

FTAMP 34.15.25; 34.15.27; 34.15.31

<https://doi.org/10.26577/bb202510326>

З.Б. Сапахова^{1,2*}, З.Б. Стамгалиева³, Р. Канат¹,
Д. Дауров¹, А. Даурова^{1,4}, К. Жамбакин¹, М. Шамекова^{1,2}

¹Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы, Қазақстан

²Tanir Research Laboratory, Алматы, Қазақстан

³Биорталық I – Йоханнес Гутенберг Университеті, Майнц, Германия

⁴Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті, Алматы, Қазақстан

*e-mail: z.sapakhova@ipbb.kz

ӨСІМДІК ГЕНОМЫН ӨНДЕУГЕ АРНАЛҒАН ВИРУСТЫҚ ВЕКТОРҒА НЕГІЗДЕЛГЕН CRISPR/CAS

CRISPR-Cas9 көмегімен геномдық редакциялау қазіргі биотехнологияда әртүрлі организмдердің геномдық тізбегін дәл өзгертуге мүмкіндік беретін қуатты құралға айналды. CRISPR-Cas9 өсімдік биологиясында технология ерекше маңызға ие, өйткені ол дақылдарды жақсарту және қажетті қасиеттері бар жаңа сорттарды дамыту мақсатында өсімдік геномдарын тиімді өзгертуге мүмкіндік береді. Зерттеудің мақсаты – өсімдік геномын өңдеу үшін вирустық векторға негізделген CRISPR/CAS генетикалық жүйесін әзірлеу. Вирустық векторларға негізделген өсімдіктерде CRISPR-Cas9 геномдық өңдеуді енгізу дақылдарды жақсарту және ауруларға төзімділік, климаттық өзгерістер және өсімдіктердің тағамдық қасиеттері мәселелерін шешу үшін айтарлықтай мүмкіндіктерін ұсынады. Өсімдіктерде Cas9 өтпелі экспрессиясын алу үшін өсімдік ұлпасында экспрессиясы үшін 35s промоторы бар оңтайландырылған жүгері кодоны бар spCas9 бар нуклеазасы бар pKSE401 плазмидасы қолданылады. PDS геніне арналған бағыттаушы РНҚ дизайны CRISPR-P-2.0 және CRISPOR бағдарламаларында жасалды. Анықтамалық гендерді алу үшін Sol Genomics Network (SGN) базасы пайдаланылды және Blast-Nucleotide көмегімен туралау арқылы реттілік валидациясы жүргізілді. РНҚ бағыттаушылары GoldenGate клондау әдісімен плазмидаға «тігілген». *Nicotiana benthamiana* L. өсімдіктеріндегі вирустық вектордағы Cas9 экспрессиясына талдау жасалды. Өсімдіктер геномын редакциялау үшін CRISPR-Cas9 жүйесін және вирустық векторларды пайдалануға негізделген жұмыстың нәтижелері Қазақстан мен әлемдегі белгілі аналогтармен салыстырғанда жоғары бәсекеге қабілеттілікке ие. Жасалған тәсіл дәстүрлі өсіру әдістері мен басқа геномды өңдеу технологияларынан асып түсетін өсімдік геномдарына өзгерістер енгізудің дәлдігін, тиімділігін және икемділігін қамтамасыз етеді.

Түйін сөздер: CRISPR/Cas, қызанақ ергежейлі вирусы, вирус векторы, бағытталған РНҚ, *Nicotiana benthamiana* L.

Z. Sapakhova^{1,2*}, Z. Stamgaliyeva³, R. Kanat¹,
D. Daurov¹, A. Daurova^{1,4}, K. Zhambakin¹, M. Shamekova^{1,2}

¹Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan

²Tanir Research Laboratory, Almaty, Kazakhstan

³Biocenter I – Johannes-Gutenberg-University, Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 15, Mainz, Germany

⁴Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: z.sapakhova@ipbb.kz

CRISPR/Cas virus-based system for plant genome editing

Genome editing using CRISPR-Cas9 has become a powerful tool in modern biotechnology to precisely modify the genomic sequences of various organisms. In plant biology, CRISPR-Cas9 technology is of particular importance because it allows efficient modification of plant genomes to improve crops and develop new varieties with desirable traits. This study aims to develop a CRISPR/Cas genetic system based on a viral vector for plant genome editing. The introduction of CRISPR-Cas9 genomic editing in plants based on viral vectors offers significant potential for crop improvement and addressing disease resistance, climate change, and nutritional traits. To obtain transient expression of Cas9 in plants, we used plasmids pKSE401 that contain nuclease containing spCas9 with an optimized maize codon under the control of the 35S promoter for expression in plant tissue. The design of guide RNAs for the PDS gene was carried out in CRISPR-P-2.0 and CRISPOR programs. Sol Genomics Network (SGN) database was used to obtain reference genes and sequence validation was performed by Blast-Nucleotide alignment. Guide RNAs were “sewn” into the plasmid by GoldenGate cloning. The expression of Cas9 in the viral

vector in *Nicotiana benthamiana* L. plants was analyzed. The results of the work based on the use of the CRISPR-Cas9 system and viral vectors for plant genome editing are highly competitive in comparison with known analogs in the Kazakhstan and the world. This approach provides accuracy, efficiency, and flexibility of making changes in plant genomes, surpassing traditional breeding methods and other genome editing technologies.

Keywords: CRISPR/Cas, tomato bushy stunt virus, viral vector, guide RNA, *Nicotiana benthamiana* L.

З.Б. Сапахова^{1,2*}, З.Б. Стамғалиева², Р. Канат¹,
Д.А. Дауров¹, А.К. Даурова^{1,4}, К.Ж. Жамбакин¹, М.Ш. Шапекова^{1,2}

¹Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

²Tanir Research Laboratory, Алматы, Казахстан

³Биоцентр I – Университет Йоханнеса Гутенберга, Майнц, Германия

⁴Казахский национальный аграрный исследовательский университет, Алматы, Казахстан

*e-mail: z.sapakhova@ipbb.kz

CRISPR/Cas, основанную на вирусном векторе для редактирования генома растений

Геномное редактирование с использованием CRISPR-Cas9 стало мощным инструментом в современной биотехнологии, позволяющим точно изменять геномные последовательности различных организмов. В биологии растений CRISPR-Cas9 технология приобретает особую важность, поскольку позволяет эффективно модифицировать геномы растений с целью улучшения сельскохозяйственных культур и разработки новых сортов с желаемыми свойствами. Целью исследования является разработать генетическую систему CRISPR/Cas, основанную на вирусном векторе для редактирования генома растений. Введение CRISPR-Cas9 геномного редактирования в растениях на основе вирусных векторов предлагает значительный потенциал для улучшения сельскохозяйственных культур и решения проблем, связанных с устойчивостью к болезням, климатическим изменениям и питательным свойствам растений. Для получения транзientной экспрессии Cas9 в растениях использован плазмид pKSE401, которые содержат нуклеазу содержащие spCas9 с оптимизированным кодоном кукурузы под управлением промотора 35S для экспрессии в растительной ткани. Дизайн направляющих РНК для гена PDS проводилось в программе CRISPR-P-2.0 и CRISPOR. Для получения референсных генов использовалась база Sol Genomics Network (SGN) и валидация последовательностей проводилась путем выравнивания с помощью Blast-Nucleotide. Направляющие РНК были «вшиты» в плазмиду методом GoldenGate клонирования. Проведен анализ экспрессии Cas9 в вирусном векторе в растениях *Nicotiana benthamiana* L. Результаты работы, основанной на использовании системы CRISPR-Cas9 и вирусных векторов для редактирования генома растений, обладают высокой конкурентоспособностью по сравнению с известными аналогами в Казахстане и мире. Данный подход обеспечивает точность, эффективность и гибкость внесения изменений в геномы растений, превосходя традиционные методы селекции и другие технологии редактирования генома.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, вирус кукурузной карликовости томата, вирусный вектор, направляющая РНК, *Nicotiana benthamiana* L.

Кіріспе

Өсімдік геномын өңдеудің жылдам және тиімді технологиялары гендік функцияларды зерттеу және дақылдарды жақсарту үшін пайдалы. Соңғы онжылдықтарда кездейсоқ мутацияларды генерациялау үшін химиялық немесе физикалық мутагенез әдістері кеңінен қолданылды, содан кейін олар қызығушылық тудыратын фенотиптерге скринингтен өтті [1, 2]. Соңғы жылдары геномды өңдеу үшін көзделген днк қос тізбекті үзілуін (DSB) генерациялау үшін реттілікке тән нуклеазаларды қамтитын әдістер қолданыла басталды, олардың қатарына zinc finger nucleases (ZFNs) және транскрипциялық актива-

тор тәрізді эффекторлық нуклеазалар (TALENs) сияқты генетикалық құралдар [3] кіреді. Тиімсіз, көп еңбекті қажет ететін және кеңінен қолданылмайтын дәстүрлі қолданылатын ZFNs [4], TALEN әдістерімен салыстырғанда көзделген гендік генді өңдеу технологиялары мутанттарды генерациялау процесін айтарлықтай жақсарты алады [5]. Көзделген гендік инженерия өсімдіктерді өсірудің классикалық әдістеріне және дақылдарды жақсартудың трансгендік әдістеріне балама ретінде пайда болды [6]. Басқа әдістермен салыстырғанда, CRISPR әдісі ең тиімді, ыңғайлы және ең арзан болып шықты [7]. Жақында II типті CRISPR/Cas9 жүйесі өзінің жоғары тиімділігімен, төмен құнымен, қарапайым

дизайнымен және әмбебаптығымен өсімдіктердің көптеген түрлерінде, соның ішінде *Nicotiana benthamiana* L. [8, 9, 10], *Nicotiana tabacum* [11, 12], *Arabidopsis thaliana* [13], бидай [14], күріш [15], жүгері [16], қызанақ [17] және картоп [18] гендерін өңдеуде тиімді екендігі дәлелденді.

Молекулалық редакциялау үшін ең көп қолданылатын хосттардың бірі – *Nicotiana benthamiana* L. Бұл түр өсімдік гендерін функционалдық талдау және патогендермен өзара әрекеттесу үлгісі ретінде кеңінен қолданылды, өйткені оның өмірлік циклі қысқа және мутацияға тез ұшырайтындылығы оны көптеген вирустарға өте сезімтал етеді [19].

Әртүрлі өсімдік жүйелерінде CRISPR/Cas9 платформасын құруға тырысатын зерттеулер үшін фитоен десатураза (PDS) гені хлорофилл биосинтезінде орталық рөл атқарады және CRISPR/Cas9 өңдеу үшін танымал маркер ретінде пайдаланылды [20, 21, 22]. Себебі PDS мутантында альбинос фенотипі, мақсатты мутацияның визуалды көрсеткіші бар [22], АЛ PDS әртүрлі диплоидты өсімдік геномдарындағы бір даналы ген болып табылады. Сондықтан PDS мутантын оңай тануға және алуға болады. Осы себепті PDS гені өсімдіктердегі гендерді өңдеу тұжырымдамасын тексеру үшін эндогендік репортер гені ретінде қарастырылады [5, 6, 23, 24, 25, 26].

Томаттың бұталы ергежейлі вирусының p19 протеині димерлердің түзіп кешенді бағдарламалау арқылы РНҚ-индукцияланған үнсіздік кешенінің (RISC) белсендірілуіне жол бермейді. Бұл әрекет жүктейтін хост кешенінің RISC белсенділігін тежеу арқылы бөтен және кішкентай РНҚ-ның (21, 22 нп) деградациясын тежейді. Бұл берілген генді хостта бөгде гендерді экспрессиялау үшін пайдалануға мүмкіндік береді [27, 28].

Бұл жұмыста, pKSE401 плазмидасын Cas9 ақуызын экспрессиялау векторы және GoldenGate әдісімен айқастырылған бағыттаушы РНҚ (gRNA) векторы ретінде қолданылды. Бұл зерттеудің мақсаты *Nicotiana benthamiana* L. үшін CRISPR/Cas9 жүйесін әзірлеу және растау және ең тиімдісін анықтау үшін әртүрлі gRNA тізбектерін сынау болды.

Зерттеу материалдары мен әдістері

gRNA дизайнын жасау. gRNA дизайнын жасау үшін Fasta форматында қолданылу үшін *Nicotiana benthamiana* L. модельдік өсімдігінің толық аннотацияланған геномы Sol Genomics

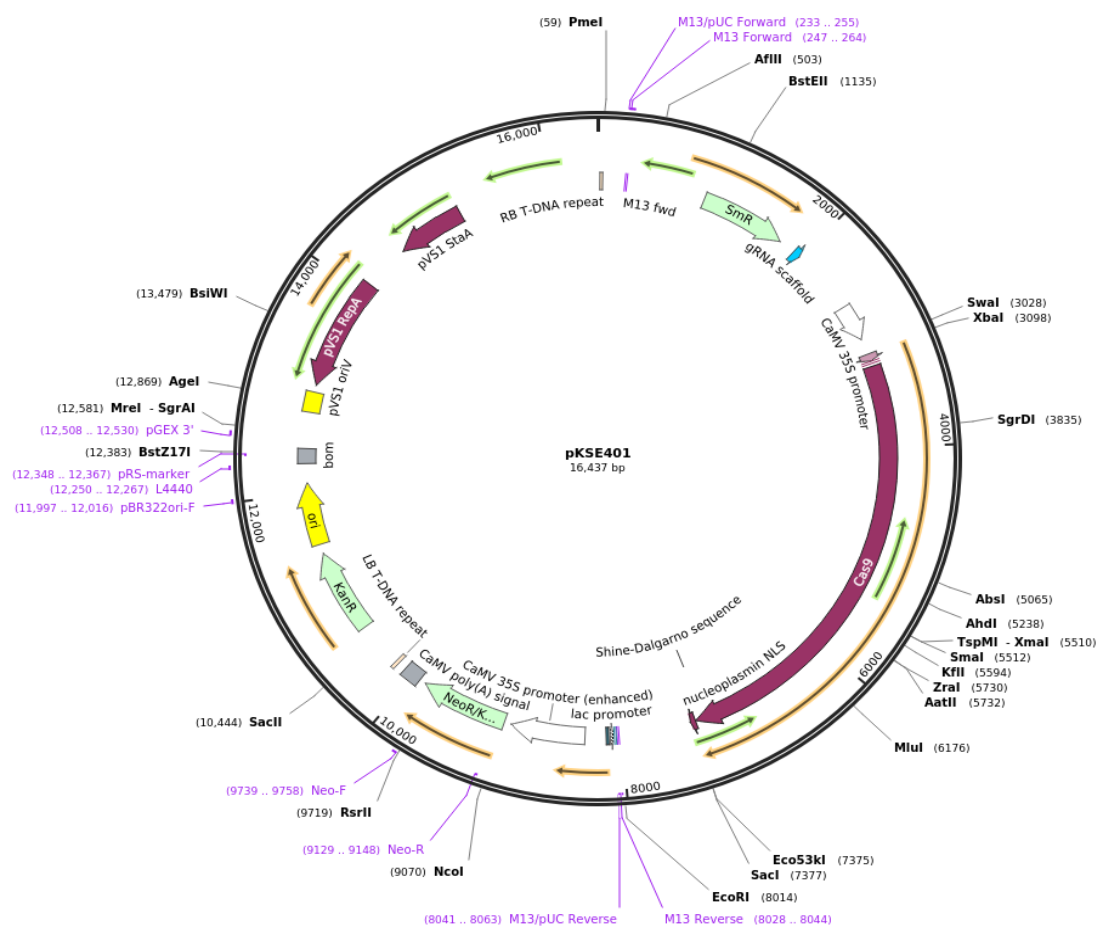
Network (SGN) (*Solanaceae* тұқымдасының геномдық ақпаратына арналған мәліметтер базасы) алынды. Ықтимал салыстыру үшін басқа өсімдіктердің геномдары NCBI ұымдастырған эукариоттық геномдар жинағынан FASTA форматында алынды [30]. CRISPR-P 2.0 веб-бағдарламасы [31] плазмидаға енгізілген РНҚ-ны (gRNA) жобалау үшін пайдаланылды. РНҚ валидациясына арналған праймер Primer-BLAST веб-сервисінің көмегімен жасалды [32]. Плазмидтік шаблондар Addgene веб-сайтынан алынды [33], және SnapGene® бағдарламалық жасақтамасында өңделген (www.snapgene.com).

Өсімдік материалдарын өсіру. *N. benthamiana* L. өсімдіктері ұзақ күндізгі жарық 16 сағат және түнгі қараңғылық 8 сағат жағдайында өсіріледі. Ауаның салыстырмалы ылғалдылығы 75-80% деңгейінде ұсталып тұрды. Өсімдіктерді өсіру кезінде температура 20 мен 27°C температура аралығында сақталды.

Конструкцияларды жобалау. Өсімдіктердегі Cas9 өтпелі экспрессиясын алу үшін pKSE401 плазмидасы (Addgene, Plasmid #62202) (Сурет 1) пайдаланылды, оның құрамында 35s промоторының бақылауымен оңтайландырылған жүгері кодоны бар spCas9 бар нуклеаза өсімдіктерде тиімді экспрессиялану үшін енгізілген. PDS геніне арналған gRNA дизайны CRISPR-P-2.0 және CRISPR бағдарламаларында жүзеге асырылды. Анықтамалық гендерді алу үшін Sol Genomics Network (SGN) дерекқоры пайдаланылды, ал реттілікті тексеру Blast-Nucleotide көмегімен туралау арқылы жүзеге асырылды.

Конструкцияларды клондау. gRNA плазмидаға GoldenGate клондау әдісімен тігілген. Ол үшін PDS1, PDS2, PDS3 және PDS4 олигонуклеотидтерінің бір тізбегі 95°C температурада күйдіру арқылы гибридизацияланды және 2% агарозды геледе сыналды. Әрі қарай, GoldenGate реакциясын жүзеге асыру үшін BsaI ферменті мен T4 лигазасының қатысуымен қос тізбекті олигонуклеотидтер pKSE401 плазмидасымен инкубацияланды. Алынған конструкциялар жылу соққысы әдісімен *Escherichia coli* жасушаларына трансформацияланды.

Бактериалдық трансформация. Бактерияларды өсіруге антибиотик қосылған Luria-Bertani (LB) қоректік ортасы қолданылды. Плазмида бактерияларға, ортаға 50-100 мкл жасушаларға 1-5 мкл плазмида ерітіндісін қосу арқылы енгізілді. Жасуша мембраналарының плазмидаға өткізгіштігін арттыру үшін қоспаны мұзға 30 минутқа қойды.



1-сурет – pKSE401 плазмидасының гендік картасы (Addgene, Plasmid #62202). Өсімдік геномын редакциялау және CRISPR/Cas негізіндегі гендерді реттеу үшін; 3×FLAG-NLS-zCas9-NLS, көзделген реттілікті енгізу үшін gRNA тіректері

Қоспа бактериялық инкубаторға қойылып, жылу соққысы жағдайларын жасау үшін 42°C температурада 30-90 секунд инкубацияланды. Жылу соққысынан кейін қоспаны қайтадан мұзға 2 минутқа қойылды. Қоспаға 500 мкл жылы қоректік ортасы қосылып, жасушаларды қалпына келтіру үшін 37°C температурада 1-2 сағат инкубацияланды. Жасушалар антибиотиктер қосылған агар пластиналарына жайылып, түнде 37°C температурада инкубацияланды.

Agrobacterium tumefaciens жасушаларын алу. Бактериялар 50 мл стерильді LB ортасында тұрақты араластыра отырып (160 айн/мин) OD600 = 0,5-0,8 дейін 28-30°C температурада 18 сағат бойы өсірілді. Содан кейін мұзбен салқындатылған культура 4°C және 6000 айн/мин температурада 7 минут бойы центрифугаланды. Супернатанты алып тастағаннан кейін түнба стерильді ерітіндімен екі рет жуылып, 20 мл 10% глицерин ерітіндісімен салқындатылды. Содан кейін түнба 1:1 қатынасында 10% глицерин ерітіндісімен

қайта араластырылып, қаптамаға салынды.

ДНҚ/РНҚ оқшаулау. Өсімдік ДНҚ-сы өндірушінің нұсқауларына сәйкес Sigma-Aldrich GenElute PLANT GENOMIC DNA MINIPREP жинағы арқылы оқшауланған. РНҚ өндірушінің нұсқауларына сәйкес TRI Reagent-тің (Sigma-Aldrich) көмегімен оқшауланған. Алынған нуклеин қышқылдарының саны мен сапасы өндірушінің нұсқауларына сәйкес NanoDrop 2000 құрылғыларында спектрофотометриялық әдістермен бағаланды.

Инфльтрацияланған жапырақтардағы ПТР талдауы. Көзделген аймақтың ПТР амплификациясы Mubarić et al., 2016 [34] сипаттаған әдіс бойынша жүргізілді. Ол үшін ПТР амплификациялау үлгісі ретінде *N. benthamiana* L. инфльтрацияланған және бақылау жапырақтарынан оқшауланған геномдық ДНҚ пайдаланылды. 1-кестеде gRNA NbPDS генімен әрекеттесу орнында жасалған праймерлер көрсетілген (Кесте 1).

1-кесте – NbPDS gRNA генімен өзара әрекеттесу орнында жасалған праймерлер

Аты	Тізбек	Сипаттама
NB-PDS3-TR1,2-gDNA-F2	GAAACACATCACCTAGGCGG	Көзделген PDS генінің айналасында орналасқан ПТР
NB-PDS3-TR1,2-gDNA-R	GGGCGTGAGGAAGTACGAAA	
NBPDS3-gDNA-404bp- F	GTAATAATGCCCCAAATTGGACTTGT	404пн PDS фрагментін көбейту үшін
PDS NBPDS3-gDNA-404bp-R	CGTGAGGAAGTACGAAATGATGATGA	404пн PDS фрагментін көбейту үшін

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

gRNA дизайны CRISPR-P-2.0 және CRISPOR бағдарламаларында жүзеге асырылды (Сурет 2). Ол үшін Sol Genomics Network

(SGN) дерекқорынан PDS гендерінің тізбегі тандалды.

Алынған PDS тізбегі бағдарламадағы реттілік терезесіне жүктелді және gRNA-ға ең қолайлы үміткерлер тандалды (3-сурет).

Show entries

Search:

position start - end	target sequence 20mer+PAM (total 23mer)	sequence information				number of target sites		
		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
6 - 28	[gRNA]	35.00 %	66.36 °C	-		3 [detail]	253 [detail]	8734 [detail]
7 - 29	[gRNA]	40.00 %	67.58 °C	-		3 [detail]	284 [detail]	4189 [detail]
15 - 37	[gRNA]	40.00 %	67.41 °C	-	NsiI	1 [detail]	35 [detail]	2521 [detail]
16 - 38	[gRNA]	35.00 %	66.24 °C	-	NsiI	3 [detail]	33 [detail]	5602 [detail]
19 - 41	[gRNA]	40.00 %	67.67 °C	-	NsiI	2 [detail]	41 [detail]	3402 [detail]
52 - 74	[gRNA]	65.00 %	77.31 °C	-		24 [detail]	106 [detail]	1625 [detail]
54 - 76	[gRNA]	55.00 %	73.34 °C	-		26 [detail]	189 [detail]	8772 [detail]
57 - 79	[gRNA]	45.00 %	69.47 °C	-		4 [detail]	155 [detail]	4231 [detail]
63 - 85	[gRNA]	35.00 %	60.87 °C	-		45 [detail]	122 [detail]	5172 [detail]
64 - 86	[gRNA]	35.00 %	62.61 °C	-		44 [detail]	423 [detail]	20108 [detail]
68 - 90	[gRNA]	35.00 %	64.47 °C	+	EaeI	47 [detail]	118 [detail]	6975 [detail]
76 - 98	[gRNA]	40.00 %	70.31 °C	+	EaeI	41 [detail]	315 [detail]	1565 [detail]
85 - 107	[gRNA]	60.00 %	78.90 °C	-		10 [detail]	32 [detail]	5530 [detail]
87 - 109	[gRNA]	50.00 %	72.73 °C	-		5 [detail]	50 [detail]	2480 [detail]
103 - 125	[gRNA]	65.00 %	80.10 °C	-	Bme1580I	2 [detail]	13 [detail]	1916 [detail]
114 - 136	[gRNA]	60.00 %	75.12 °C	-		20 [detail]	55 [detail]	1926 [detail]
115 - 137	[gRNA]	60.00 %	75.94 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	1193 [detail]
115 - 137	[gRNA]	60.00 %	76.55 °C	-		1 [detail]	68 [detail]	3056 [detail]
116 - 138	[gRNA]	60.00 %	76.55 °C	-		1 [detail]	166 [detail]	3929 [detail]
119 - 141	[gRNA]	55.00 %	74.17 °C	-		1 [detail]	118 [detail]	1511 [detail]
134 - 156	[gRNA]	40.00 %	66.77 °C	-		1 [detail]	7 [detail]	2281 [detail]
137 - 159	[gRNA]	40.00 %	66.77 °C	-	NdeI	1 [detail]	7 [detail]	5694 [detail]
156 - 178	[gRNA]	35.00 %	65.87 °C	+	Acc65I KpnI	64 [detail]	363 [detail]	8777 [detail]
162 - 184	[gRNA]	35.00 %	64.37 °C	-		3 [detail]	426 [detail]	8105 [detail]
180 - 202	[gRNA]	45.00 %	70.33 °C	-		1 [detail]	14 [detail]	5771 [detail]
185 - 207	[gRNA]	35.00 %	63.97 °C	-		1 [detail]	107 [detail]	3084 [detail]
186 - 208	[gRNA]	40.00 %	67.24 °C	-		1 [detail]	13 [detail]	4524 [detail]
186 - 208	[gRNA]	40.00 %	67.17 °C	-		1 [detail]	16 [detail]	1916 [detail]
195 - 217	[gRNA]	40.00 %	64.79 °C	-		2 [detail]	46 [detail]	5181 [detail]
203 - 225	[gRNA]	45.00 %	69.64 °C	-		20 [detail]	179 [detail]	3383 [detail]
204 - 226	[gRNA]	45.00 %	70.64 °C	-		3 [detail]	15 [detail]	2706 [detail]
219 - 241	[gRNA]	60.00 %	76.47 °C	-		1 [detail]	3 [detail]	1834 [detail]
236 - 258	[gRNA]	50.00 %	71.07 °C	-	SmlI	15 [detail]	46 [detail]	4942 [detail]
236 - 258	[gRNA]	45.00 %	68.88 °C	-	SmlI	19 [detail]	128 [detail]	1240 [detail]
239 - 261	[gRNA]	45.00 %	68.88 °C	-	SmlI	26 [detail]	42 [detail]	3404 [detail]
257 - 279	[gRNA]	25.00 %	57.92 °C	+	ApoI	1 [detail]	698 [detail]	33897 [detail]
262 - 284	[gRNA]	20.00 %	54.84 °C	+	ApoI	1 [detail]	17 [detail]	4210 [detail]
263 - 285	[gRNA]	20.00 %	55.06 °C	+	ApoI	2 [detail]	45 [detail]	4292 [detail]
264 - 286	[gRNA]	25.00 %	56.28 °C	+	ApoI	1 [detail]	35 [detail]	1489 [detail]
269 - 291	[gRNA]	35.00 %	65.89 °C	+	ApoI	1 [detail]	48 [detail]	5546 [detail]
289 - 311	[gRNA]	60.00 %	78.84 °C	-		72 [detail]	135 [detail]	1760 [detail]
290 - 312	[gRNA]	60.00 %	77.94 °C	-		105 [detail]	213 [detail]	1297 [detail]
297 - 319	[gRNA]	50.00 %	71.40 °C	-		3 [detail]	142 [detail]	1687 [detail]
303 - 325	[gRNA]	40.00 %	67.42 °C	-		2 [detail]	457 [detail]	2293 [detail]
323 - 345	[gRNA]	50.00 %	74.41 °C	-		4 [detail]	8 [detail]	4972 [detail]

2-сурет – CRISPOR жасаған gRNA нұсқаларының тізімі

or Paste a nucleotide sequence: ?

```

ATTGACCCTTGCTTCTGCTTTATTTGCTCATGCGGGCGGTGACAACTTGCCGCCATCTCCTCGAAC
GTGGAAATAATTTTGGCCGGTAGCTAGGAATACCAGGTCAAGTGCCTCTCTGTCAGTGTTCGCCGGATG
TCTTCAGTAGCAGATATGGTACCTGTTCTTTGATAGGTCCTTACCTTTACAGCAGTGATGTAATGGAT
CAAGTGGTCCTCAGGGTATGTAGTCCGTCGTACACTCTCAAGTAAGGTGGAATTTTAAAAATTTTCGGA
ATGGGGTATGGTGCAGCCTCTCCGTGTAGGGTTGTAGACAAACCTCCCTACGTCATGCTTTGGCAGCA
GTTTGGGGGCACCAAGGATATTGTCCACCTCTCTTGATGTTCTTCATCTGATCACGAAGTGACAGATT
TTCGTTTTCCATTTCTCCATCTTCTGAGGATGGTTGTGATCATGCCGCCGTTGGATGGAGTATCGGCG
AACACATTATTTGCGCGAGTGACCTCGGGTTCGCCTCCAAGTGTAGCAAGATCTGCGGTCGGCCTGCATC
TGACATTTTGTGAGGTGAATTCTCAACAAGCCGCTTAGAGTGCTCGTTAACCCTCTTCTAGTAATTTA
CTGACCTCTAGGGGTGCTTCTCAGATGCGGATGTGGAAGCGCTTTTCTGCAAGATCGTTAGATCTT
CGGGTTGTGGATGGGGGATTTCTCACTCAAGGTGGTACTAGGGGTTGAAATCAAAACCCATCTTCACC
GGCTTCGTTGAAATGGCCGATGAGGTTGGTGAACATCTGCTATTATTTTATTTCTTGCCTTGTGTCA
GCCATTTTTCATTTTGTGTTGTAAGAAGGGTTTTGATGGTCTCTAGGTGCAAACTATGGTTTTGAT
TCTCGAAATCCCAACACGCGGCCAAATTTGTTAGCTTAAAAATATATTCGATTTTGTAAAGCCTAAA
AACAAATCGAAAAATATAGGGGTAAATCGTAATCAAATATAATAAGCCCAAGAGATGATTATTGCTTCGAG

```

or upload sequence file: ? Choose File no file selected

PAM sequence requirement: NGG (e.g. NGG, NRG, NNGRRT, NG) ?

Specificity check: Tobacco (Nicotiana benthamiana) genome, v1.0.1 (Jul, 2014)

design

3-сурет – CRISPOR-ға жүктелген PDS көзделген реттілігі

Алынған gRNA нұсқаларының ішінен көзделген емес өңірлердің саны ең аз, GC% мазмұнының оңтайлы мөлшері бар және кесу учаскелерінің шектеулері жоқ учаскелер таңдалды (2-кесте).

Сонымен қатар, *Nicotiana tabacum*-да PDS геніне негізделген gRNAs әзірленді (3-кесте).

E. coli жасушаларында оңтайландырылған жүгері кодоны бар spCas9 бар CRISPR/Cas9

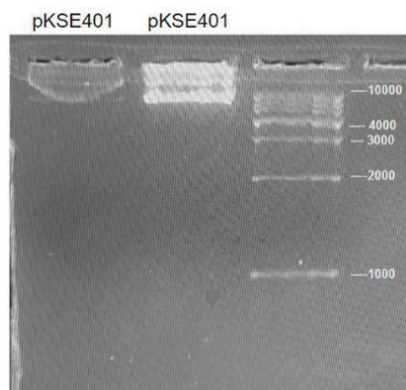
конструкциялары әзірленді. Ол үшін жасушалар жылу соққысы арқылы трансформацияланды, нәтижесінде пайда болған жасушалар канамицинмен LB ортасында өсірілді. Осыдан кейін трансформацияланған жасушалардан плазмидтік рКSE401 бөлініп, агарозды геледе тексерілді (Сурет 4). Алынған плазмидалардың бір бөлігі одан әрі клондау үшін пайдаланылды, ал қалғандары – 80°C температурада сақтауға көшірілді.

2-кесте – gRNA сипаттамалары: реттілігі, GC мазмұны, күйдіру температурасы және нысанадан тыс өңірлер саны

Position		Target sequences	Sequence information				Number of target sites		
start - end	+/-	20 mer+PAM (total 23 mer)	GC%	Tm of 20 mer	TTTT in 20 mer	restriction sites	20 mer +PAM	12 mer +PAM	8 mer +PAM
496 – 518	+	ATTATTTGCGCGAGTGACCTCGG [gRNA]	45 %	71.08°C	-	-	1 [detail]	1 [detail]	2065 [detail]

3-кесте – *N. tabacum* PDS геніне негізделген gRNAs сипаттамалары

No.	Тізбек	Ұзындық
1	F- ATTGGCCGTTAATTTGAGAGTCCA R- AAAGTGGACTCTCAAATTAACGGC	24 bp
2	F- ATTGGAGATTGTTATTGCTGGTGC R- AAACGCACCAGCAATAACAATCTC	24 bp



4-сурет – Трансформацияланған жасушалардан оқшауланған spCas9 тасымалдайтын pKSE401 плазмидалары

PDS геніне (Macrogen) арналған gRNAs олигонуклеотидтері HPLC арқылы синтезделді және тазартылды. Содан кейін алынған нуклеазасыз суда қайта суспензияланды және жұмыс концентрациясы 10 mM болатын қажетті аликвоттар жасалды. Синтезделген gRNAs-ны амплификациялау ПТР амплификаторда келесі жағдайларда жүргізілді: 5 минут ішінде 95°C, 3 минут ішінде 25°C. Осыдан кейін бір тізбекті және екі тізбекті олигонуклеотидтер 2,5% РНҚ агарозды гелінде сыналды (5-сурет).

Бір тізбекті олигонуклеотидтер жұбы PDS1 және PDS2 «gRNA1» құрады; және бір тізбекті олигонуклеотидтер жұбы PDS3 және PDS4 «gRNA2» құрады.



5-сурет – PDS геніне арналған gRNAs олигонуклеотидтері

N. benthamiana L. өсімдіктеріндегі вирустық вектордағы Cas9 экспрессиясын талдау. *N. benthamiana* L. өсімдіктеріндегі Cas9 ақуызының экспрессиясын талдау үшін ПТР Cas9 тізбегіне тән праймерлермен, сондай-ақ pKSE401 плазмидасының аймақтарына тән қосымша праймерлермен жүргізілді. Праймерлер Primer-BLAST бағдарламасында жасалған және NCBI-BLAST көмегімен тексерілген (4-кесте).

Ол үшін ДНҚ трансформацияланған *N. benthamiana* L. жапырақтарынан жоғарыда айтылған әдіспен оқшауланған. Алынған ДНҚ концентрациясы мен тазалығы Nanodrop 2000 құрылғының көмегімен өлшенді. Содан кейін

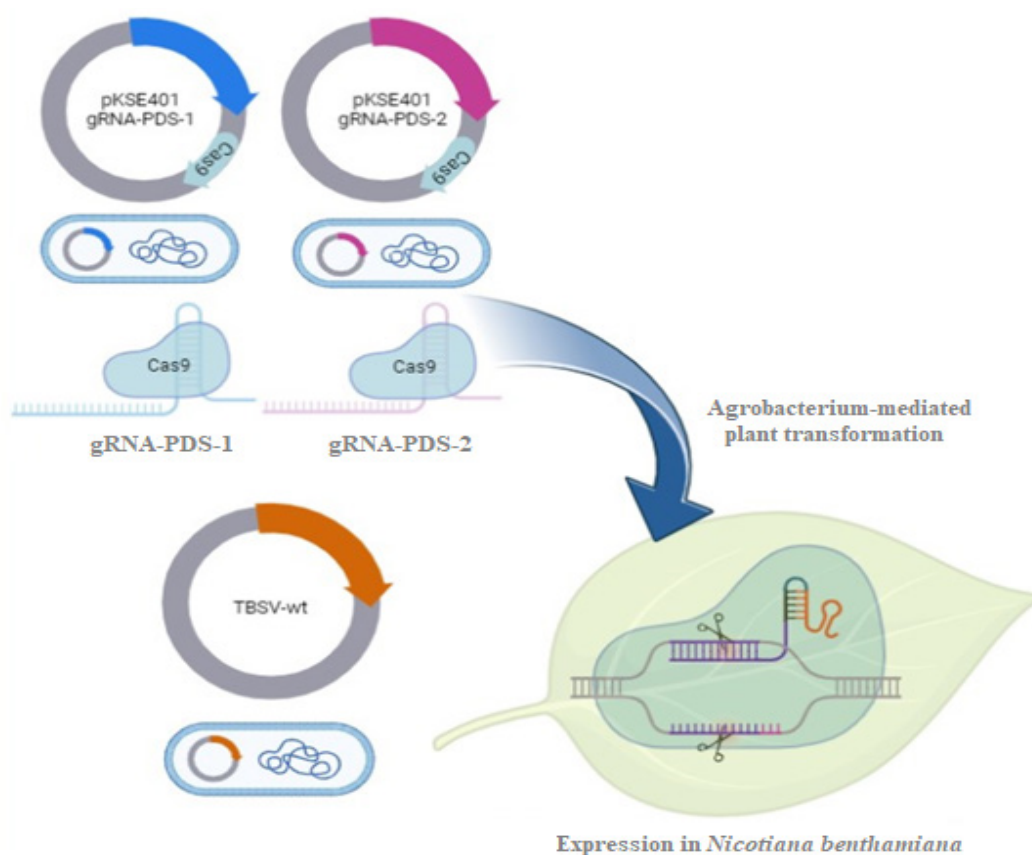
алынған ДНҚ Cas9 ақуызының экспрессиясын ПТР талдау үшін үлгі ретінде пайдаланылды.

ПТР үшін реакция қоспасы дайындалды, оның ішінде Cas9 генін көбейту үшін Cas9-570-F, Cas9-570-R праймерлері, сондай-ақ pKSE401 фрагменті үшін U626-401f, U629-401r праймерлері бар. Сонымен қатар, реакция қоспасына Nb-PPR-F және Nb-PPR-R ішкі бақылауға арналған праймерлер қосылды. Оқшауланған ДНҚ ПТР үлгісі ретінде пайдаланылды.

CRISPR-Cas9 кассетасының конструкциялары бір векторда PDS геніне арналған gRNAs және Cas9 эндонуклеаза тізбегі болатындай етіп жасалған (Сурет 6).

4-кесте – Cas9 реттілігіне тән праймерлердің сипаттамасы

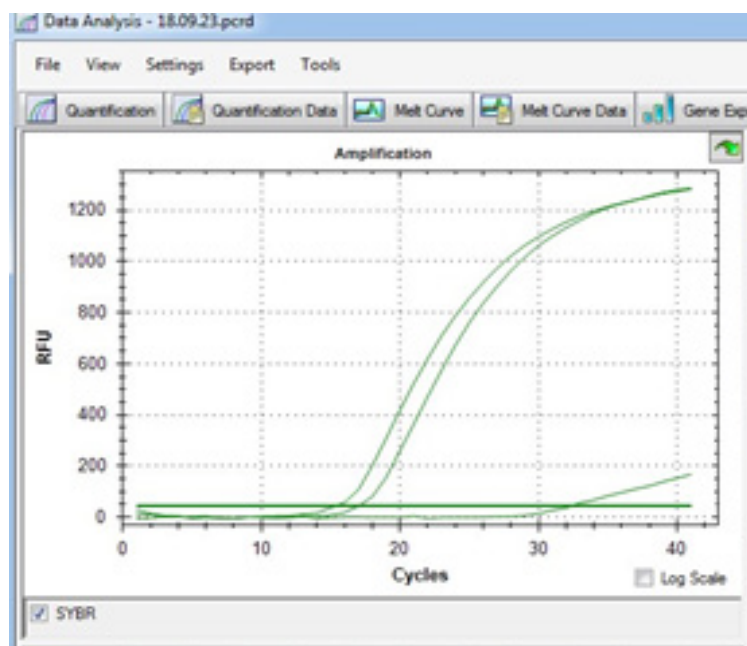
Аты	Тізбек	Сипаттамасы
Cas9-570-F	AGACCGTGAAGGTTGTGGAC	Cas9 генін тексеру үшін
Cas9-570-R	TAGTGATCTGCCGTGTCTCG	Cas9 генін тексеру үшін
U626-401F	TGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGC	pKSE401 тізбегін тексеру үшін
U629-401R	GTCAGGCTGCAGTAGTTTCCATTAA	pKSE401 тізбегін тексеру үшін
Nb-PPR-F	GAGGGTCCATTTGAGTGAC	Ішкі бақылау <i>N. Benthamiana</i> L., пентатрикопептидті ақуыздың қайталанатын гені (PPR)
Nb-PPR-R	AGGCTGATGTTGGAATCTGG	Ішкі бақылау <i>N. Benthamiana</i> L., пентатрикопептидті ақуыздың қайталанатын гені (PPR)

6-сурет – CRISPR-Cas9 конструкцияларының схемасы және олардың *N. benthamiana*-дағы көрінісі

pKSE401 плазмидасында gRNA кассетасы (PDS1, PDS2), Cas9 ақуызын белсендіруге арналған РНҚ тірегі және CAMV 35s промоторының астында Cas9 ақуыз тізбегінің өзі бар.

РНҚ *N. benthamiana* L. өсімдіктерінен TRIzol көмегімен оқшауланған, содан кейін

Cas9 ақуызының экспрессиясын RT-PCR талдауы үшін cDNA синтезделген. PPR үй шаруашылығының гені бақылау құралы ретінде пайдаланылды, ал теріс бақылау құралы ретінде суы бар және днк үлгісі жоқ үлгі пайдаланылды (Сурет 7).



7-сурет – Трансформацияланған *N. benthamiana* L. өсімдіктеріндегі Cas9 ақуызының экспрессиясының ПТР талдауы

Нәтижесінде геномдық инженерия мен өсімдік шаруашылығында қолдану үшін жоғары көзделген gRNA тізбектері жасалды. Жұмыста Қазақстандағы ауыл шаруашылығы дақылдарының төзімділігін, агрономиялық сипаттамаларын және тағамдық сапасын арттыру мақсатында олардың геномдарын өзгерту үшін озық технологиялар қолданылады. Осылайша, бағдарламаның күтілетін нәтижелері ауыл шаруашылығын дамытуға және адамдардың өмір сүру сапасын жақсартуға маңызды үлес қосады.

Қорытынды

Зерттеу өсімдік геномын өндеудің озық технологияларына негізделген және осы саладағы әлемдік тәжірибеге негізделген. Бұл дақылдарды жақсарту мақсаттарына жету үшін озық құралдар мен әдістерді қолдануға мүмкіндік береді. Бұл жұмыстың нәтижелері Cas9 ақуызының TBSV вирустық векторымен және оның штаммдарымен бірге инфильтрациясын одан әрі зерттеуде, сондай-ақ гендік инженерия жүйесінің тиімділігін одан әрі арттыру үшін мультиплексті бағыттаушы РНҚ жүйесін сынауда қолданылатын болады.

Өсімдіктер геномын өндеу үшін CRISPR-Cas9 жүйесі мен вирустық векторларды пай-

далануға негізделген зерттеуіміздің нәтижелері ғылыми, технологиялық және қоғамдық қажеттіліктер, сондай-ақ экономикалық және өнеркәсіптік мүдделер үшін маңызды. Ұсынылған тәсіл өсімдіктердегі генетикалық ақпаратты өндеудің жоғары дәлдігі мен тиімділігін қамтамасыз етеді. Бұл функционалды геномика, ауылшаруашылық өнімділігі мен азық-түлік қауіпсіздігін арттыру саласындағы зерттеулерге жаңа мүмкіндіктер ашады. Сонымен қатар, ГМО қолданбай жақсартылған сипаттамалары бар өсімдіктерді құру қоғамдық сұранысты қанағаттандырады және нормативтік шектеулерді болдырмайды. Бұл сонымен қатар жаңа биотехнологиялық және ауылшаруашылық салаларын дамытуға мүмкіндік береді.

Мүдделер қақтығысы

Барлық авторлар мақаланың мазмұнын оқып, танысты және мүдделер қақтығысы жоқ.

Қаржыландыру көзі

Бұл зерттеуді қазақстан Республикасы Ғылым және Жоғары Білім Министрлігінің Ғылым Комитеті қаржыландырды (ЖТН BR21882269).

Әдебиеттер

1. Daurova A., Daurov D., Volkov D., Karimov A., Abai Z., Raimbek D., Zhapar K., Zhambakin K., Shamekova M. Mutagenic treatment of microspore-derived embryos of turnip rape (*Brassica rapa*) to increase oleic acid content // Plant Breeding. – 2020. – Vol. 139, No 5. – P. 916-922. <https://doi.org/10.1111/pbr.12830>.
2. Daurova A., Daurov D., Zhapar K., Volkov D., Sapakhova Z., Shamekova M., Zhambakin K. Improvement of breeding-valuable traits of rapeseed (*Brassica napus*) using mutagenesis // International Journal of Agriculture and Biology. – 2022. – Vol. 28, No 4. – P. 219-227. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1973>.
3. Bogdanove A.J., Schornack S., Lahaye T. TAL effectors: finding plant genes for disease and defense // Curr Opin Plant Biol. – 2010. – Vol. 13, No 4. – P. 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.010>.
4. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain // Proc Natl Acad Sci USA. – 1996. – Vol. 6, No 93(3). – P. 1156-1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>.
5. Ma C., Zhu C., Zheng M., Liu M., Zhang D., Liu B., Li Q., Si J., Ren X., Song H. CRISPR/Cas9-mediated multiple gene editing in *Brassica oleracea* var. capitata using the endogenous tRNA-processing system // Hortic. Res. – 2019. – Vol. 16, No 20. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0107-1>
6. Charrier A., Vergne E., Dousset N., Richer A., Petiteau A., Chevreau E. Efficient targeted mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 system // Front. Plant Sci. – 2019. – Vol. 10, No 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>.
7. Doudna J.A., Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // Science. – 2014. – Vol. 28, No 346 (6213). – P. 1258096. <https://doi.org/10.1126/science>.
8. Ma X., Li X., Li Z. Transgene-free genome editing in *Nicotiana benthamiana* with CRISPR/Cas9 delivered by a rhabdovirus vector // Methods Mol Biol. – 2023. – Vol. 2653. – P. 173-185. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3131-7_11.
9. Wang Z., Shea Z., Li Q., Wang K., Mills K., Zhang B., Zhao B. Evaluate the guide RNA effectiveness via Agrobacterium-mediated transient assays in *Nicotiana benthamiana* // Front. Plant Sci. – 2023. – Vol. 14. – P. 1111683. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1111683>.
10. Yoshida T., Ishikawa M., Toki S., Ishibashi K. Heritable tissue-culture-free gene editing in *Nicotiana benthamiana* through viral delivery of SpCas9 and sgRNA // Plant and Cell Physiology. – 2024. – Vol. 65, No 11. – P. 1743–1750. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcae100>.
11. Chen Y., Xiang H., Jia L., Yang Q., Zhang J., Jiang J., Zeng W., Deng L., Jin J., Gao Q., Li X. High-throughput creation of *Nicotiana tabacum* gene-targeted mutants based on CRISPR/Cas9 // Plant Cell Rep. – 2023. – Vol. 42. – P. 2039-2042. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03050-5>.
12. Le N.T., Tran H.T., Bui T.P., Nguyen G.T., Nguyen D.V., Ta D.T., Trinh D.D., Molnar A., Pham N.B., Chu Ha.H., Do P.T. Simultaneously induced mutations in eIF4E genes by CRISPR/Cas9 enhance PVY resistance in tobacco // Sci Rep. – 2022. – Vol. 12. – P. 14627. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18923-0>.
13. Angulo J., Astin C.P., Bauer O., Blash K.J., Bowen N.M., Chukwudinma N.J., DiNofrio A.S., Faletti D.O., Ghulam A.M., Gusinde-Duffy C.M., Horace K.J., Ingram A.M., Isaack K.E., Jeong G., Kiser R.J., Kobylanski J.S., Long M.R., Manning G.A., Morales J.M., Nguyen K.H., Pham R.T., Phillips M.H., Reel T.W., Seo J.E., Vo H.D., Wukoson A.M., Yeary K.A., Zheng G.Y., Lukowitz W. CRISPR/Cas9 mutagenesis of the Arabidopsis growth-regulating factor (GRF) gene family // Front. Genome Ed. – 2023. – Vol. 5. – P. 1251557. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2023.1251557>.
14. Elsharawy H., Refat M. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat: enhancing quality and productivity for global food security-a review // Funct Integr Genomics. – 2023. – Vol. 4, No 23(3). – P. 265. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01190-1>.
15. Romero F.M., Gatica-Arias A. CRISPR/Cas9: Development and application in rice breeding // Rice Science. – 2019. – Vol. 26, No 5. – P. 265-281. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.08.001>.
16. Wang Y., Tang Q., Pu L., Zhang H., Li X. CRISPR-Cas technology opens a new era for the creation of novel maize germplasms // Front. Plant Sci. – 2022. – Vol. 13. – P. 1049803. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1049803>.
17. Naeem M., Zaman W., Saqib S., Shahzad A., ur Rahman S., Ahmad N. CRISPR/Cas-mediated genome editing for efficient tomato breeding: past achievements and future directions // South African Journal of Botany. – 2024. – Vol. 172. – P. 277-288. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.07.038>.
18. Hou X., Guo X., Zhang Y., Zhang Q. CRISPR/Cas genome editing system and its application in potato // Front Genet. – 2023. – Vol. 13, No 14. – P. 1017388. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1017388>.
19. Jutras P.V., Marusic C., Lonoce C., Deflers C., Goulet M.-C., Benvenuto E., Michaud D., Donini M. An accessory protease inhibitor to increase the yield and quality of a tumour-targeting mAb in *Nicotiana benthamiana* leaves // Plos One. – 2016. – Vol 11, No 11. – P. e0167086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167086>.
20. Zhang K., Raboanatahiry N., Zhu B., Li M. Progress in genome editing technology and its application in plants // Frontiers in Plant Science. – 2017. – Vol. 8, No 177. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00177>.
21. Pan C., Ye L., Qin L., Liu X., He Y., Wang J., Chen L., Lu G. CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations // Sci. Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 24765. <https://doi.org/10.1038/srep24765>.
22. Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X.W., Chen Z., Qu L.J. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in Arabidopsis by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis // Cell Res. – 2007. – Vol. 17. – P. 471–482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>.
23. Odipio J., Alicai T., Ingelbrecht I., Nusinow D.A., Bart R., Taylor N.J. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in Cassava // Front. Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – P. 1780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01780>.

24. Shan S., Mavrodiev E.V., Li R., Zhang Z., Hauser B.A., Soltis P.S., Soltis D.E., Yang B. Application of CRISPR/Cas9 to *Tragopogon (Asteraceae)*, an evolutionary model for the study of polyploidy // *Mol. Ecol. Resour.* – 2018. – Vol. 18. – P. 1427-1443. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12935>.
25. Bernard G., Gagneul D., Alves Dos Santos H., Etienne A., Hilbert J. L., Rambaud C. Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 technology in chicory // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20. – P. E1155. <https://doi.org/10.3390/ijms20051155>.
26. Wilson F.M., Harrison K., Armitage A.D., Simkin A.J., Harrison R.J. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry // *Plant Methods* – 2019. – Vol. 15. – P. 45. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>.
27. Chiong K.T., Cody W.B., Scholthof H.B. RNA silencing suppressor-influenced performance of a virus vector delivering both guide RNA and Cas9 for CRISPR gene editing // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11. – P. 6769. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85366-4>.
28. Shamekova M., Mendoza M.R., Hsieh Y.C., Lindbo J., Omarov R.T., Scholthof H.B. Tombusvirus-based vector systems to permit over-expression of genes or that serve as sensors of antiviral RNA silencing in plants // *Virology*. – 2014. – Vol. 452. – P. 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.031>.
29. Fernandez-Pozo N., Menda N., Edwards J.D., Saha S., Tecle I.Y., Strickler S.R., Bombarely A., Fisher-York T., Pujar A., Foerster H., Yan A., Mueller L.A. The sol genomics network (SGN) – from genotype to phenotype to breeding // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43. – P. D1036-1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>.
30. Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Comeau D.C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Travers B.W., Pruitt K.D., Sherry S.T. Database resources of the national center for biotechnology information // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – Vol. 50. – P. 20-26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.
31. Hao L., Yudian D., Yanqing Z., Wenqi J., Kabin X., Ling-Ling C. CRISPR-P 2.0: An improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants // *Molecular Plant*. – 2017. – Vol. 10, No 3. – P. 530-532. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.003>.
32. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 13, No 134. – P. 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
33. Website of Addgene. Available online: <https://www.addgene.org/>. (accessed on 10 September 2023).
34. Mubarik M.S., Khan S.H., Ahmad A., Khan Z., Sajjad M., Khan I.A. Disruption of phytoene desaturase gene using transient expression of Cas9: gRNA Complex // *International Journal of Agriculture & Biology*. – 2016. – Vol. 18, No 5. – P. 990-996. <https://doi.org/10.17957/ijab/15.0199>.

References

1. Angulo J., Astin C.P., Bauer O., Blash K.J., Bowen N.M., Chukwudinma N.J., DiNofrio A.S., Faletti D.O., Ghulam A.M., Gusinde-Duffy C.M., Horace K.J., Ingram A.M., Isaack K.E., Jeong G., Kiser R.J., Kobylanski J.S., Long M.R., Manning G.A., Morales J.M., Nguyen K.H., Pham R.T., Phillips M.H., Reel T.W., Seo J.E., Vo H.D., Wukoson A.M., Yearly K.A., Zheng G.Y., Lukowitz W. (2023) CRISPR/Cas9 mutagenesis of the Arabidopsis growth-regulating factor (GRF) gene family. *Front. Genome Ed.*, vol. 5, pp. 1251557. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2023.1251557>.
2. Bernard G., Gagneul D., Alves Dos Santos H., Etienne A., Hilbert J. L., Rambaud C. (2019) Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 technology in chicory. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, pp. E1155. <https://doi.org/10.3390/ijms20051155>.
3. Bogdanove A.J., Schornack S., Lahaye T. (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr Opin Plant Biol.*, vol. 13, no 4, pp. 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.010>.
4. Charrier A., Vergne E., Dousset N., Richer A., Petiteau A., Chevreau E. (2019) Efficient targeted mutagenesis in apple and first time edition of pear using the CRISPR-Cas9 system. *Front. Plant Sci.*, vol. 10, no 40. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00040>.
5. Chen Y., Xiang H., Jia L., Yang Q., Zhang J., Jiang J., Zeng W., Deng L., Jin J., Gao Q., Li X. (2023) High-throughput creation of *Nicotiana tabacum* gene-targeted mutants based on CRISPR/Cas9. *Plant Cell Rep.*, vol. 42, pp. 2039-2042. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03050-5>.
6. Chiong K.T., Cody W.B., Scholthof H.B. (2021) RNA silencing suppressor-influenced performance of a virus vector delivering both guide RNA and Cas9 for CRISPR gene editing. *Sci Rep.*, vol. 11, pp. 6769. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85366-4>.
7. Daurova A., Daurov D., Volkov D., Karimov A., Abai Z., Raimbek D., Zhapar K., Zhambakin K., Shamekova M. (2020) Mutagenic treatment of microspore-derived embryos of turnip rape (*Brassica rapa*) to increase oleic acid content. *Plant Breed.*, vol. 139, no 5, pp. 916-922. <https://doi.org/10.1111/pbr.12830>.
8. Daurova A., Daurov D., Zhapar K., Volkov D., Sapakhova Z., Shamekova M., Zhambakin K. (2022) Improvement of breeding-valuable traits of rapeseed (*Brassica napus*) using mutagenesis. *International Journal of Agriculture and Biology*, vol. 28, no 4, pp. 219-227. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1973>.
9. Doudna J.A., Charpentier E. (2014) Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, vol. 28, no 346 (6213), pp. 1258096. <https://doi.org/10.1126/science>.
10. Elsharawy H., Refat M. (2023) CRISPR/Cas9 genome editing in wheat: enhancing quality and productivity for global food security-a review. *Funct Integr Genomics*, vol. 4, no 23(3), pp. 265. <https://doi.org/10.1007/s10142-023-01190-1>.

11. Fernandez-Pozo N., Menda N., Edwards J.D., Saha S., Tecle I.Y., Strickler S.R., Bombarely A., Fisher-York T., Pujar A., Foerster H., Yan A., Mueller L.A. (2015) The sol genomics network (SGN) – from genotype to phenotype to breeding. *Nucleic Acids Research*, vol. 43, pp. D1036-1041. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1195>.
12. Hao L., Yudian D., Yanqing Z., Wenqi J., Kabin X., Ling-Ling C. (2017) CRISPR-P 2.0: An improved CRISPR-Cas9 tool for genome editing in plants. *Mol. Plant.*, vol. 10, no 3, pp. 530-532. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.003>.
13. Hou X., Guo X., Zhang Y., Zhang Q. (2023) CRISPR/Cas genome editing system and its application in potato. *Front Genet.*, vol. 13, no 14, pp. 1017388. <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1017388>.
14. Jutras P.V., Marusic C., Lonoce C., Deflers C., Goulet M.-C., Benvenuto E., Michaud D., Donini M. (2016) An accessory protease inhibitor to increase the yield and quality of a tumour-targeting mAb in *Nicotiana benthamiana* leaves. *Plos One*, vol. 11, no 11, pp. e0167086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167086>.
15. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 6, no 93(3), pp. 1156-1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>.
16. Le N.T., Tran H.T., Bui T.P., Nguyen G.T., Nguyen D.V., Ta D.T., Trinh D.D., Molnar A., Pham N.B., Chu Ha.H., Do P.T. (2022) Simultaneously induced mutations in eIF4E genes by CRISPR/Cas9 enhance PVY resistance in tobacco. *Sci Rep.*, vol. 12, pp. 14627. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18923-0>.
17. Ma C., Zhu C., Zheng M., Liu M., Zhang D., Liu B., Li Q., Si J., Ren X., Song H. (2019) CRISPR/Cas9-mediated multiple gene editing in *Brassica oleracea* var. capitata using the endogenous tRNA-processing system. *Hortic. Res.*, vol. 16, no 20. <https://doi.org/10.1038/s41438-018-0107-1>
18. Ma X., Li X., Li Z. (2023) Transgene-free genome editing in *Nicotiana benthamiana* with CRISPR/Cas9 delivered by a rhabdovirus vector. *Methods Mol Biol.*, vol. 2653, pp. 173-185. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3131-7_11.
19. Mubarik M.S., Khan S.H., Ahmad A., Khan Z., Sajjad M., Khan I.A. (2016) Disruption of phytoene desaturase gene using transient expression of Cas9: gRNA Complex. *International Journal of Agriculture & Biology*, vol. 18, no 5, pp. 990-996. <https://doi.org/10.17957/ijab/15.0199>.
20. Naeem M., Zaman W., Saqib S., Shahzad A., ur Rahman S., Ahmad N. (2024) CRISPR/Cas-mediated genome editing for efficient tomato breeding: past achievements and future directions. *South African Journal of Botany*, vol. 172, pp. 277-288. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.07.038>.
21. Odipto J., Alicai T., Ingelbrecht I., Nusinow D.A., Bart R., Taylor N.J. (2017) Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of phytoene desaturase in Cassava. *Front. Plant Sci.*, vol. 8, pp. 1780. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01780>.
22. Pan C., Ye L., Qin L., Liu X., He Y., Wang J., Chen L., Lu G. (2016) CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations. *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 24765. <https://doi.org/10.1038/srep24765>.
23. Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X.W., Chen Z., Qu L.J. (2007) Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in Arabidopsis by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res.*, vol. 17, pp. 471-482. <https://doi.org/10.1038/cr.2007.40>.
24. Romero F.M., Gatica-Arias A. (2019) CRISPR/Cas9: Development and application in rice breeding. *Rice Science*, vol. 26, no 5, pp. 265-281. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2019.08.001>.
25. Sayers E.W., Bolton E.E., Brister J.R., Canese K., Chan J., Comeau D.C., Connor R., Funk K., Kelly C., Kim S., Madej T., Marchler-Bauer A., Lanczycki C., Lathrop S., Lu Z., Thibaud-Nissen F., Murphy T., Phan L., Skripchenko Y., Tse T., Wang J., Williams R., Trawick B.W., Pruitt K.D., Sherry S.T. (2022) Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research*, vol. 50, pp. 20-26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.
26. Shamekova M., Mendoza M.R., Hsieh Y.C., Lindbo J., Omarov R.T., Scholthof H.B. (2014) Tombusvirus-based vector systems to permit over-expression of genes or that serve as sensors of antiviral RNA silencing in plants. *Virology*, vol. 452, pp. 159-165. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.031>.
27. Shan S., Mavrodiev E.V., Li R., Zhang Z., Hauser B.A., Soltis P.S., Soltis D.E., Yang B. (2018) Application of CRISPR/Cas9 to Tragopogon (*Asteraceae*), an evolutionary model for the study of polyploidy. *Mol. Ecol. Resour.*, vol. 18, pp. 1427-1443. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12935>.
28. Wang Y., Tang Q., Pu L., Zhang H., Li X. (2022) CRISPR-Cas technology opens a new era for the creation of novel maize germplasms. *Front. Plant Sci.*, vol. 13, pp. 1049803. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1049803>.
29. Wang Z., Shea Z., Li Q., Wang K., Mills K., Zhang B., Zhao B. (2023) Evaluate the guide RNA effectiveness via Agrobacterium-mediated transient assays in *Nicotiana benthamiana*. *Front. Plant Sci.*, vol. 14, pp. 1111683. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1111683>.
30. Website of Addgene. Available online: <https://www.addgene.org/>. (accessed on 10 September 2023).
31. Wilson F.M., Harrison K., Armitage A.D., Simkin A.J., Harrison R.J. (2019) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of phytoene desaturase in diploid and octoploid strawberry. *Plant Methods*, vol. 15, pp. 45. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0428-6>.
32. Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no 134, pp. 1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.
33. Yoshida T., Ishikawa M., Toki S., Ishibashi K. (2024) Heritable tissue-culture-free gene editing in *Nicotiana benthamiana* through viral delivery of SpCas9 and sgRNA. *Plant and Cell Physiology*, vol. 65, no 11, pp. 1743-1750. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcae100>.
34. Zhang K., Raboanatahiry N., Zhu B., Li M. (2017) Progress in genome editing technology and its application in plants. *Frontiers in Plant Science*, vol. 8, no 177. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00177>.

Авторлар туралы мәлімет

Сапахова, Загипа Бейсеновна – PhD, қауымдастырылған профессор, Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының селекция және биотехнология зертханасының жетекші ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан; e-mail: z.sapakhova@ipbb.kz)

Стамғалиева Зухра – PhD докторанты, Хромосома биологиясы зертханасы (проф. Брайан Люк, PhD), Даму және нейробиология институты (IDN), Биорталық I – Йоханнес Гутенберг Университеті (Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 15, Майнц, Германия. Z.stamgaliyeva@imb-mainz.de)

Қанат, Рахим – Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының селекция және биотехнология зертханасының лаборанты (Алматы, Қазақстан; e-mail: r.kanat@ipbb.kz)

Дауров, Диас Ламзарович – Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының селекция және биотехнология зертханасының аға ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан; e-mail: d.daurov@ipbb.kz)

Даурова, Айнаш Кененбайқызы – Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының селекция және биотехнология зертханасының аға ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан; e-mail: a.daurova@ipbb.kz)

Жамбакин, Қабыл Жанарович – биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚҰ ҰҒА академигі, Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының селекция және биотехнология зертханасының бас ғылыми қызметкері (Алматы, Қазақстан; e-mail: k.zhambakin@ipbb.kz)

Шапекова, Малика Хабидулаевна – PhD, Профессор, Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының селекция және биотехнология зертханасының меңгерушісі (Алматы, Қазақстан; e-mail: m.shamekova@ipbb.kz)

Information about authors

Sapakhova, Zagipa – PhD, Associate Professor, Lead Researcher of Breeding and Biotechnology Laboratory, Institute of Plant Biology and Biotechnology (Almaty, Kazakhstan; e-mail: z.sapakhova@ipbb.kz)

Stamgaliyeva Zuhra – PhD student, Chromosome Biology Lab (Prof. Brian Luke, PhD), Institute for Developmental and Neurobiology (IDN), Biocenter I – Johannes-Gutenberg-University (Hanns-Dieter-Hüsch-Weg 15, Mainz, Germany. Z.stamgaliyeva@imb-mainz.de)

Kanat, Rakhim – Laboratory Assistant of Breeding and Biotechnology Laboratory, Institute of Plant Biology and Biotechnology (Almaty, Kazakhstan; e-mail: r.kanat@ipbb.kz)

Daurov, Dias – Senior Researcher of Breeding and Biotechnology Laboratory, Institute of Plant Biology and Biotechnology (Almaty, Kazakhstan; e-mail: d.daurov@ipbb.kz)

Daurova, Ainash – Senior Researcher of Breeding and Biotechnology Laboratory, Institute of Plant Biology and Biotechnology (Almaty, Kazakhstan; e-mail: a.daurova@ipbb.kz)

Zhambakin, Kabyl – Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of NAS of the RK, Chief Researcher of Breeding and Biotechnology Laboratory, Institute of Plant Biology and Biotechnology (Almaty, Kazakhstan; e-mail: k.zhambakin@ipbb.kz)

Shamekova, Malika – PhD, Professor, Head of Breeding and Biotechnology Laboratory, Institute of Plant Biology and Biotechnology (Almaty, Kazakhstan; e-mail: m.shamekova@ipbb.kz)

Келін түсті 24 ақпан 2025 жыл
Қабылданды 20 мамыр 2025 жыл