-0,147
Табак	7	3	15834	0,3004	0,583	0,347	1,177	0,514	-0,427
Табак	8	4	A4	0,1666	0,136	0,073	0,264	0,064	-0,137
Табак	10	8	A4	0,1730	0,199	0,084	0,311	0,116	-0,08
Табак	11	5	A4	0,1690	0,141	0,088	0,252	0,119	-0,08
<b>Табак</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>A4</b>	<b>0,3176</b>	<b>0,505</b>	<b>0,246</b>	<b>0,564</b>	<b>0,415</b>	<b>0,11</b>
Табак	13	13	15834	0,2226	0,385	0,253	0,570	0,217	-0,221
Табак	14	7	A4	0,1502	0,158	0,053	0,501	0,187	-0,209
Томат	15	7	15834	0,1630	0,230	0,191	0,322	0,166	-0,117
Табак	17	10	15834	0,3488	0,180	0,075	0,305	0,139	-0,061
Табак	20	14	15834	0,2894	0,358	0,175	0,580	0,273	-0,124
<b>Табак</b>	<b>21</b>	<b>16</b>	<b>15834</b>	<b>0,2308</b>	<b>0,436</b>	<b>0,255</b>	<b>0,574</b>	<b>0,399</b>	<b>0,006</b>
Томат	22	6	15834	0,2317	0,089	0,027	0,119	0,044	-0,013
Томат	23	9	15834	0,1471	0,102	0,068	0,247	0,105	-0,108
Томат	24	10	15834	0,1813	0,091	0,025	0,212	0,110	0,036

<b>Табак</b>	<b>25</b>	<b>15</b>	<b>15834</b>	<b>0,2267</b>	<b>0,263</b>	<b>0,100</b>	<b>0,311</b>	<b>0,153</b>	<b>0,005</b>
Табак	26	12	15834	0,2527	0,199	0,063	0,223	0,083	-0,004

В пробах со значением  $\Delta D < 0$  не содержатся антоциановые пигменты. При подстановке  $\Delta D < 0$  в формулу 1.2. значение массовой концентрации (С) оказывается отрицательным.

Далее для образцов с  $\Delta D > 0$  была вычислена массовая концентрация антоцианов по формуле 1.2. Полученные значения представлены в табл. 18.

Таблица 18

**Массовая концентрация антоциановых пигментов в вытяжках**

Растение	ДНК	Линия	Сухая масса, г	Объём экстрагента ( $V_1$ ), мл	Разбавление (Р)	Массовая концентрация (С), г/100 г
Бегония	К+	-	0,2962	14,81	1:4	93,2798
Табак	12	6	0,3176	15,88	-	91,8443
Табак	21	16	0,2308	11,54	-	5,0097
Табак	25	15	0,2267	11,35	-	4,1803

\*\*\*

Таким образом, в культуре бородатых корней образцов табака с номером ДНК 12, 21 и 25 (линии 6, 16 и 15 соответственно) обнаружены антоцианы, причем их содержание в образце под номером 12 резко выше.

**3.8. Агробактериальная трансформация томата *in planta***

Для трансформации томата *in vivo* использовались цветы (преимущественно нераскрытые, до опыления) и плоды (на ранней степени зрелости, слегка красные). Инокулянт содержал *A.tumefaciens* AGL0 рТС223 и вводился сначала при помощи пипетки, но во избежание повреждения нежных тканей цветка и плода пипетка была заменена на инсулиновый шприц (Рис. 21).



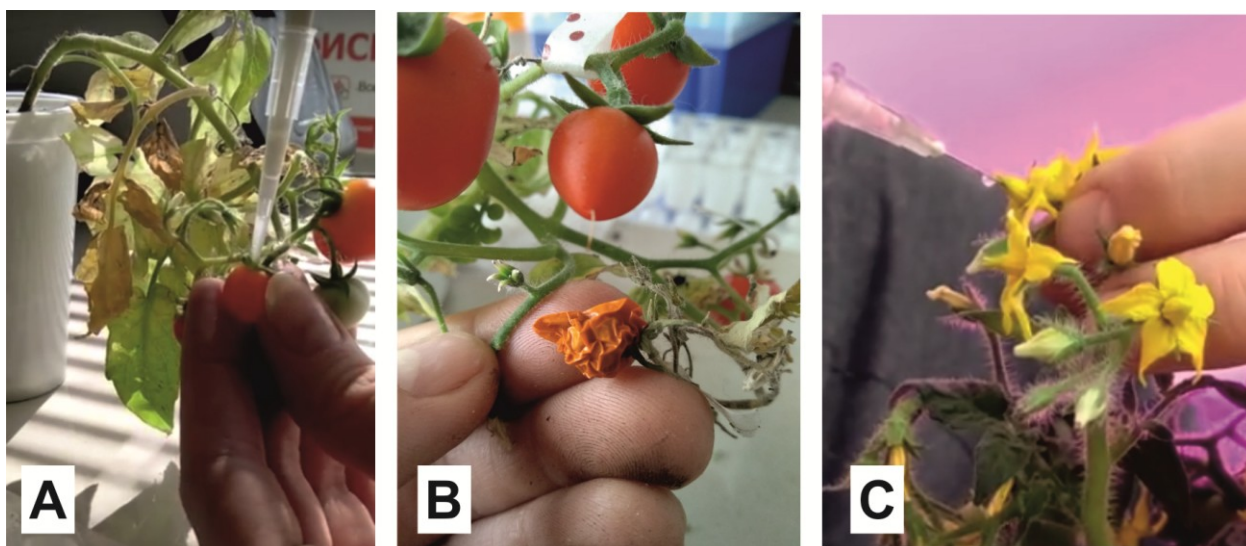


Рис. 21. (А) Инокуляция плодов томата пипеткой, (В) повреждения плода после инокуляции пипеткой, (С) инокуляция инсулиновым шприцом цветков томата.

\*\*\*

Данным методом было обработано 89 цветков и 20 плодов. Об эффективности трансформации можно будет судить после культивирования растений из семян, полученных из плодов и цветов, подвергшихся трансформации. На данном этапе станет возможен ПЦР-анализ, секвенирование и определение содержания антоцианов методами рН-дифференциальной спектрофотометрии (для определения массовой концентрации антоцианов) и метод высокоэффективной обращённо-фазовой жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (для качественного определения антоцианов).

### **3.9. Агробактериальная трансформация рапса (*Brassica napus*) с использованием рТС223**

С использованием суспензии *A. rhizogenes* А4, несущих конструкцию рТС223, нами было обработано 6 семядольных эксплантов и 4 гипокотеля рапса сорта Риф, и 4 семядольных эксплантов и 4 гипокотеля – сорта Ярило (рис. 22). Таким же образом с *A. tumefaciens* были обработаны семядольные экспланты рапсов (19 эксплантов сорта Ярило и 18 – сорта Риф). Через 22 дня наблюдался рост новых тканей сиреневого цвета (рис. 23А и В) в чашках с

семядольными эксплантами. При дальнейшей культивации ткани побледнели и погибли (рис. 23С).



Рис. 22. Семядоли и гипокотили рапсов, обработанные *A.rhizogenes* pTC223.

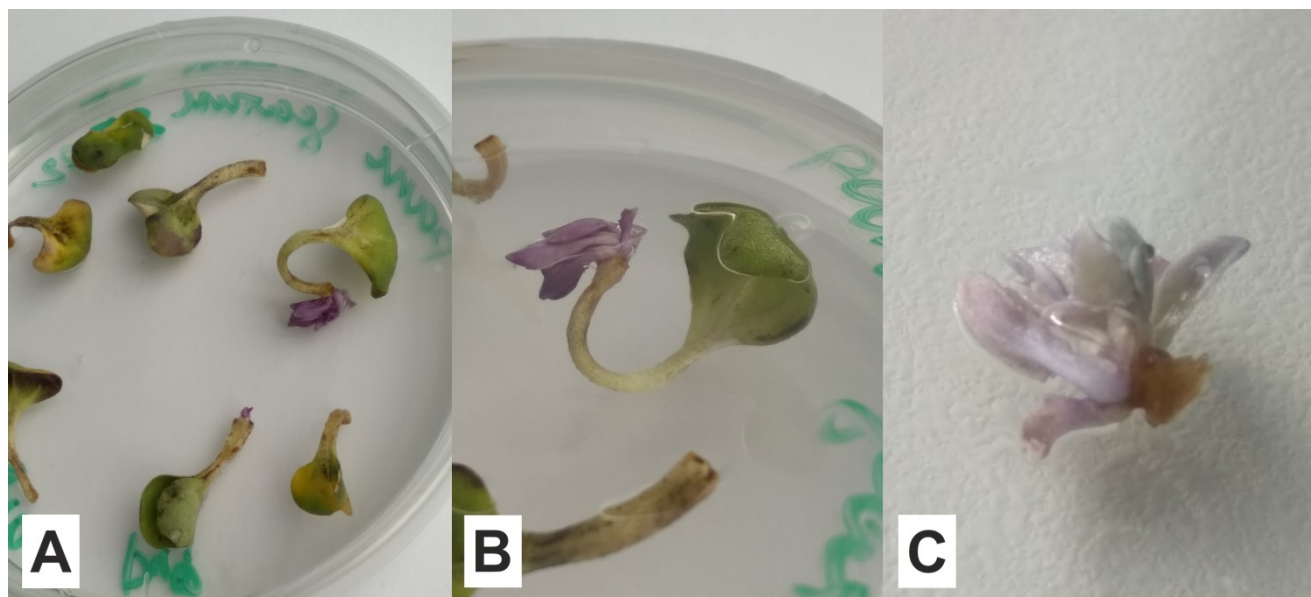


Рис. 23. Появление (А, В) и гибель (С) сиреневых тканей в культуре семядольных эксплантов рапса, обработанных *A.tumefaciens* pTC223.

В геноме *Brassica napus* при помощи программы BLASTn не было обнаружено последовательностей, гомологичных гидРНК из рТС223. Следовательно, появления окрашенных тканей результат выработки естественных антоцианов, в ответ на стрессовые факторы (обработка агробактериями, условия *in vitro*).

\*\*\*

Таким образом, установлено, что конструкция рТС223 не подходит для трансформации генома рапса и создания сортов рапса с повышенным содержанием антоцианов. Для трансформации рапса требуется дальнейшая модификация конструкции рТС223.

### **3.10. Планирование эксперимента по модификация рТС223 для трансформации растений из семейства *Brassicaceae***

По результатам поиска в BLASTn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) гомологов гидРНК (-TCGTTTATAATTTGTAGAG-) из рТС223 в геноме растений из семейства крестоцветных не обнаружено. Поэтому, для модификации плазмиды рТС223 требуется поиск генов-мишеней, предпочтительнее регуляторных областей и транскрипционных факторов, участвующих в биосинтезе антоциановых пигментов у капустных. Поиск таких генов можно проводить также в BLASTn и в научных статьях.

Группа ученых (Guo et al., 2014) провели сравнительный геномный анализ между *Arabidopsis thaliana* и *Brassica rapa* (репа) на уровне всего генома и обнаружили ортологичные гены путей биосинтеза антоцианов, в том числе регуляторные гены или транскрипционные факторы (табл. 19).

**Ортологичные регуляторные гены путей биосинтеза антоцианов у  
арабидопсиса и репы (Guo et al., 2014)**

<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Brassica rapa</i>
Положительные регуляторы	
С доменом <i>R2R3-MYB</i>	
<i>AtMYB11</i> (AT3G62610)	-
<i>AtMYB12</i> (AT2G47460)	<i>BrMYB12.1</i> (Bra004456) <i>BrMYB12.2</i> (Bra000453)
<i>AtMYB111</i> (AT5G49330)	<i>BrMYB111.1</i> (Bra037419) <i>BrMYB111.2</i> (Bra020647) <i>BrMYB111.3</i> (Bra036145)
С WD-повторами ( <i>MBW</i> -комплекс)	
<i>AtPAP1</i> (AT1G56650) <i>AtPAP2</i> (AT1G66390) <i>AtMYB113</i> (AT1G66370) <i>AtMYB114</i> (AT1G66380)	-
С доменом <i>helix-loop-helix</i> (bHLH)	
<i>AtTT8</i> (AT4G09820)	<i>BrTT8</i> (Bra037887)
<i>AtGL3</i> (AT5G41315)	<i>BrGL3</i> (Bra025508)
<i>AtEGL3</i> (AT1G63650)	<i>BrEGL3.1</i> (Bra027796) <i>BrEGL3.2</i> (Bra027653)
<i>WD40</i>	
<i>AtTTG1</i> (AT5G24520)	<i>BrTTG1.1</i> (Bra009770) <i>BrTTG1.2</i> (Bra029411)

Сверхэкспрессия гена *Arabidopsis PAP1* (*AtPAP1*), фактора транскрипции антоцианина MYB75, привела к накоплению антоцианов в листьях арабидопсиса (Gonzalez et al., 2008; Zhou et al., 2008; Xie et al., 2006).

*AtPAP1* конститутивно экспрессировался в *Brassica napus* с использованием 35S-промотора *CaMV* (Li et al., 2010). Было показано, что в фиолетовой капусте (*Brassica oleracea* var. *Acephala* f. *Tricolor*) сорта «Red Dove» под действием низких температур усиливается экспрессия гена *BoPAP1* (транскрипционный фактор MYB-R2R3). Дальнейший анализ последовательности показал, что *BoPAP1* имеет высокое сходство с *AtPAP1* и *BoMYB1* (Zhang et al., 2011).

\*\*\*

Таким образом, наиболее перспективным для использования в качестве гена-мишени для трансформации генома крестоцветных, является ген *PAP1*. Ортологи этого гена встречаются в геноме наиболее распространенных пищевых культур, таких как *Brassica oleracea* (капуста огородная), *B. napus* (рапс), и *B. rapa* (репа).

## **ГЛАВА 4. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ В ШКОЛЬНОМ КУРСЕ «БИОЛОГИЯ»**

### **4.1. Роль и значение биологии в системе школьного образования**

Биология – система наук о живой природе. Предмет биологии: строение и функции живых существ и их природных сообществ, распространение, происхождение и развитие, взаимодействие друг с другом и с неживой природой. Задачи биологии: изучение закономерностей и раскрытие сущности жизни, систематизация живых существ. Цели биологического образования в основной школе формируются на нескольких уровнях: глобальном, личностном, метапредметном и предметном.

Глобальные цели биологического образования являются общими для основной и старшей школы и определяются социальными требованиями, в том числе изменением социальной ситуации развития — ростом информационных перегрузок, изменением характера и способов общения и социальных взаимодействий (объемы и способы получения информации порождают ряд особенностей развития современных подростков). Наиболее продуктивными, с точки зрения решения задач развития подростка, являются социоморальная и интеллектуальная зрелость.

Деятельность образовательного учреждения в обучении биологии должна быть направлена на достижение обучающимися следующих результатов:

- Личностных (готовности и способности к самообразованию, формированию УУД (универсальных учебных действий), мотивации к обучению, формированию ценностно-смысловых установок и социальной компетенции);
- Метапредметных (формирование УУД, познавательных, регулятивных и коммуникативных навыков);

- Предметных (опыт деятельности специфичный для данной предметной области, формирование системы основополагающих элементов научного знания).

Универсальные учебные действия (УУД) – способность субъекта к саморазвитию и самосовершенствованию, путём сознательного и активного присвоения нового социального опыта; совокупность действий учащегося, обеспечивающих его культурную идентичность, социальную компетентность, толерантность, способность к самостоятельному усвоению новых знаний и умений, включая организацию этого процесса.

Согласно ФГОС ООО (Федеральный Государственный Образовательный Стандарт Основного Общего Образования, 2010) учебный предмет «Биология» способствует:

1. Формированию у учащихся системы научных знаний о живой природе, закономерностях её развития, об исторически быстром сокращении биологического разнообразия в биосфере в результате деятельности человека, для развития современных естественно-научных представлений о картине мира;

2. Формированию первоначальных систематизированных представлений о биологических объектах, процессах, явлениях, закономерностях, об основных биологических теориях, об экосистемной организации жизни, о взаимосвязи живого и неживого в биосфере, о наследственности и изменчивости; овладению понятийным аппаратом биологии;

3. Приобретению опыта использования методов биологической науки и проведению несложных биологических экспериментов для изучения живых организмов и человека, проведению экологического мониторинга в окружающей среде;

4. Формированию основ экологической грамотности: способности оценивать последствия деятельности человека в природе, влияние факторов риска на здоровье человека; выбирать целевые и смысловые установки в

своих действиях и поступках по отношению к живой природе, здоровью своему и окружающих, осознанию необходимости действий по сохранению биоразнообразия и природных местообитаний видов растений и животных;

5. Формированию представлений о значении биологических наук в решении проблем необходимости рационального природопользования и защиты здоровья людей в условиях быстрого изменения экологического качества окружающей среды;

6. Освоению приемов оказания первой помощи, рациональной организации труда и отдыха, выращивания и размножения культурных растений и домашних животных, ухода за ними.

Роль биологии в системе школьного образования обусловлена её значением в формировании общей культуры подрастающего поколения, воспитании творческой личности, осознании ответственности перед обществом за сохранение жизни на Земле. Поэтому изучение биологии в школе является важным этапом формирования мировоззрения и навыков, необходимых для дальнейшего получения образования и в повседневной жизни.

#### **4.2. Анализ программ и учебников по реализации материалов ВКР в школьном курсе «Биология» основного общего образования**

Анализ проведен на основе рабочей программы основного общего образования по биологии (Пальдяева, 2015) и в соответствии с Федеральным государственным образовательным стандартом (ФГОС ООО, 2010) и. Также были проанализированы учебники данной линии на наличие тем, сходных с темой данной ВКР.

1. Пасечник В. В. Биология. Бактерии, грибы, растения. 5 класс: учебник. - М.: Дрофа;

2. Пасечник В. В., Суматохин С. В., Калинова Г. С. Биология. Многообразие покрытосеменных растений. 6 класс: учебник. - М.: Дрофа;

3. Пасечник В. В. Биология. Человек. 8 класс: учебник. - М.: Дрофа;



4. Пасечник В. В. Биология. Введение в общую биологию и экологию. 9 класс: учебник. - М.: Дрофа.

Результаты анализа представлены в табл. 20, 21, 22 и 23.

## Анализ тематического планирования раздела «Бактерии, грибы, растения» для 5 классов

Темы	Содержание	Параграфы и страницы учебника
Введение		
<p>Биология — наука о живой природе. Методы исследования в биологии.</p>	<p>Биология — наука о живой природе. Методы исследования в биологии. Царства бактерий, грибов, растений и животных. Отличительные признаки живого и неживого. Связь организмов со средой обитания. Взаимосвязь организмов в природе. Экологические факторы и их влияние на живые организмы. Влияние деятельности человека на природу, ее охрана. Лабораторные и практические работы: Фенологические наблюдения за сезонными изменениями в природе. Ведение дневника наблюдений. Экскурсии.</p>	<p>§1, стр. 6. §2, стр. 10.</p>
Раздел 1. Клеточное строение организмов		
<p>Строение клетки. Химический состав клетки. Жизнедеятельность клетки, её деление и рост. Ткани.</p>	<p>Клетка и ее строение: оболочка, цитоплазма, ядро, вакуоли, пластиды. Жизнедеятельность клетки: поступление веществ в клетку (дыхание, питание), рост, развитие и деление клетки. Понятие «ткань». Демонстрации: Микропрепараты различных растительных тканей. Лабораторные и практические работы: Приготовление препарата кожицы чешуи лука, рассматривание его под микроскопом. Приготовление препаратов и рассматривание под микроскопом пластид в клетках листа элодеи, плодов томатов, рябины, шиповника. Приготовление препарата и рассматривание под микроскопом движения цитоплазмы в клетках листа элодеи. Рассматривание под микроскопом готовых микропрепаратов различных растительных тканей.</p>	<p>§7, стр. 34. §8, стр. 40. §9, стр. 42. §10, стр. 46.</p>
Раздел 2. Царство Бактерии. Царство Грибы		

Строение и жизнедеятельность бактерий. Роль бактерий в природе и жизни человека.	Строение и жизнедеятельность бактерий. Размножение бактерий. Бактерии, их роль в природе и жизни человека. Разнообразие бактерий, их распространение в природе. Демонстрация.	§11, стр. 52. §12, стр. 56.
<b>Раздел 3. Царство Растения</b>		
Разнообразие, распространение, значение растений. Покрытосеменные, или Цветковые.	Растения. Ботаника — наука о растениях. Методы изучения растений. Общая характеристика растительного царства. Многообразие растений, их связь со средой обитания. Роль в биосфере. Охрана растений. Основные группы растений (водоросли, мхи, хвощи, плауны, папоротники, голосеменные, цветковые). Цветковые растения, их строение и многообразие. Среда обитания. Значение цветковых в природе и жизни человека. Происхождение растений. Основные этапы развития растительного мира. Демонстрация: Гербарные экземпляры растений. Отпечатки ископаемых растений. Лабораторные и практические работы.	§17 стр. 88 §23 тр. 127

Таблица 21

**Анализ тематического планирования раздела «Многообразие покрытосеменных растений» для 6 классов**

Темы	Содержание	Параграфы и страницы учебника
<b>Раздел 1. Строение и многообразие покрытосеменных растений</b>		
Строение семян. Виды корней и типы корневых систем. Условия произрастания и видоизменения корней. Побег и почки. Внешнее строение листа.	Строение семян однодольных и двудольных растений. Виды корней и типы корневых систем. Зоны (участки) корня. Видоизменения корней. Побег. Почки и их строение. Рост и развитие побега. Внешнее строение листа. Клеточное строение листа. Видоизменения листьев. Цветок и его строение. Соцветия. Плоды и их классификация. Демонстрация: Внешнее и внутреннее строения корня. Строение почек (вегетативной и	§18, стр. 92. §19, стр. 95. §21, стр. 103. §22, стр. 107. §23, стр. 112. §24, стр. 116. §28, стр. 134.

<p>Клеточное строение листа. Цветок.</p>	<p>генеративной) и расположение их на стебле. Строение листа. Макро- и микростроение стебля. Различные виды соцветий. Сухие и сочные плоды. Лабораторные и практические работы: Строение семян двудольных и однодольных растений. Виды корней. Стержневая и мочковатая корневые системы. Корневой чехлик и корневые волоски. Строение почек. Расположение почек на стебле. Внутреннее строение ветки дерева. Видоизмененные побеги (корневище, клубень, луковица). Строение цветка. Различные виды соцветий. Многообразие сухих и сочных плодов.</p>	
<p>Раздел 2. Жизнь растений</p>		
<p>Химический состав растений. Минеральное питание растений. Фотосинтез. Передвижение воды и питательных веществ в растении. Прорастание семян. Растительный организм как единое целое. Вегетативное размножение покрытосеменных растений.</p>	<p>Основные процессы жизнедеятельности (питание, дыхание, обмен веществ, рост, развитие, размножение). Минеральное и воздушное питание растений. Фотосинтез. Передвижение воды и питательных веществ в растении. Прорастание семян. Половое и бесполое (вегетативное) размножение покрытосеменных растений. Демонстрация: Опыты, доказывающие значение воды, воздуха и тепла для прорастания семян; питание проростков запасными веществами семени; получение вытяжки хлорофилла; поглощение растениями углекислого газа и выделение кислорода на свету; образование крахмала; дыхание растений; испарение воды листьями; передвижение органических веществ по лубу. Лабораторные и практические работы: Передвижение воды и минеральных веществ по древесине. Вегетативное размножение комнатных растений. Определение всхожести семян растений и их посев. Экскурсии: Зимние явления в жизни растений.</p>	<p>§32, стр. 154. §33, стр. 157. §34, стр. 161. §37, стр. 176. §38, стр. 180. §39, стр. 187. §43, стр. 200.</p>
<p>Раздел 3. Классификация растений</p>		
<p>Основы систематики растений.</p>	<p>Основные систематические категории: вид, род, семейство, класс, отдел, царство. Знакомство с классификацией цветковых растений.</p>	<p>§45, стр. 218. §46, стр. 221.</p>

<p>Деление покрытосеменных растений на классы и семейства.  Класс Двудольные.  Семейство Крестоцветные (Капустные).  Класс Двудольные.  Семейство Пасленовые.</p>	<p>Класс Двудольные растения. Морфологическая характеристика 3—4 семейств (с учетом местных условий).  Важнейшие сельскохозяйственные растения, биологические основы их выращивания и народнохозяйственное значение.  Демонстрация:  Живые и гербарные растения, районированные сорта важнейших сельскохозяйственных растений.  Лабораторные и практические работы:  Выявление признаков семейства по внешнему строению растений.  Экскурсии:  Ознакомление с выращиванием растений в защищенном грунте.</p>	<p>§47, стр. 225.  §49, стр. 235.</p>
Раздел 4. Природные сообщества		
<p>Основные экологические факторы и их влияние на растения.</p>	<p>Влияние деятельности человека на растительные сообщества и влияние природной среды на человека.  Экскурсии:  Природное сообщество и человек. Фенологические наблюдения за весенними явлениями в природных сообществах.</p>	<p>§54 стр. 258.</p>

Таблица 22

**Анализ тематического планирования раздела «Человек» для 8 классов**

Темы	Содержание	Параграфы и страницы учебника
Раздел 1. Введение. Науки, изучающие организм человека		
<p>Науки о человеке и их методы.</p>	<p>Науки, изучающие организм человека: анатомия, физиология, психология и гигиена.  Их становление и методы исследования.</p>	<p>§1, стр. 6.</p>
Раздел 3. Строение организма		
<p>Строение организма человека (1-2).  Состав внутренней среды</p>	<p>Общий обзор организма Уровни организации.  Клеточное строение организма. Ткани.  Внешняя и внутренняя среда организма. Строение и функции клетки. Органоиды</p>	<p>§4, стр. 20.  §5, стр. 24.  §13, стр. 60.</p>

организма и её функции. Всасывание питательных веществ в кровь.	клетки. Жизненные процессы клетки: обмен веществ, биосинтез и биологическое окисление, их значение. Роль ферментов в обмене веществ. Состояния физиологического покоя и возбуждения. Демонстрация: Разложение пероксида водорода ферментом каталазой.	§27, стр. 122.
--	---	----------------

Таблица 23

**Анализ тематического планирования раздела «Введение в общую биологию и экологию» для 9 классов**

Темы	Содержание	Параграфы и страницы учебника
Раздел 1. Молекулярный уровень		
Молекулярный уровень: общая характеристика. Нуклеиновые кислоты.	Общая характеристика молекулярного уровня организации живого. Состав, строение и функции органических веществ, входящих в состав живого: углеводы, липиды, белки, нуклеиновые кислоты, АТФ и другие органические соединения. Биологические катализаторы. Демонстрация: Схемы строения молекул химических соединений, относящихся к основным группам органических веществ.	§1.1, стр. 16. §1.6, стр. 29.
Раздел 2. Клеточный уровень		
Основные положения клеточной теории. Общие сведения о клетках. Клеточная мембрана. Лизосомы. Митохондрии. Пластиды. Различие в строении клеток эукариот и прокариот. Синтез белков в клетке.	Общая характеристика клеточного уровня организации живого. Клетка — структурная и функциональная единица жизни. Методы изучения клетки. Основные положения клеточной теории. Химический состав клетки и его постоянство. Строение клетки. Функции органоидов клетки. Прокариоты, эукариоты. Хромосомный набор клетки. Обмен веществ и превращение энергии — основа жизнедеятельности клетки. Энергетический обмен в клетке клетки. Рост, развитие и жизненный цикл клеток. Демонстрация: Модель клетки. Микропрепараты митоза в клетках корешков лука; хромосом. Модели-аппликации, иллюстрирующие деление клеток.	§2.1, стр. 34. §2.2, стр. 40. §2.3, стр. 42. §2.5, стр. 46. §2.7, стр. 34. §2.13, стр. 40.

	Лабораторные и практические работы: Рассматривание клеток растений и животных под микроскопом.	
Раздел 3. Организменный уровень		
Закономерности наследования признаков, установленные Г. Менделем. Моногибридное скрещивание. Взаимодействие генов. Закономерности изменчивости: модификационная изменчивость. Норма реакции. Закономерности изменчивости: мутационная изменчивость. Основа селекции. Работы Н.И. Вавилова. Основные методы селекции растений, животных и микроорганизмов.	Индивидуальное развитие организмов. Биогенетический закон. Основные закономерности передачи наследственной информации. Генетическая непрерывность жизни. Закономерности изменчивости. Лабораторные и практические работы: Выявление изменчивости организмов.	§3.5, стр. 100. §3.11, стр. 117. §3.12, стр. 119. §3.13, стр. 122. §3.14, стр. 126.
Раздел 4. Основы экологии.		
Экологические факторы. Условия среды.	Взаимодействие организма и среды. Экологические условия и ресурсы. Приспособленность организмов к среде обитания. Биотические взаимоотношения и их роль в жизни видов. Демонстрация: Гербарии, коллекции, модели, муляжи растений и животных. Живые растения и животные. Гербарии и коллекции, иллюстрирующие изменчивость, наследственность, приспособленность, результаты	§9.1, стр. 264.

	искусственного отбора. Лабораторные и практические работы: Изучение морфологического критерия вида. Экскурсии: Причины многообразия видов в природе.	
--	--	--



### 4.3. Разработка урока по биологии в 5 классе на тему «Разнообразии, распространение, значение растений»

**Цель:** обобщить и закрепить знания, полученные в ходе изучения царства растений.

**Задачи:**

1. Образовательные:

- изучить разнообразие и распространение растительных организмов на Земле;
- раскрыть значение растений для человека и планеты в целом;
- сформировать общее представление о ботанике;
- выяснить отличия между низшими и высшими растениями.

2. Развивающие:

- развить понятие об основных гипотезах возникновения жизни на Земле;
- развить навыки исследовательской работы анализировать наглядные моменты из презентации;
- развить логическое мышление, внимание;
- развить у обучающихся навыков контроля и самооценки.

3. Воспитательные:

- воспитывать бережное отношение к природе;
- способствовать эстетическому воспитанию школьников;
- формировать научное мировоззрение.

**Тип урока:** урок систематизации и обобщения знаний.

**Вид урока:** комбинированный урок.

**Форма работы:** фронтальная, групповая, индивидуальная.

**Методы:**

1. Словесный – беседа на основе знаний учащихся;
2. Наглядный – демонстрация таблиц, наглядных пособий, презентаций;
3. Проблемный – работа с поставленной проблемой;

4. Частично-поисковый – поиск правильных ответов на поставленные вопросы;

5. Практический – самостоятельная работа.

**Учебно-методическое обеспечение:** Пасечник В. В. Биология. Бактерии, грибы, растения. 5 класс: учеб. для общеобразоват. учреждений - М.: Дрофа, 2012. – 141, [3] с., раздаточный материал (задания для команд и бланк для заполнения).

**Материально-техническое обеспечение:** мультимедийный проектор, презентация «Разнообразие и роль растений», школьная доска.

**Ход урока** представлен в табл. 24.

## Ход урока

Этапы урока	Деятельность учителя	Деятельность учащихся
1. Организационный этап – 1 мин.	Приветствие учащихся, положительная психологическая установка на урок	Приветствие учителя, проверка готовности рабочего места.
2. Постановка цели и задач урока. Мотивация учебной деятельности учащихся – 5 мин.	<p>1) Беседа с учащимися, подводящая к формулированию познавательной проблемы и постановка цели урока:</p> <p>Учитель: «Растения играют огромную роль в жизни планеты. Представителей растительного царства можно встретить по всему земному шару. Царство Растения объединяет более 350 тысяч видов живых организмов и представлено самыми разнообразными формами – от одноклеточных растений, которые можно рассмотреть только с помощью микроскопа, до огромных деревьев».</p> <p>Учитель задает вопросы:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) «Каких размеров бывают растения?» <b>Самые мелкие 4-200 микрометров (микроскопические водоросли), самое длинное 200-250 метров (каламус), самое высокое дерево около 116 метров (вечнозеленая секвойя).</b></li> <li>2) «Какова продолжительность жизни растений?» <b>Несколько дней, недель, месяцев (водоросли), однолетние (мокрица, однолетний мятлик, крестовник), многолетние (дицентра, подснежник), десятки лет (черемша) , сотни лет (лиственница), тысячи лет (дуб, грецкий орех, каштаны, секвойя).</b></li> <li>3) «Какое значение играют растения в природе?» <b>Обогащают воздух кислородом, пища для травоядных животных.</b></li> <li>4) «Какое значение играют растения в жизни человека?» <b>Употребление в пищу, сырье для промышленности,</b></li> </ol>	<p>Отвечают на вопросы учителя, озвучивают предложения по формулировке цели.</p> <p>Отвечают на вопросы, опираясь на пройденный материал и личный опыт.</p> <p>Отвечают на вопросы, опираясь на пройденный материал и личный опыт.</p>

	<p><b>приготовление лекарств, строительный материал, топливо, декоративная функция.</b></p> <p>Учитель констатирует проблему пробелов знаний учащихся по этим вопросам.</p> <p>Учитель: «Как мы сформулируем тему нашего урока?»</p>	Предлагают варианты формулировки темы урока.
<p>3. Изучение нового материала</p> <p>Самостоятельная практическая работа учащихся – 5 мин</p>	<p>Слайд 1.</p> <p>На слайде презентации тема урока: «Разнообразие, распространение, значение растений»</p> <p>Слайд 2. План урока. «Сегодня на уроке вы узнаете: о представителях различных отделов растительного царства и особенностях их строения, о распространении растительных организмов на Земле, о значении растений в природе и в жизни человека и о том, что изучает ботаника».</p> <p>Слайд 3. «Сравнение морфологии и размеров различных растений».</p> <p>Таблицы, схемы, рисунки.</p> <p>Слайд 4. «Сравнение продолжительности жизни различных растений».</p> <p>Таблицы, схемы, рисунки.</p> <p>Слайд 5. «Роль растений в природе и в жизни человека».</p> <p>Рисунки, фотографии.</p> <p>Учитель: «Какие вы знаете сферы деятельности человека, в которых используются растения или растительное сырье?».</p> <p><b>Употребление в пищу, сырье для промышленности, приготовление лекарств, строительный материал, топливо, декоративная функция.</b></p>	<p>Ученики изучают презентацию, самостоятельно работают с учебником, записывают основные моменты в тетрадь.</p> <p>Организация самостоятельной работы учащихся (составление таблицы размеров и примеры растений). Каждый ученик добавляет по одному примеру растений в каждый раздел исходя из жизненного опыта.</p> <p>Организация самостоятельной работы учащихся (составление таблицы продолжительности жизни и примеры растений). Каждый ученик добавляет по одному примеру растений в каждый раздел исходя из жизненного опыта.</p> <p>Поднимают руку, отвечают на вопрос. Записывают в тетрадь ответы.</p>
<p>4. Первичное закрепление (групповая игра) – 12</p>	<p>Учитель: «Сегодня у нас будет необычный урок! Давайте представим, что мы сейчас работаем не в кабинете биологии, а в редакции биологического журнала. Теперь вы не школьники, а</p>	

<p>мин.</p>	<p>журналисты, и вам предстоит собрать материал для выпуска новой стенгазеты, посвященной растениям».</p> <p>Всего 5 команд. Каждой группе раздаются карточки с заданиями и бланк для заполнения, чистая бумага и цветные карандаши.</p> <p><b>1 команда</b> – изучает водоросли:</p> <p>Задание 1. Найти в учебнике (Пасечник В.В., 5 класс) информацию в параграфе 18 стр. 93-101 для заполнения бланка ответов №1.</p> <p>Задание 2. Чем водоросли отличаются от остальных групп растений?</p> <p>Задание 3. Составьте схему «Разнообразие водорослей». Нарисуйте внешний вид водорослей в вашей схеме, опираясь на иллюстрации из учебника.</p> <p><b>2 команда</b> – изучает лишайники и мхи:</p> <p>Задание 1. Найти в учебнике (Пасечник В.В., 5 класс) информацию в параграфе 19 стр. 102-105 и в параграфе 20 стр. 106-111 для заполнения бланка ответов №2.</p> <p>Задание 2. В чем сходства и различия лишайников и мхов?</p> <p>Задание 3. Нарисуйте строение лишайника и мха, используя иллюстрации из параграфов.</p> <p><b>3 команда</b> – изучает плауны, хвощи и папоротники:</p> <p>Задание 1. Найти в учебнике (Пасечник В.В., 5 класс) информацию в параграфе 21 стр. 112-118 для заполнения бланка ответов №3.</p> <p>Задание 2. Почему эти виды растений объединены в одну группу?</p> <p>Задание 3. Подготовьте рассказ о значении этих растений для человека.</p> <p><b>4 команда</b> – изучает голосеменные:</p> <p>Задание 1. Найти в учебнике (Пасечник В.В., 5 класс) информацию в параграфе 22 стр. 119-126 для заполнения бланка ответов №4.</p> <p>Задание 2. Составьте таблицу «Строение хвойных растений», используя текст учебника.</p> <p>Задание 3. В чем преимущества голосеменных над высшими споровыми растениями?</p> <p><b>5 команда</b> – изучает покрытосеменные:</p> <p>Задание 1. Найти в учебнике (Пасечник В.В., 5 класс) информацию в</p>	<p>Делятся на 5 команд (по 4-6 человека). Каждый участник берет с собой ручку, тетрадь и учебник, и садится с товарищами по команде поближе.</p> <p>Выполняют задания в группах. Заполняют бланки ответов.</p>
-------------	---	--

	<p>параграфе 23 стр. 127-131 для заполнения бланка ответов №5.</p> <p>Задание 2. В чем преимущество покрытосеменных растений над голосеменными?</p> <p>Задание 3. Нарисуйте схему строения цветка, используя иллюстрации учебника.</p>	
<p>5. Закрепление материала с проговариванием во внешней речи – 15 мин.</p>	<p>Каждая команда представляет свою работу. Учитель задает участникам команды наводящие вопросы. Остальные ученики также задают вопросы.</p> <p>Учитель собирает бланки ответов и объединяет их на листе формата А1 в одну общую схему.</p>	<p>Учащиеся каждой группы после представления своей работы задают вопросы представителям других групп.</p>
<p>6. Рефлексия (подведение итогов занятия) – 5 мин.</p>	<p>Учитель подводит итоги урока, организует рефлексивные отзывы учащихся.</p> <p>1) Рефлексия оценочная.</p> <p>Учитель включает Слайд 6.</p> <p>На слайде представлена заполненная схема, наиболее полно отражающая основные моменты для закрепления. Учитель сравнивает работу учеников с эталоном и оценивает учеников.</p> <p>2) Рефлексия эмоциональная.</p> <p>Учитель предлагает начало предложения: «Сегодня я узнал...», «Я понял, что...», «Было интересно узнать, что...» и т.п.</p>	<p>Осуществляют проверку вместе с учителем.</p> <p>Учащиеся благодарят друг друга за работу в команде.</p> <p>Осуществляют рефлексию.</p>
<p>7. Домашнее задание, инструктаж – 2 мин.</p>	<p>Дома, по записям в своих тетрадях, составьте кроссворд из 10 слов.</p>	<p>Записывают домашнее задание. Задают вопросы.</p>

#### **4.4. Использование логико-смыслового моделирования в образовательном процессе**

Логико-смысловые модели (ЛСМ) – конкретная исходная форма реализации визуальных дидактических многомерных инструментов (ДМИ) в виде образно-понятийных моделей, содержащих смысловой и логический компоненты, причем последний выполнен в «солярной» – координатно-матричной форме для размещения понятий (или их мультикодовых эквивалентов) и смысловых связей между ними; ЛСМ применяются для отображения изучаемых или создаваемых объектов в дидактической многомерной и других технологиях, в профессиональной деятельности и дидактическом дизайне (Штейнберг, 2015).

Дидактические многомерные инструменты (ДМИ) – визуальные средства бинарного (двухкомпонентного) типа с иллюстративными и регулятивными свойствами; смысловой компонент ДМИ реализован на основе когнитивных принципов представления информации в семантически связной форме, а логический компонент образован координатными и матричными графическими элементами, размещенными на координатно-матричном каркасе в мультикодовой форме (понятийными, пиктограммическими, символными и другими элементами); конкретная форма реализации ДМИ – логико-смысловые модели, навигаторы, «семантические фракталы Штейнберга», когнитивные карты и т.п.; полифункциональные ДМИ как основные инструменты дидактической многомерной технологии применяются в традиционных и новых технологиях обучения на основе принципа дополнительности, в дидактическом дизайне (Штейнберг, 2015).

Проектирование ДМИ основано на концепции многомерных смысловых пространств и реализуется алгоритмоподобно: выбирается нужный опорно-узловой каркас; определяется круг вопросов по изучаемой теме и закрепляется за соответствующими координатами; в каждом вопросе

выделяются узловые элементы содержания и расставляются на координатах по выбранному основанию; выявляются и обозначаются наиболее важные смысловые связи между узлами; свертываются до ключевых слов обозначения координат, узлов и связей и проверяются на логическое и визуальное удобство пользования (Штейнберг, 2015).

С помощью технологической модели педагог может сформировать свой авторский многомерный взгляд на проектируемое занятие: на свою позицию в нем и авторский стиль, на место и роль темы в программе дисциплины, на комплексную оценку значимости темы, на инновационный уровень темы. Такие технологические модели расширяют профессиональный кругозор, вырабатывают продуктивный стереотип проектирования по мере накопления опыта проектирования, сближают технику обучения с современными методами обработки и представления технической или научной информации и позволяют сформировать авторский стиль, а также способствуют развитию у учащихся визуального компонента мышления, необходимого для подготовки выпускника школы к работе со схемами, формулами, алгоритмами и моделями, в случае получения им профессионального образования (Штейнберг, 2015).

Таким образом, профессионально-педагогическое сообщество пришло к осознанию необходимости создания визуально-инструментальной основы технологий обучения, предполагающей систему соответствующих средств и методов проектирования и моделирования, дидактического дизайна изучаемых объектов и обеспечивающих решение различных задач учебного процесса (Штейнберг, 2015).

В данной работе были использованы многомерные дидактические технологии, а именно – ЛСМ, для использования в школьном курсе «Биология» по теме «Разнообразие, распространение, значение растений» для 5 классов (рис. 24) и по результатам ВКР для обобщения всей исследовательской работы (рис.25).



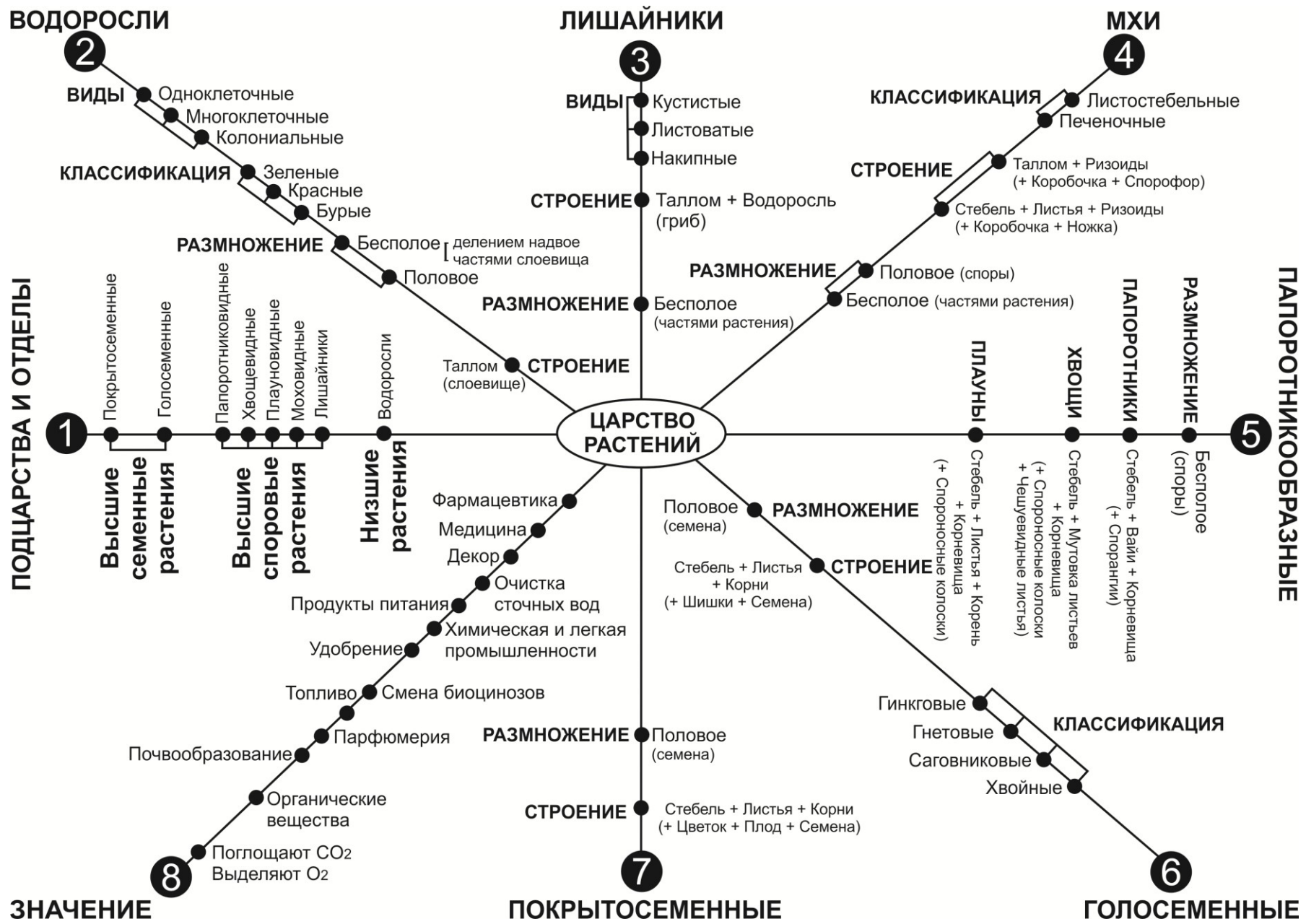


Рис. 24. ЛСМ по теме «Разнообразие, распространение, значение растений» для 5 классов.

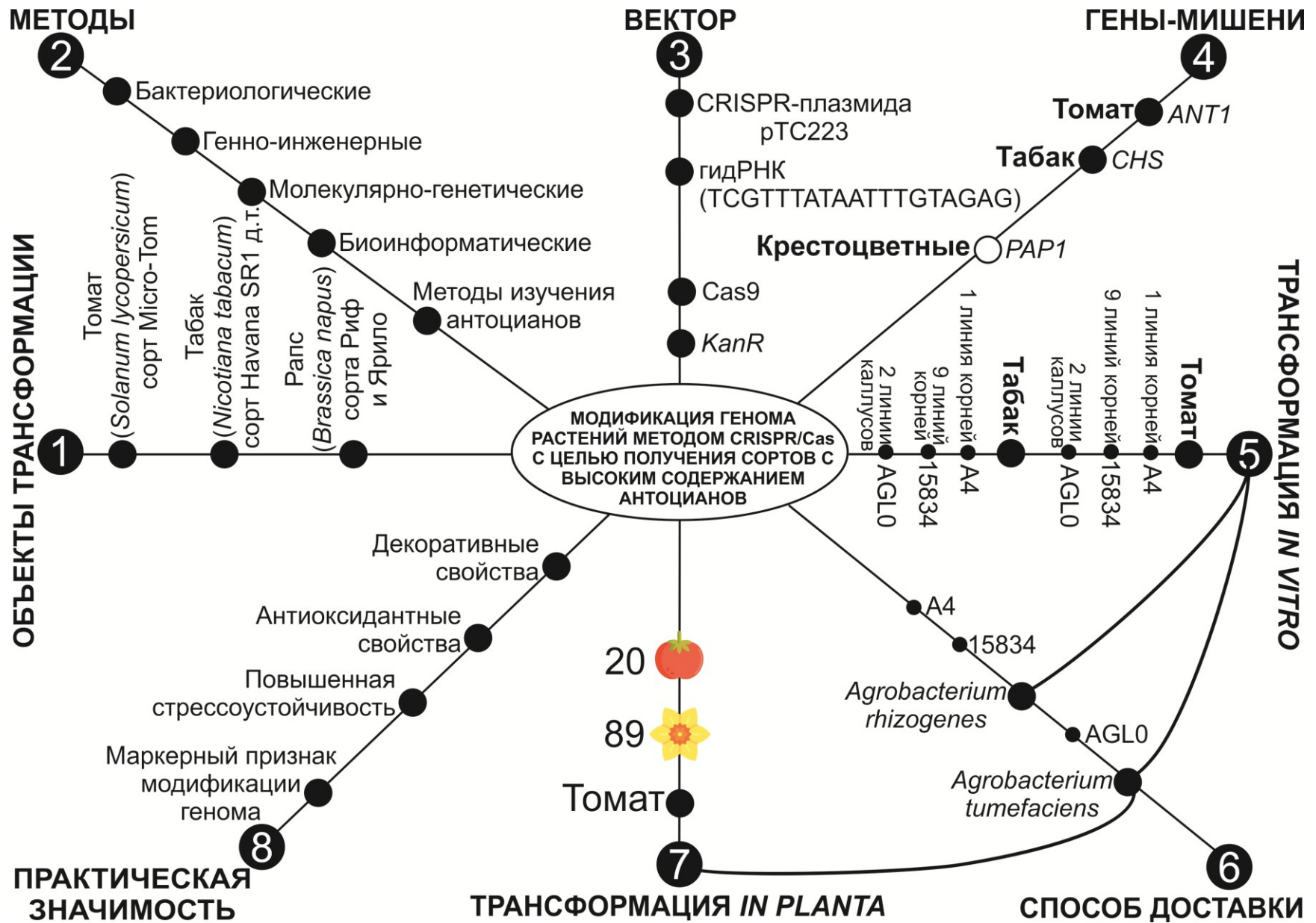


Рис. 25. ЛСМ по теме ВКР.

## ВЫВОДЫ

1. CRISPR-плазмида pTC223 была опробована для трансформации генома томата (сорта Micro-Tom), табака (сорта Navana линии SR1 дикого типа) и рапса (сортов Риф и Ярило).

2. При помощи *A.tumefaciens* штамма AGL0 было получено 2 каллусные линии томатов и 10 – табаков *in vitro*, а также инокулировано *in planta* 89 цветков и 20 плодов томата.

3. При помощи *A.rhizogenes* штамма A4 была получена 1 линия бородачатых корней томата и 9 линий табака. При помощи штамма 15834 получено 9 линий бородачатых корней томата и 19 линий табака.

4. ПЦР-анализ образцов ДНК из 10 линий бородачатых корней томатов подтвердил событие трансформации в 9 образцах, причем, ни в одном образце не обнаружена контаминация *A.rhizogenes*.

5. ПЦР-анализ образцов ДНК из 22 линий бородачатых корней табаков подтвердил событие трансформации в 21 образце. Из них, в 5 образцах обнаружена контаминация *A.rhizogenes*.

6. Методом рН-дифференциальной спектрофотометрии было выявлено наличие антоциановых пигментов в трех линиях бородачатых корней табака и определена их массовая концентрация: линия 6 - 91,8443 г/100г; линия 16 - 5,0097 г/100г; линия 15 - 4,1803 г/100г.

7. В геноме растений из семейства *Brassicaceae* не было обнаружено гомологичных гидРНК из pTC223 последовательностей, следовательно, требуется поиск генов-мишеней (предпочтительно регуляторных областей генома), участвующих в биосинтезе антоцианов для подбора гидРНК. Таковым может стать ген *PAP1*.

8. Разработан комплекс методических рекомендаций по применению материала данной выпускной квалификационной работы в

школьном курсе «Биология» и урок для 5 классов на тему «Разнообразие, распространение, значение растений».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарин К.В., Маркин Н.В., Лотник В.С. ДНК маркеры в селекции растений: учеб. пособие. Ростов-на-Дону: Издательство Южного федерального университета., 2012. 16 с.
2. Апарцин Е.К. К.Н.Ю. Методы доставки генетического материала в клетки и возможности их применения в генной терапии // Гены и клетки. 2016. Т. 11. № 2. С. 32–41.
3. Вершинина З.Р., Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Князев А.В., Чемерис Д.А, Гумерова Г.Р., Баймиев Ал.Х. Ч.А.В. Эволюция методов редактирования геномов // Биомика. 2017. Т. 9. № 3. С. 245–270.
4. ГОСТ 32709-2014. Продукция соковая. Методы определения антоцианинов. Введ. 2016-01-01. М.: Стандартинформ, 2014. 17 с.
5. Дрейпер Дж., Скотт Р. Х.Д. Трансформация клеток двудольных растений с помощью Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и Ri-плазмид *A.rhizogenes* // Генная инженерия растений / под ред. R.W. J.Draper, R.Scott, Ph. Armitage. Москва: Мир, 1991. С. 408.
6. Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений: учебное пособие: Высшая школа, 1974.
7. Запрометов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях.: Наука, 1993. 271 с.
8. Карабанов И.А. Флавоноиды в мире растений. Минск: Ураджай, 1981. 80 с.
9. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ал.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Гумерова Г.Р., Михайлова Е.В., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х. Ч.А.В. CRISPR / Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017. Т. 9. № 3. С. 155–182.
10. Курсанова Т.А. Развитие представлений о природе иммунитета растений. М.: Наука, 1988. 98 с.

11. Лапшова М. С., Дейнека В. И. Д.Л.А. Исследование комплексов включения некоторых антоцианов с гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрином // Химия растительного сырья. 2014. Т. 4. С. 139–146.
12. Макаревич А.М., Шутова А.Г., Спиридович Е.В. Р.В.Н. Функции и свойства антоцианов растительного сырья // Труды БГУ. 2010. Т. 4. № 2. С. 1–11.
13. Масленников П., Чупакина Г. С.Л. Природные антиоксиданты (экологический аспект). Калининград: БФУ им. И. Канта, 2011.
14. Михайлова В.Е., Кулуев Б.Р., Ясыбаева Г.Р., Ч.А.В. Создание культур бородачатых корней *Withania somnifera* и оценка параметров их роста при выращивании на твердых и жидких питательных средах // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова . 2017. Т. 13. № 2. С. 40–45.
15. Медведев С.С. Генетическая и эпигенетическая регуляция развития растительных организмов // Журнал Сибирского Федерального Университета. Биология. 2010. Т. 2. № 3. С. 109–129.
16. Пальдяева Г.М. Программа основного общего образования. Биология. 5-9 классы, к УМК В.В. Пасечника /сост. Г.М.Пальдяева. – М.: Дрофа, 2015. (Стандарты второго поколения).
17. Пасечник В. В. Биология. Бактерии, грибы, растения. 5 класс: учебник. - М.: Дрофа;
18. Пасечник В. В., Суматохин С. В., Калинова Г. С. Биология. Многообразие покрытосеменных растений. 6 класс: учебник. - М.: Дрофа;
19. Пасечник В. В. Биология. Человек. 8 класс: учебник. - М.: Дрофа;
20. Пасечник В. В. Биология. Введение в общую биологию и экологию. 9 класс: учебник. - М.: Дрофа.
21. Пат. 2228344 Российская Федерация. Способ получения антоцианового красителя из растительного сырья / Один А. П., Хайрутди-

нова А. Д., Болотов В. М.; заявитель и патентообладатель Воронеж. гос. технол. акад. - № 2002131129/13; заявл. 19.11.2003; опубл. 10.05.2004, Бюл. № 13.

22. Приказ Министерства образования и науки РФ от 17.12.2010г №1897 об утверждении Федерального Государственного Образовательного Стандарта Основного Общего Образования (ФГОС ООО).

23. Стрыгина К.В., Хлесткина Е.К. Синтез антоцианов у картофеля (*Solanum tuberosum* L.): генетические маркеры для направленного отбора (обзор) // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 1. С. 37–49.

24. Сухарева, А. С., Кулуев Б.Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. 2018. Т. 10. № 1. С. 69–84.

25. Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 4/2. С. 1044–1054.

26. Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 202–216.

27. Хлесткина Е.К., Шумный В.К. Перспективы использования прорывных технологий в селекции: система CRISPR/Cas9 для редактирования генома растений // Генетика. 2016. Т. 52. № 7. С. 774–787.

28. 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. Ч.А.В. Биоинформационные ресурсы для CRISPR/Cas редактирования геномов // Биомика. 2017. Т. 9. № 3. С. 203–228.

29. Чуб В. Для чего нужны антоцианы // Цветоводство. 2008. Т. 6. С. 22-25.

30. Штейнберг В.Э. Теория и практика дидактической многомерной технологии. М.: Народное образование, 2015. - 350 с. ISBN 978-5-87953-366-8.

31. Щербаков А. В., Чистякова М. В., Рахманкулова З. Ф. Физиологические аспекты регуляции пластичности накопления флавоноидов на Южном Урале // Вестник Башкирского университета. 2012. Т. 17. № 2. С. 931–942.
32. Andersen O.M., Markham K.R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Boca Raton: CRC Press, 2006. 1256 p.
33. Banta L.M. *Agrobacterium and plant biotechnology // Agrobacterium: From Biology to Biotechnology / под ред. С. V. Tzfira T.* New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008. P. 767.
34. Beetham P.R., Kipp P.B., Sawycky X.L., Arntzen C.J. A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. V. 96. P. 8774–8778.
35. Bibikova M., Beumer K., Trautman J.K. C.D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases // *Science*. 2003. V. 300. P. 764.
36. Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K. S.I. FokI dimerization is required for DNA cleavage // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 10570–10575.
37. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors // *Science*. 2009. V. 326. P. 1509–1512.
38. Bonas U., Stall R.E. S.B. Genetic and structural characterization of the avirulence gene *avrBs3* from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* // *Mol. Gen. Genet. MGG*. 1989. V. 218. P. 127–136.
39. Bonde M.T., Klausen M.S., Anderson M.V., Wallin A.I., Wang H.H. S.M.O. MODEST: a web-based design tool for oligonucleotide-mediated genome engineering and recombineering // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 1. P. 408–415.
40. Bovy A., De Vos R., Kemper M., Schijlen E., Almenar Pertejo M., Muir S., Collins G., Robinson S., Verhoeven M., Hughes S. et al. High-flavonol



tomatoes resulting from the heterologous expression of the maize transcription factor genes LC and C1 // *Plant Cell*. 2002. V. 14. № 10. P. 2509–2526.

41. Britton M.T., Escobar M.A., Dandekar A.M. The oncogenes of *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes* / под ред. Т. Tzvi, С. Vitaly. New York, NY: Springer New York, 2008. 523–563 P.

42. Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z. B. V.E.J. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system // *Plant Physiol*. 2014. V. 166. P. 1292–1297.

43. Burger J. E.G.E. Photosynthetic Efficiency, and Photodamage by UV and Visible Radiation, in Red versus Green Leaf Coleus Varieties // *Plant Cell Physiol*. 1996. V. 37. № 3. P. 395–399.

44. Cai C.Q., Doyon Y., Ainley W.M., Miller J.C., DeKolver R.C., Moehle E.A., Rock J.M., Lee Y.L., Garrison R., Schulenberg L., Blue R., Worden A., Baker L., Faraji F., Zhang L., Holmes M.C., Rebar E.J., Collingwood T.N., Rubin-Wilson B., Gregory P.D. U.F.D. Targeted transgene integration in plant cells using designed zinc finger nucleases // *Plant Mol. Biol*. 2009. V. 69. P. 699–709.

45. Cermak T. и др. High-frequency, precise modification of the tomato genome // *Genome Biol*. 2015. V. 16. № 1. P. 232.

46. Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J. V.D.F. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector- based constructs for DNA targeting // *Nucleic Acids Res*. 2011. V. 39. P. e82.

47. Char S.N., Unger-Wallace E., Frame B., Briggs S.A., Main M., Spalding M. H., Vollbrecht E., Wang K. Y.B. Heritable site-specific mutagenesis using TALENs in maize // *Plant Biotechnol. J*. 2015. V. 13. P. 1002–1010.

48. Chen F., Pruett-Miller S.M., Huang Y., Gjoka M., Duda K., Taunton J., Collingwood T.N., Frodin M. D.G.D. High-frequency genome editing using

ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. P. 753–755.

49. Christian M., Qi Y., Zhang Y. V.D.F. Targeted mutagenesis of *Arabidopsis thaliana* using engineered TAL effector nucleases // *G3 Genes, Genomes, Genet.* 2013. V. 3. P. 1697–1705.

50. Clasen B.M., Stoddard T.J., Luo S., Demorest Z.L., Li J., Cedrone F., Tibebe R., Davison S., Ray E.E., Daulhac A., Coffman A. Yabandith A., Retterath A., Haun W., Baltes N.J., Mathis L., Voytas D.F. Z.F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout // *Plant Biotechnol. J.* 2016. V. 14. P. 169–176.

51. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A. Z.F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. 2013. V. 339. P. 819–823.

52. Curtin S.J., Zhang F., Sander J.D., Haun W.J., Starker C., Baltes N.J., Reyon D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Coffman A.P., Dobbs D., Joung J.K., Voytas D.F. S.R.M. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases // *Plant Physiol.* 2011. V. 156. P. 466–473.

53. D'Halluin K., Vanderstraeten C., Hulle J., Rosolowska J., Den Brande I., Pennewaert A., D'Hont K., Bossut M., Jantz D., Ruiter R. B.J. Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction // *Plant Biotechnol. J.* 2013. V. 11. P. 933–941.

54. D'Halluin K., Vanderstraeten C., Stals E., Cornelissen M. R.R. Homologous recombination: a basis for targeted genome optimization in crop species such as maize // *Plant Biotechnol. J.* 2008. V. 6. P. 93–102.

55. Deng Shan-Shan, Wang Ying-Zhi, Ma Duan. Zinc finger nucleases and their application. // *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*. 2010. V. 27. № 2. P. 162–5.

56. Doebley J. Genetics, development and plant evolution // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1993. V. 3. P. 865–872.

57. Doebley J. L.L. Transcriptional regulators and the evolution of plant form // *Plant Cell*. 1998. V. 10. P. 1075–1082.
58. Dong C., Beetham P., Vincent K. S.P. Oligonucleotide-directed gene repair in wheat using a transient plasmid gene repair assay system // *Plant Cell Rep.* 2006. V. 25. P. 457–465.
59. Ehlenfeldt M.K. P.R.L. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Phenolic and Anthocyanin Concentrations in Fruit and Leaf Tissues of Highbush Blueberry // *J. Agric. Food Chem. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 49. № 5. P. 2222–2227.
60. Fauser F., Schiml S. P.H. Both CRISPR/Cas- based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* . 2014. V. 79. P. 348–359.
61. Feng Z. et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. // *Cell Res.* 2013. V. 23. № 10. P. 1229–32.
62. Feng Z., Mao Y. X.N. et al. Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 4632–4637.
63. Gao Y. Z.Y. Specific and heritable gene editing in *Arabidopsis* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. P. 4357–4358.
64. Gelvin S. The introduction and expression of transgenes in plants // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1998. V. 9. № 2. P. 227–32.
65. Gonzalez, A.; Zhao, M.; Leavitt, J. M.; Lloyd, A. M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.* 2008, 53, 814–827.
66. Guo N., Feng C., Jian W., Bo L., Shuning Z., Jianli L., Xiaowu W. Anthocyanin biosynthetic genes in *Brassica rapa*// *BMC Genomics*, 2014, V. 15(1): 426.
67. Haun W., Coffman A., Clasen B.M., Demorest Z.L., Lowy A., Ray E., Retteran A., Stoddard T., Juillerat A., Cedrone F., Mathis, L., Voytas D.F. Z.F.

Improved soybean oil quality by targeted mutagenesis of the fatty acid desaturase 2 gene family // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 934–940.

68. Hilioti Z., Ganopoulos I., Ajith S., Bossis I. T.A. A novel arrangement of zinc finger nuclease system for in vivo targeted genome engineering: the tomato LEC1-LIKE4 gene case // *Plant Cell Rep.* 2016. V. 35. P. 2241–2255.

69. Holton T.A., Cornish E.C. Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. // *Plant Cell.* 1995. V. 7. № 7. P. 1071–1083.

70. Houte S., Ekroth A.K., Broniewski J.M., Chabas H., Ashby B., Bondy-Denomy J., Gandon S., Boots M., Paterson S., Buckling A. W.E.R. van. The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system // *Nature.* 2016. V. 532. P. 385–388.

71. Hsu P.D., Scott D.A. W.J.A. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 827–832.

72. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M. N.A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product // *J. Bacteriol.* 1987. V. 169. P. 5429–5433.

73. Jia W., Yang B. W.D.P. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e99225.

74. Jin H., Martin C. Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. // *Plant Mol. Biol.* 1999. V. 41. № 5. P. 577–85.

75. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A. C.E. A programmable dual- RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science (80-. ).* 2012. V. 337. P. 816– 821.

76. Jones A.M.P., Saxena P.K. Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. e76802.

77. Jung J.H. A.F. TALEN mediated targeted mutagenesis of the caffeic acid O-methyltransferase in highly polyploid sugarcane improves cell wall

composition for production of bioethanol // *Plant Mol. Biol.* 2016. V. 92. P. 131–142.

78. Kiferle C. et al. Tomato R2R3-MYB Proteins SlANT1 and SlAN2: Same Protein Activity, Different Roles. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 8. P. e0136365.

79. Kim Y., Kweon J. K.J.S. TALENs and ZFNs are associated with different mutation signatures // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. P. 185–185.

80. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. V. 93. № 3. P. 1156–60.

81. Kmiec E.B., Cole A. H.W.K. The REC2 gene encodes the homologous pairing protein of *Ustilago maydis* // *Mol. Cell. Biol.* 1994. V. 14. P. 7163–7172.

82. Kochevenko A. W.L. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-based site-specific modification of the tobacco acetolactate synthase gene // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 174–184.

83. Kusano H., Onodera H., Kihira M., Aoki H., Matsuzaki H. S.H. A simple Gateway assisted construction system of TALEN genes for plant genome editing // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 30234.

84. Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P. Y.B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. № 5. P. 390–392.

85. Li X. et al. Purple Canola: *Arabidopsis* PAP1 Increases Antioxidants and Phenolics in *Brassica napus* Leaves // *J. Agric. Food Chem.* 2010. V. 58. № 3. P. 1639–1645.

86. Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D. D.G.N. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. V. 102. P. 2232–2237.

87. Lozano-Juste J. C.S.R. Plant genome engineering in full bloom // *Trends Plant Sci.* 2014. V. 19. P. 284–287.

88. Malzahn A., Lowder L. Q.Y. Plant genome editing with TALEN and CRISPR // *Cell Biosci.* 2017. V. 7. № 21.
89. Mani M., Smith J., Kandavelou K., Berg J.M. C.S. Binding of two zinc finger nuclease monomers to two specific sites is required for effective double-strand DNA cleavage // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 334. P. 1191–1197.
90. Masterson J. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms // *Science.* 1994. V. 264. P. 421–424.
91. Mathews H. et al. Activation Tagging in Tomato Identifies a Transcriptional Regulator of Anthocyanin Biosynthesis, Modification, and Transport // *Plant Cell.* 2003. V. 15. P. 1689–1703.
92. Meiers S. et al. The Anthocyanidins Cyanidin and Delphinidin Are Potent Inhibitors of the Epidermal Growth-Factor Receptor // *J. Agric. Food Chem. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 49. № 2. P. 958–962.
93. Meissner R, Chague V, Zhu Q, Emmanuel E, Elkind Y L.A. high throughput system for transposon tagging and promoter trapping in tomato // *A . Plant J.* 2000. V. 22. P. 265–74.
94. Meissner R, Jacobson Y, Melmed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y L.A. A new model system for tomato genetics // *Plant J.* 1997. V. 12. P. 1465–1472.
95. Nekrasov V. et al. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 8. P. 691–693.
96. Okuzaki A. T.K. Chimeric RNA/DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice // *Plant Cell Rep.* 2004. V. 22. P. 509–512.
97. Otten L., Burr T. S.E. *Agrobacterium: a disease-causing bacterium* // *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology* / под ред. C. V. Tzfira T. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008. P. 767.
98. Pandey K.B. R.S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2009. V. 2. № 5. P. 270–278.

99. Pater S., Neuteboom L.W., Pinas J.E., Hooykaas P.J. V.D.Z.B.J. De. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation // *Plant Biotechnol. J.* 2009. V. 7. P. 821–835.
100. Peer R., Rivlin G., Golobovitch S., Lapidot M., Gal-On A., Vainstein A., Tzfira T. F.M.A. Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in perennial fruit trees // *Planta.* 2015. V. 241. P. 941–951.
101. Podhajski A.J. S.W. Conversion of the FokI endonuclease to a universal restriction enzyme: cleavage of phage M13mp7 DNA at predetermined sites // *Gene.* 1985. V. 40. P. 175–182.
102. Puchta H., Dujon B. H.B. Homologous recombination in plant cells is enhanced by in vivo induction of double strand breaks into DNA by a site-specific endonuclease // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5034–5040.
103. Puchta H., Dujon B. H.B. Two different but related mechanisms are used in plants for the repair of genomic double-strand breaks by homologous recombination // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 5055–5060.
104. Purugganan M.D. The molecular evolution of development // *BioEssays.* 1998. V. 20. P. 700–711.
105. Ramirez C.L., Foley J.E., Wright D.A., Müller-Lerch F., Rahman S.H., Cornu T.I., Winfrey R.J., Sander J.D., Fu F., Townsend J.A., Cathomen T., Voytas D.F. J.J.K. Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. № 5. P. 374–375.
106. Ran Y., Liang Z. G.C. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing // *Sci. China Life Sci.* 2017. V. 60. P. 490–505.
107. Ream W. Production of a mobile T-DNA by *Agrobacterium tumefaciens* // *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology* / под ред. C. V. Tzfira T. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008. P. 767.
108. Ruitter R., Van Den Brande I., Stals E., Delaure S., Cornelissen M., D'halluin K. Spontaneous mutation frequency in plants obscures the effect of chimeraplasty // *Plant Mol. Biol.* 2003. V. 53. P. 715–729.

109. Salomon S. P.H. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells // *EMBO J.* 1998. V. 17. P. 6086–6095.
110. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
111. Schiml S., Fauser F. P.H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny // *Plant J.* 2014. V. 80. P. 1139–1150.
112. Scott, J. W. H.B.K. *Micro-Tom: A Miniature Dwarf Tomato*. Gainesville, FL: Agricultural Experiment Station, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, 1989. 370 p.
113. Shan Q., Wang Y. L.J. et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 686–688.
114. Shan Q., Zhang Y., Chen K., Zhang K. G.C. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology // *Plant Biotechnol. J.* 2015. V. 13. P. 791–800.
115. Shukla V.K., Doyon Y., Miller J.C., DeKolver R.C., Moehle E.A., Worden S.E., Mitchell J.C., Arnold N.L., Gopalan S., Meng X., Choi V.M., Rock J.M., Wu Y.Y., Katibah G.E., Zhifang G., McCaskill D., Simpson M.A., Blakeslee B., Greenwalt S.A., Butler H.J. H.S.J. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases // *Nature*. 2009. TV. 459. P. 437–441.
116. Smith J. et al. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences // *Nucleic Acids Res.* 2006. V. 34. № 22. P. e149–e149.
117. Smith J., Bibikova M., Whitby F.G., Reddy A.R., Chandrasegaran S. C.D. Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. 3361–3369.



118. Steinmetz K.A. P.J.D. Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention // *J. Am. Diet. Assoc.* 1996. V. 96. № 10. P. 1027–1039.
119. Svitashv S., Young J.K. S.C. et al. Targeted mutagenesis, precise gene editing, and site-specific gene insertion in maize using Cas9 and guide RNA // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. P. 931–945.
120. Takahashi A., Takeda K. O.T. Light-Induced Anthocyanin Reduces the Extent of Damage to DNA in UV-Irradiated *Centaurea cyanus* Cells in Culture // *Plant Cell Physiol.* 1991. V. 32. № 4. P. 541–547.
121. Tovkach A., Zeevi V. T.T. A toolbox and procedural notes for characterizing novel zinc finger nucleases for genome editing in plant cells // *Plant J.* 2009. V. 57. P. 747–757.
122. Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., Fu F., Maeder M.L., Joung J.K. V.D.F. High frequency modification of plant genes using engineered zinc finger nucleases // *Nature.* 2009. V. 459. P. 442–445.
123. Urnov F.D. et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases // *Nature.* 2005. V. 435. № 7042. P. 646–651.
124. Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C. Q.J.L. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. P. 947–951.
125. Watanabe K., Breier U., Hensel G., Kumlehn J., Schubert I. R.B. Stable gene replacement in barley by targeted double-strand break induction // *J. Exp. Bot.* 2015. V. 67. № 5. P. 1433–1445.
126. Westermeier R. *Electrophoresis in Practice. A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*: VCH Verlagsgesellschaft mbH., 1997. Second edition. 331 p.
127. White F. Xanthomonas and the TAL effectors: Nature's molecular biologist // *TALENs Methods Protoc.* 2016. V. 1338. P. 1–8.
128. Willits M.G., Kramer C.M., Prata R.T., De Luca V., Potter B.G., Steffens J.C. G.G. Utilization of the genetic resources of wild species to create a

nontransgenic high flavonoid tomato // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. P. 1231–1236.

129. Wolfe K.H. Yesterday's polyploidization and the mystery of diploidization // Nat. Rev. Genet. 2001. V. 2. P. 233–241.

130. Wright D.A., Townsend J.A., Winfrey R.J., Irwin P.A., Rajagopal J., Lonosky P.M., Hall B.D., Jondle M.D. V.D.F. High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases // Plant J. 2005. V. 44. P. 693–705.

131. Xie, D. Y.; Sharma, S. B.; Wright, E.; Wang, Z. Y.; Dixon, R. A. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductase and the PAP1/MYB transcription factor // Plant J., 2006, V. 45, P. 895–907.

132. Xie K. Y.Y. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system // Mol. Plant. 2013. V. 6. P. 1975–1983.

133. Xu R.F., Li H. Q.R.Y. et al. Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system // Sci. Reports. . 2015. V. 5. P. e11491.

134. Yasmeen A., Mirza B., Inayatullah S. S.N., Jamil M. A.S. In planta transformation of tomato // Plant Mol. Biol. Rep. 2009. V. 27. P. 20–28.

135. Zhou L. L., Zeng H. N., Shi M. Z., Xie D. Y. Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis // Planta, 2008, V. 229 (1), P. 37–51.

136. Zhou H., Liu B. W.D.P. et al. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. P. 10903–10914.

137. Zhou L.-L. и др. Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis // Planta. 2008. V. 229. № 1. P. 37–51.

138. Zhu T., Mettenburg K., Peterson D.J., Tagliani L. B.C.L. Engineering herbicide-resistant maize using chimeric RNA/DNA oligonucleotides // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. P. 555–558.

139. Zhu T., Peterson D.J., Tagliani L., Clair G.S., Baszczyński C.L. B.B. Targeted manipulation of maize genes in vivo using chimeric RNA/DNA oligonucleotides // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. V. 96. P. 8768–8773.

140. Ziemienowicz A., Tzfira T. H.B. Mechanisms of T-DNA integration // *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology* / под ред. С. V. Tzfira T. New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2008. P. 767.

141. Zuluaga D.L. et al. Arabidopsis thaliana MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants // *Funct. Plant Biol.* 2008. V. 35. № 7. P. 606.

142. Zverev Y.F. Flavonoids through the eyes of a pharmacologist. Features and problems of pharmacokinetics // *Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther.* 2017. V. 15. № 2. P. 4–11.

#### ЭЛЕКТРОННЫЕ РЕСУРСЫ

143. Биоинформатическая база данных The national Center for Biotechnology Information (NCBI)/ Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

144. Некоммерческий репозиторий плазмид Addgene/ Режим доступа: <https://www.addgene.org/>.

145. Программа поиска гомологов нуклеотидных последовательностей BLASTn/ Режим доступа: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK\\_LOC=blasthome&PAGE\\_TYPE=blastSearch&PROGRAM=blastn](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=blastSearch&PROGRAM=blastn).

