

УДК 577.29

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РОЛИ КОИЛИНА  
В УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ *Solanum tuberosum*  
К ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И АБИОТИЧЕСКИМ СТРЕССАМ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ CRISPR/Cas9**

**А. В. Махотенко<sup>1,2</sup>, А. В. Хромов<sup>1,2</sup>, Е. А. Снигирь<sup>1</sup>,  
С. С. Макарова<sup>1,2</sup>, В. В. Макаров<sup>1</sup>, Т. П. Супрунова<sup>1</sup>,  
Н. О. Калинина<sup>1,2,\*</sup>, М. Э. Тальянский<sup>1,3</sup>**

Представлено академиком РАН Л.П. Овчинниковым 21.08.2018 г.

Поступило 11.10.2018 г.

С использованием технологии CRISPR/Cas9 исследовали роль ядерного белка коилина в механизмах устойчивости растений картофеля *Solanum tuberosum* сорта Чикаго к биотическому и абиотическим стрессам. Для редактирования гена коилина комплекс эндонуклеаза Cas9—короткая гидовая РНК иммобилизовали на микрочастицах золота или хитозана и доставляли в клетки апикальной меристемы методами биобаллистики или вакуумной инфльтрации соответственно. Редактирование по крайней мере одного аллеля гена коилина привело к выраженному увеличению резистентности отредактированных линий к заражению вирусом картофеля Y и повышению устойчивости к солевому и осмотическому стрессам.

*Ключевые слова:* картофель, геномное редактирование, CRISPR/Cas9, ген коилина, вирусная инфекция, солевой стресс, устойчивость.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524846772-776>

Коилин — главный структурный белок, контролирующий формирование, состав и активность субъядерных телец Кахалья (ТК), физически и функционально ассоциированных с ядрышками. Тельца Кахалья участвуют в метаболизме РНК и сборке разнообразных рибонуклеопротеидных (РНП) комплексов, включая созревание некоторых ядерных РНК и сборку, модификацию и транспорт РНП-частиц разных классов. Растущее число данных свидетельствует о том, что ядрышки и ТК также принимают участие во многих других важных клеточных функциях, таких как клеточная пролиферация, метаболизм РНК, реакция на стрессовые воздействия и др. [1–3]. Ранее [4], используя модельную систему растений *Nicotiana*, мы показали, что коилин и ТК также влияют на взаимодействие между растениями-хозяевами и вирусами. Трансгенные растения, в которых экспрессия гена коилина была подавлена

с помощью механизма РНК-интерференции, отвечали по-разному на заражение вирусами, принадлежащими к разным таксономическим группам. Так, в отсутствие коилина мы наблюдали значительное угнетение процесса инфицирования растений картофеля РНК-содержащим потивирусом картофеля Y (YVK), одним из наиболее опасных, экономически важных патогенов картофеля [4]. Кроме того, в работе [3] было показано, что коилин участвует в реакции растения на абиотический солевой стресс. Механизмы участия коилина в защитной реакции на стресс разной природы остаются до конца невыясненными. Этот аспект функций коилина составил предмет настоящего исследования.

В нашей работе мы редактировали ген коилина в тетраплоидных растениях картофеля *Solanum tuberosum* сорта Чикаго, используя технологию CRISPR/Cas9, и оценили устойчивость полученных линий с модифицированным геном к заражению YVK и абиотическому стрессу.

Коилины и коилин-подобные белки растений не имеют строгой эволюционной консервативности в аминокислотной последовательности, однако структура их молекул, видимо, построена на основе общих принципов [5]. Молекула коилина у араби-

<sup>1</sup>ООО “Дока — Генные Технологии”,  
с. Рогачёво Московской обл.

<sup>2</sup>Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

<sup>3</sup>Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской Академии наук, Москва

\*E-mail: [kalinina@genebee.msu.ru](mailto:kalinina@genebee.msu.ru)

дописиса состоит из трёх основных доменов: N-концевого глобулярного домена; центрального, высоко неупорядоченного домена и C-концевого домена (СТД), включающего предполагаемую Тюдор-подобную структуру и неупорядоченный C-конец [5]. Для редактирования мы выбрали участок гена коилина картофеля, кодирующий СТД. Имеющиеся данные свидетельствуют о том, что этот домен вовлечён во взаимодействия с белками клетки, важными для функции ТК [6, 7]. В экспериментах использовали короткую гидовую РНК (кгРНК), комплементарную данной последовательности гена. Синтез *in vitro* и анализ активности кгРНК описаны нами ранее [8]. Рекомбинантную эндонуклеазу Cas9 и синтезированную *in vitro* кгРНК смешивали в реакционном буфере и инкубировали в течение 15 мин при 25 °С для формирования РНП-комплекса. Для геномного редактирования использовали апикальные зоны делящихся клеток, выделенные из верхушечных и боковых побегов картофеля сорта Чикаго, размером около 100–200 мкм. Меристемы переносили в чашки Петри на поверхность питательной среды Мурасиге—Скуга (МС) без добавления гормонов и подвергали или биобаллистике золотыми микрочастицами (0,6 мкм), или инфильтрации микрочастицами хитозана (0,6–0,8 мкм) с сорбированными на них РНП-комплексами Cas9/кгРНК. Затем меристемы переносили в чашки Петри с питательной средой МС уже с добавлением фитогормонов и инкубировали в световом модуле в контролируемых условиях в течение 4–5 нед. По окончании инкубации исследовали ДНК регенерированных растений методом фрагментного анализа. Клетки линий, идентифицированные как мутантные, далее генотипировали. Из растений отобранных линий выделяли суммарный препарат ДНК, затем фрагмент целевой последовательности гена коилина размером 150 нуклеотидов амплифицировали, клонировали в ТА-вектор и трансформировали в *E. coli*. Для контрольной и каждой из редактированных линий получали не менее 30 колоний, из них выделяли плазмидную ДНК, которую затем секвенировали.

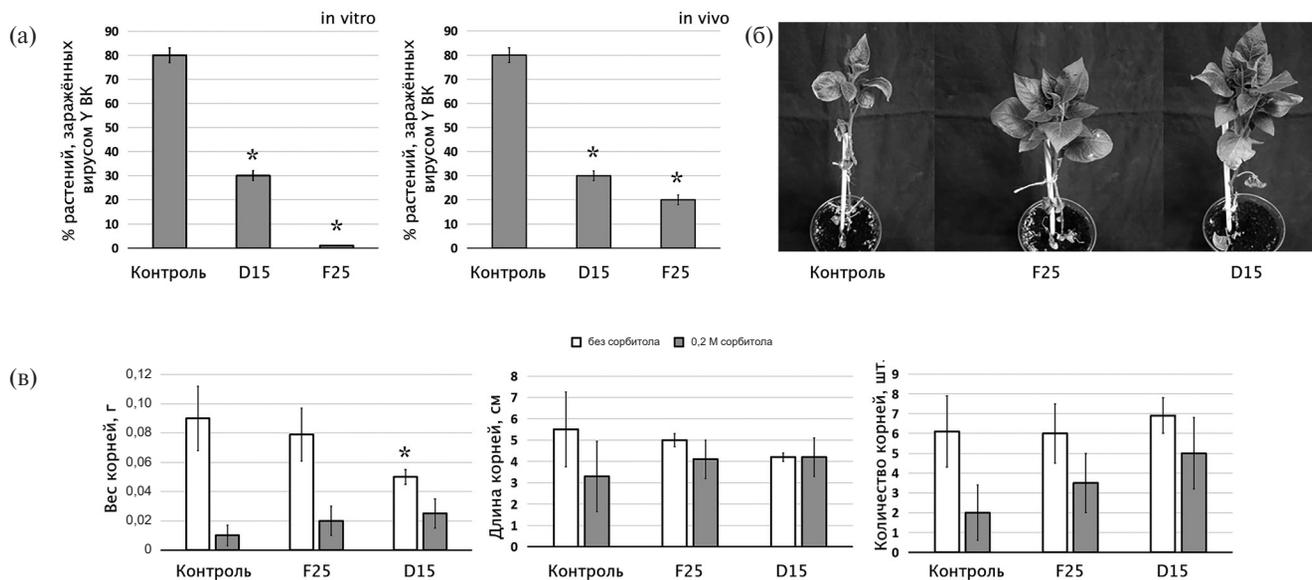
На рис. 1 представлены результаты анализа контрольных растений картофеля и растений двух редактированных линий, обозначенных как D15 и F25. В контрольных растениях мы обнаружили два аллеля (A1 и A2), отличающихся по своему нуклеотидному составу. Мы предполагаем, что вероятным объяснением этого результата является то, что два других аллеля идентичны по данному участку выявленным. Редактированные линии содержали делеции длиной

Контроль		
5'...	GCTCTATTTATAATGAAGACGGGAATCTCTGGAGGTACCTTC ... 3'	A1
5'...	GCTCTATTTATAATGACGATGGAATCTCCGGAGGTACCTTC ... 3'	A2
D15		
5'...	-----CTCTGGAGGTACCTTC ... 3'	A1
5'...	GCTCTATTTATAATGACGATGGAATCTCCGGAGGTACCTTC ... 3'	A2
F25		
5'...	GCTCTATTTATAATGAAGACGGGAATCTCTGGAGGTACCTTC ... 3'	A1
5'...	-----CTCCGGAGGTACCTTC ... 3'	A2

**Рис. 1.** Генотипирование целевого фрагмента гена коилина контрольного растения *Solanum tuberosum* сорта Чикаго и редактированных линий. Представлены последовательности аллелей в целевом фрагменте гена коилина контрольного растения (выявленные аллели отмечены как A1 и A2, полужирным шрифтом выделены нуклеотидные замены, характерные для этих аллелей) и редактированных линий D15 и F25. Последовательность целевого сайта, которой комплементарна кгРНК, выделена подчёркиванием. Сайт PAM (protospacer associated motif) обозначен курсивом. Отсутствующие в редактированных линиях последовательности аллелей (делетированные нуклеотиды) изображены пунктирной линией.

более 60 нуклеотидов, но в разных аллелях (в аллеле A1 — для линии D15, полученной с использованием метода бомбардировки золотыми микрочастицами (БЗМ), и в аллеле A2 — для линии F25, полученной инфильтрацией комплекса Cas9/кгРНК). Вероятно, что протяжённые нуклеотидные последовательности в аллеле A1 линии D15 и в аллеле A2 линии F25 делетированы в составе фрагмента, связывающего кгРНК, вследствие чего они не амплифицируются при проведении ПЦР. Протяжённые делеции (до 600 п.н.) описаны ранее при редактировании системой CRISPR/Cas9 генома мыши [9].

Устойчивость редактированных линий картофеля к заражению YVK-O (штамм обыкновенный) изучали в двух сериях экспериментов. В первой серии пробирочные растения-регенеранты контрольной и редактированных линий F25 и D15 (по 10–20 растений в каждой группе) заражали YVK-O и через 28 дней после инокуляции из растений выделяли суммарный препарат РНК для дальнейшего анализа. Во второй серии опытов взрослые растения картофеля (контрольные линии и линии F25 и D15) на стадии 5–6 листьев (10 растений в каждой группе) заражали YVK-O и через 28 дней после инокуляции из системных симптоматических листьев каждого растения выделяли суммарный препарат РНК. Вирусную РНК определяли полуколичественным методом ПЦР с обратной транскрипцией. В качестве гена сравнения использовали ген рибосомного белка L23. Мы выявили (рис. 2а) значительное уменьшение доли заражённых вирусом растений в редактированных



**Рис. 2.** Характеристика устойчивости линий, редактированных по гену коилина, к биотическому стрессу (вирусной инфекции) и абиотическим (солевому и осмотическому) стрессам: а — доля (в процентах от общего числа заражённых YVK-O растений) контрольных растений и растений редактированных линий, в которых была выявлена вирусная инфекция; б — влияние солевого стресса на фенотип контрольных растений и редактированных линий через 18 дней после обработки растений раствором 300 мМ NaCl; в — влияние осмотического стресса на рост и развитие корневой системы пробирочных растений контрольной и редактированных линий через 14 дней роста на среде, содержащей 0,2 М сорбитола. На графиках (а) и (в) — итоговые результаты трёх независимых экспериментов,  $M \pm SD$ ,  $n = 10$  для каждой группы,  $*p < 0,05$  по критерию  $t$  Стьюдента по сравнению с контролем.

линиях по сравнению с контрольными растениями в обеих сериях экспериментов. Так, по сравнению с контрольными растениями резистентность линии D15 была выше в 2,7 и 2 раза, а линии F25 — в 10 и 4 раза в опытах *in vitro* и *in vivo* соответственно.

Далее мы исследовали устойчивость редактированных линий к двум типам абиотического стресса — солевому и осмотическому. Для изучения фенотипического проявления эффекта солевого стресса взрослые растения картофеля контрольной и редактированных линий F25 и D15, выращенные до стадии 5–6 листьев в горшках с объёмом почвы около 0,4 л, поливали ежедневно 50 мл раствора 300 мМ NaCl в течение 18 дней. Ответ на солевой стресс оценивали визуально по числу листьев с хлорозами и пониженным тургором, а также по размеру листовой пластинки. Видимые различия между группами контрольных растений и редактированных линий проявились на 11-й день опыта: в условиях солевого стресса у контрольных растений наблюдали ускоренное пожелтение и опадание листьев по сравнению с редактированными линиями. Дополнительно обнаружили заметное ингибирование развития и деформацию листовой пластинки (данные не представлены). Через 18 дней симптомы развития стресса усилились. Однако различия в устойчивости к стрессу между контрольными рас-

тениями и редактированными линиями сохранились (рис. 2б).

Влияние гиперосмотического стресса изучали у пробирочных растений контрольной линии и редактированных линий F25 и D15. С этой целью растения каждой группы выращивали на среде МС, не содержащей сорбитола или содержащей 0,2 М сорбитола, в течение 14 дней в одинаковых условиях температуры и освещённости. Оценивали следующие параметры: сырой вес целого растения, надземного побега и корня, а также длину и общее число корней. Между контрольными растениями и редактированными линиями мы не зафиксировали заметного различия по весу надземного побега, однако суммарный вес корней отличался у контрольных и редактированных растений (рис. 2в). Присутствие в среде сорбитола угнетало развитие корневой системы приблизительно в 9 раз в контроле и соответственно в 4 и 2 раза у редактированных линий F25 и D15. Сорбитол практически не влиял на длину корней у редактированных линий, тогда как у контрольных растений этот показатель уменьшился почти в 2 раза. Число корней в присутствии сорбитола уменьшилось у контрольных растений в 3 раза, у растений линии F25 — в 2 раза, а у линии D15 — в 1,4 раза (рис. 2в). В целом большая устойчивость к осмотическому стрессу у ре-

дактированных по гену коилина линий, видимо, обусловлена более эффективным развитием корневой системы.

Итак, в настоящей работе для редактирования генома картофеля мы использовали клетки апикальной меристемы, преимущество которых является простота их регенерации в целые растения, занимающей около двух месяцев, что широко используется в производстве безвирусного картофеля. Для доставки РНП-комплекса CRISPR/Cas9 (бесплазмидный способ доставки) в клетки применили достаточно широко используемый метод БЗМ клеток РНП-комплексами [10, 11] и новый метод инфильтрации РНП-комплексов, иммобилизованных на микрочастицах хитозана. Генетический анализ показал, что нам удалось отредактировать по крайней мере один аллель гена коилина. Мы не обнаружили одиночных инделей (инсерции/делеции), которые ранее были описаны при бесплазмидной доставке РНП-комплекса CRISPR/Cas9 в протопласты картофеля [12, 13]. В нашем случае отсутствовала последовательность по крайней мере одного аллеля при секвенировании фрагмента целевого гена в области, фланкирующей место связывания кГРНК. Протяжённые делеции (до 600 п.н.) были описаны ранее при редактировании системой CRISPR/Cas9 зигот мыши [9]. Наши данные согласуются с этим наблюдением, поскольку клетки апикальной меристемы являются низкодифференцированными, быстро делящимися клетками.

Несмотря на то что нам не удалось полностью выключить экспрессию гена коилина, редактирование последовательности по крайней мере одного из аллелей, кодирующих домен СТД коилина, сопровождалось заметным увеличением резистентности растений картофеля к заражению УВК и появлением устойчивости к солевому и осмотическому стрессам.

Таким образом, используя технологию CRISPR/Cas9 и бесплазмидный способ доставки редактирующего РНП-комплекса в клетки растения, мы показали, что коилин картофеля вовлечён в защитный ответ растения на биотический и абиотический

стрессы. Эти результаты позволяют предполагать, что ген коилина является перспективной мишенью для практического использования в картофелеводстве.

А.В. Махотенко и А.В. Хромов внесли равный вклад в настоящую работу.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 16–16–04019.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bassett C.L. // Crit. Rev. Plant Sci. 2012. V. 31. P. 258–270.
2. Boulon S., Westman B.J., Hutten S., Boisvert F.M., Lamond A.I. // Mol. Cell. 2010. V. 40. № 2. P. 216–227.
3. Love A., Yu Ch., Petuchova N., Kalinina N.O., Chen J., Taliansky M.E. // RNA Biol. 2017. V. 14. № 6. P. 779–790.
4. Shaw J., Love A., Makarova S., Kalinina N.O., Harrison B.D., Taliansky M.E. // Nucleus. 2014. V. 5. P. 85–94.
5. Makarov V., Rakitina D., Protopopova A., Yaminsky I., Arutiunian A., Love A.J., Taliansky M., Kalinina N. // PLoS One. 2013. V. 8. № 1. e53571.
6. Xu H., Pillai R.S., Azzouz T.N., Shpargel K.B., Kambach C., Hebert M.D., Schümperli D., Matera A.G. // Chromosoma. 2005. V. 114. P. 155–166.
7. Toyota C.G., Davis M.D., Cosman A.M., Hebert M.D. // Chromosoma. 2010. V. 119. P. 205–215.
8. Хромов А.В., Гущин В.А., Тимербаев В.И., Калинин Н.О., Тальянский М.Э., Макаров В.В. // ДАН. 2018. Т. 479. № 3. С. 343–347.
9. Shin H.Y., Wang C., Lee H.K., Yoo K.H., Zeng X., Kuhns T., Yang C.M., Mohr T., Liu C., Hennighausen L. // Nat. Commun. 2016. V. 8. 15464.
10. Martin-Ortigosa S., Wang K. // Transgenic Res. 2014. V. 23. P. 743–756.
11. Kanchiswamy C.N. // Plant Cell Rept. 2016. V. 35. P. 1469–1474.
12. Andersson M., Turesson H., Olsson N., Fält A.S., Ohlsson P., Gonzalez M.N., Samuelsson M., Hofvander P. // Physiol. Plantarum. 2018. V. 164. P. 378–384.
13. Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P. // Plant Cell Repts. 2016. V. 36. P. 117–128.

**FUNCTIONAL ANALYSIS OF COILIN IN VIRUS RESISTANCE  
AND STRESS TOLERANCE OF POTATO *Solanum tuberosum*  
USING CRISPR/Cas9 EDITING**

**A. V. Makhotenko, A. V. Khromov, E. A. Snigir, S. S. Makarova,  
V. V. Makarov, T. P. Suprunova, N. O. Kalinina, M. E. Taliansky**

Presented by Academician of the RAS L.P. Ovchinnikov August 21, 2018

Received October 11, 2018

The role of the nuclear protein coilin in the mechanisms of resistance of potato *Solanum tuberosum* cultivar Chicago to biotic and abiotic stresses was studied using the CRISPR/Cas9 technology. For the coilin gene editing, a complex consisting of the Cas9 endonuclease and a short guide RNA was immobilized on gold or chitosan microparticles and delivered into apical meristem cells by bioballistics or vacuum infiltration methods, respectively. Editing at least one allele of the coilin gene considerably increased the resistance of the edited lines to infection with the potato virus Y and their tolerance to salt and osmotic stress.

*Keywords:* potato, genome editing, CRISPR/Cas9, coilin gene, virus infection, salt stress, resistance.