

## СОЗДАНИЕ ЛИНИИ ТАБАКА СО СНИЖЕННЫМИ АНТИФИДАНТНЫМИ СВОЙСТВАМИ ПО ОТНОШЕНИЮ К КОЛОРАДСКОМУ ЖУКУ

Костина Н.Е.<sup>1</sup>, Спасельникова А.В.<sup>1</sup>, Егорова А.А.<sup>1</sup>, Колосовская Е.В.<sup>1</sup>, Домрачев Д.В.<sup>2</sup>, Романова А.В.<sup>1</sup>, Туманян С.Р.<sup>3</sup>, Хамас С.<sup>4</sup>, Кумлен Й.<sup>4</sup>, Дубовский И.М.<sup>3,5</sup>, Герасимова С.В.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Россия, г.Новосибирск; ✉ \*gerson@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Институт органической химии СО РАН, 630090 Россия, г.Новосибирск;

<sup>3</sup>Новосибирский государственный аграрный университет, 630039 Россия, г.Новосибирск;

<sup>4</sup>Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), 06466 Germany, Gatersleben;

<sup>5</sup>Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, 630501 Россия, Новосибирская область, р.п. Краснообск.

**Актуальность.** Модификация растений с целью повышения их устойчивости к вредителям – перспективное направление в современной биотехнологии. Создание искусственных защитных систем на основе РНК-интерференции или индукция метаболических изменений в растениях могут существенно снизить привлекательность для вредителя и, как следствие, степень повреждения растений. Однако, разработка стратегий подобных модификаций затруднена отсутствием биотехнологических методов, разработанных для каждой культуры, и адекватных моделей для проведения таких исследований. Табак *Nicotiana tabacum* L. как растение семейства пасленовых потенциально может быть моделью для исследования возможных стратегий повышения устойчивости к вредителям для таких родственных культур как картофель, томат, сладкий перец и т.д. Препятствием к проведению подобных работ на табаке является высокая токсичность листьев, которая защищает табак от большинства вредителей. Недавно опубликованы исследования, доказывающие, что мутагенез генов семейства *Berberine Bridge-Like* (*BBL*) в табаке приводит к существенным изменениям в количественном и качественном составе алкалоидов в листьях. В настоящей работе данный подход был применен с целью получения растений табака, пригодных для потребления в пищу колорадским жуком (*Leptinotarsa decemlineata* Say), который является наиболее распространенным и опасным вредителем картофеля. **Результаты.** С целью модификации генома табака, были подобраны две направляющие РНК (нРНК), нацеленные на шесть генов семейства *BBL*. Каждая из них была встроена в вектор, содержащий ген нуклеазы Cas9 и каркас нРНК. Полученные конструкции вместе с плазмидой pBII21, содержащей ген устойчивости к канамицину *nptII* и репортерный ген бета-глюкуронидазы *Escherichia coli* Migula, были использованы для трансформации листовых эксплантов табака методом биобаллистики. Из трансформированных клеток путем селекции на канамицине были получены каллусы и далее трансгенные растения-регенеранты поколения T0. Неожиданным результатом стало появление широкого плейотропного эффекта модификации в виде многочисленных серьезных аномалий развития среди полученных популяций регенерантов. Самые тяжелые аномалии проявлялись в виде быстрой гибели растений, относительно жизнеспособные растения отличались угнетением роста и укоренения, увеличением числа междоузлий, изменением формы листьев, ускоренным цветением, аномалиями развития цветка и стерильностью. Только одна из семи полученных популяций клонов обладала достаточной жизнеспособностью

## CREATING A TOBACCO LINE WITH A WEAKER ANTIFEEDANT PROPERTY AGAINST COLORADO POTATO BEETLE

Kostina N.E.<sup>1</sup>, Spaselnikova A.V.<sup>1</sup>, Egorova A.A.<sup>1</sup>, Kolosovskaya E.V.<sup>1</sup>, Domrachev D.V.<sup>2</sup>, Romanova A.V.<sup>1</sup>, Tumanyan S.R.<sup>3</sup>, Chamas S.<sup>4</sup>, Kumlehn J.<sup>4</sup>, Dubovskiy I.M.<sup>3,5</sup>, Gerasimova S.V.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630090, Russia;

✉ \*gerson@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk 630090, Russia;

<sup>3</sup>Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk 630039, Russia;

<sup>4</sup>Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben 06466, Germany;

<sup>5</sup>Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Sciences, Krasnoobsk Sett., Novosibirsk Province 630501, Russia.

**Background.** Genetic modification of plants is one of the promising strategies to increase their resistance to insect pests. The development of metabolic or RNA interference systems for plant protection requires appropriate models of host-insect interactions. *Nicotiana tabacum* L. is a classical model plant used in molecular and metabolic engineering. We consider tobacco as a model for developing protective strategies against Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say, CPB). Normally, tobacco is toxic for CPB due to high content of nicotine and related alkaloids in leaves. Modification of the tobacco genome could provide tobacco genotypes with altered metabolism suitable for CPB feeding. It is known that different mutations in *Berberine Bridge-Like* (*BBL*) genes cause different alterations in tobacco leaf alkaloid levels. In the current study, the Cas9/gRNA system targeting members of the *BBL* gene family of tobacco was used to create a line which can serve as a diet for CPB. **Results.** In order to obtain tobacco with modified alkaloid content, two gRNAs matching target sequences in six *BBL* genes were selected. Each gRNA was cloned into a gRNA/Cas9 generic vector. The created constructs were mixed and used for biolistic transformation of tobacco leaf explants together with the pBII21 plasmid harboring the kanamycin resistance gene *nptII* and the reporter *E.coli* beta-glucuronidase (GUS) gene. Regenerants were selected on 100 mg/l of kanamycin and checked for transgene presence by histochemical GUS-assay. Unexpectedly, the regenerated plants displayed a variety of adverse phenotypic effects including different degree of growth and rooting inhibition, early flowering, increased number of internodes, changes in leaf shape, fusion of flowers, longostyly, and partial sterility. Only one from seven obtained calli produced a population of regenerated plants without severe phenotypic abnormalities. The NtaBBL5-14 line of clonally propagated plants was selected from this population and used for

для выращивания в гидропонном комплексе и существенно не отличалась от исходного сорта по жизнеспособности *in vitro*. Из этой популяции была выделена линия табака NtaBBL5-14, поддерживаемая *in vitro*. Данная линия была протестирована на кормовую пригодность для колорадского жука. Показано, что личинки колорадского жука эффективно потребляют листья табака полученной линии, и практически не потребляют листья контрольных растений (процент потребления 97±0.5% для модифицированных и 9±3% для контрольных растений). **Заключение.** Методом модификации генома получена линия табака, пригодная для питания личинок колорадского жука. В дальнейшем эта линия может быть использована как модель для исследования взаимодействия колорадского жука и растений. Результаты работы демонстрируют возможность менять спектр кормовых предпочтений вредителей и открывают перспективы развития данного направления. В частности, перспективным может быть осуществление модификаций с меньшим плейотропным эффектом, и, возможно, этого можно добиться, производя нокаут других генов, участвующих в регуляции синтеза никотина.

**Ключевые слова:** никотин, *Nicotiana tabacum*, *Leptinotarsa decemlineata*, токсичность, семейство генов *BBL*, Cas9, нРНК

#### Прозрачность финансовой деятельности/Financial transparency

Автор не имеет финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах./The author has no financial interest in the materials or methods presented.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы./The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

#### Дополнительная информация/Additional information

Полные данные этой статьи доступны/Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2658-6266-2020-1-o5>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы./The journal's opinion is neutral to the presented materials, the author, and his or her employer

Все авторы одобрили рукопись./All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует./There is no conflict of interests.

a CPB feeding experiment. It was shown that CPB larvae consume the leaves of NtaBBL5-14 line ten times more efficiently than the leaves of control plants (97±0.5% vs. 9±3% in 24 h respectively). **Conclusion.** The NtaBBL5-14 tobacco line is suitable for CPB feeding and can be further used as a model for studies in plant-pest interaction. The modification of other genes regulating nicotine metabolism can be a promising strategy to obtain tobacco plants edible for CPB with less pleiotropic effects.

**Key words:** nicotine, *Nicotiana tabacum*, *Leptinotarsa decemlineata*, toxicity, *BBL* gene family, Cas9, gRNA

**Для цитирования:** Костина Н.Е., Спасельникова А.В., Егорова А.А., Колосовская Е.В., Домрачев Д.В., Романова А.В., Туманян С.Р., Хамас С., Кумлен Й., Дубовский И.М., Герасимова С.В. Создание линии табака со сниженными антифидантными свойствами по отношению к колорадскому жуку. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(1):24-30. DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o5

**For citation:** Kostina N.E., Spaselnikova A.V., Egorova A.A., Kolosovskaya E.V., Domrachev D.V., Romanova A.V., Tumanyan S.R., Chamas S., Kumlehn J., Dubovskiy I.M. Gerasimova S.V. Creating a tobacco line with a weaker antifeedant property against colorado potato beetle. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(1):24-30. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-1-o5

#### ORCID:

**Gerasimova S.V.** <https://orcid.org/0000-0001-8626-1831>

УДК 57.016.5

Поступила в редакцию: 05.06.2020

Принята к публикации: 11.06.2020

## Введение

Табак *Nicotiana tabacum* L. является первым растением, на котором были разработаны методы трансгенеза, и активно используется для создания различных молекулярно-генетических моделей в генетике растений наряду с *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Sierro et al., 2014). Табак является перспективным модельным объектом для исследования генетики и физиологии растений семейства пасленовых, к которому принадлежит ряд ценных сельскохозяйственных культур, например, картофель *Solanum tuberosum* L. – одна из важнейших продовольственных культур во всем мире. Среди вредителей картофеля следует выделить колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say), как самого опасного на территории Северной Америки, Евразии и Африки. Колорадский жук (КЖ) может быстро акклиматизироваться и размножаться в различных средах обитания по всему миру благодаря активной миграционной способности, высокой пластичности и широкому спектру внутривидового полиморфизма (Weber, 2003). Колорадский жук наносит существенный вред посадкам картофеля, а для контроля этого вредителя в основном используют химические инсектициды. Однако КЖ быстро формирует резистентность к химическим инсектицидам, и нормы расхода препаратов многократно завышаются, что наносит значительный вред окружающей среде (Alyokhin et al., 2008). Моделирование молекулярных механизмов устойчивости растений к КЖ и создание модифицированных растений с повышенным уровнем устойчивости к КЖ является перспективным подходом для поиска средств борьбы с данным вредителем. Однако, отработка различных молекулярных подходов на картофеле – сложная задача, поскольку биотехнологические методы на этой культуре требуют длительной оптимизации для каждого генотипа, генетическая трансформация занимает много времени и требует привлечения опытных специалистов. Перспективной является идея отработки подхода на более простой родственной модели, которую затем, уже в «готовом виде», можно перенести на картофель.

Мы в данной работе рассматриваем табак как модель для исследования механизмов взаимодействия растений с колорадским жуком и как «плацдарм» для разработки молекулярных методов борьбы с данным вредителем. Препятствием к исследованию механизмов взаимодействия с КЖ является то, что табак не входит в число его кормовых растений. Однако, модификация генома табака с целью сделать листья съедобными для КЖ, могла бы создать линии табака, которые поедаются насекомыми с эффективностью, сравнимой с картофелем. В этом случае полученные линии растений можно было бы использовать в дальнейших исследованиях в условиях лаборатории. По нашему изначальному предположению, основным антифидантным компонентом в листьях табака является никотин. Несмотря на то, что КЖ доста-

точно адаптирован к питанию биомассой, содержащей алкалоиды (включая стероидные алкалоиды ботвы картофеля), никотин отсутствует в картофеле, и его наличие в листьях табака снижает привлекательность их для жука в качестве пищи (Hsiao, Fraenkel, 1968). Недавно было показано, что направленный мутагенез генов семейства *Berberine Bridge-Like* (*BBL*) в табаке приводит к различным качественным и количественным изменениям в содержании алкалоидов в листьях (Schachtsiek, Stehle, 2019; Lewis et al., 2020). Фермент *BBL* представляет собой флавинопротеинсодержащую оксидазу, наиболее вероятно участвующую в заключительной стадии окисления в биохимическом пути синтеза никотина (Kajikawa et al., 2011). В настоящей работе подобный подход был применен для получения растений табака, которые обладали бы повышенной кормовой привлекательностью для колорадского жука. Генетические конструкции, несущие гены нуклеазы Cas9 и направляющую (guide) РНК (нРНК, gRNA), нацеленные на семейство генов *BBL*, были использованы для получения модифицированных растений табака, которые затем скормливали личинкам КЖ. Показано, что личинки КЖ способны питаться листьями модифицированных растений табака. Полученная линия табака может быть использована как модель для экспериментального исследования молекулярно-генетических механизмов устойчивости растений к вредителям.

## Материалы и методы

В качестве исходного материала использовались растения табака *N. tabacum* L. линии SR1. Растения культивировали *in vitro* на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением сахарозы (20 г/л).

Для мутагенеза семейства генов *BBL* были выбраны две нРНК, гомологичные участкам одновременно шести генов (*BBLa*, *BBLb*, *BBLd.1*, *BBLd.2*, *BBLe*) (Schachtsiek, Stehle, 2019). Два выбранных целевых сайта практически идентичны, один расположен со сдвигом в 3 нуклеотида относительно второго (таблица 1).

Для создания вектора, экспрессирующего ген Cas9 и содержащего нРНК, для начала в вектор pAB-M (DNA Cloning Service, Hamburg, Germany) был встроены фрагмент плазмиды pEN-Chimera (Fauser et al., 2014), ограниченный сайтами рестрикции *NcoI* и *SpeI*, содержащий промотор U6-26 *A. thaliana* и химерную нРНК, с образованием вектора pSI55. Параллельно был создан вектор, содержащий промотор гена *UBIQUITIN4-2* петрушки *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss, последовательность гена Cas9 (с кодоновым составом, оптимизированным для *A. thaliana*) и терминальную последовательность гена ре3А гороха *Pisum sativum* L. Для этого, промотор и первая часть гена Cas9 были амплифицированы, используя пару праймеров PromCas F/PromCas R и плазмиду pDe-Cas9 (Fauser et al., 2014) в качестве матрицы, вторая

часть гена Cas9 вместе с терминатором была амплифицирована с использованием праймеров CasTerm F/ CasTerm R (таблица 2). Вектор pAB-M был гидролизован при помощи нуклеазы *SpeI*, и далее была произведена сборка по Гибсону (Gibson Assembly, New England Biolabs GmbH, Ipswich, MA, USA) в соответствии с инструкцией производителя, используя два амплифицированных фрагмента, описанных выше, с образова-

нием плазмиды pSI56. Далее, фрагмент, содержащий последовательность каркаса нРНК, ограниченный сайтами рестрикции *NotI* и *SpeI*, был вырезан из pSI55 и интегрирован в pSI56, в результате чего был получен вектор pSI57 – финальная конструкция, содержащая систему нРНК/Cas9, в которую можно встраивать специфическую часть нРНК в виде двухцепочечного олигонуклеотида с липкими концами по сайтам рестрикции *BbsI*.

**Таблица 1. Последовательности целевых сайтов и нРНК для внесения мутаций в гены семейства *BBL***  
**Table 1. The sequences of target sites and gRNAs for mutagenesis of *BBL* gene family members**

Обозначение нРНК/ gRNA	Структура целевого сайта (подчеркнут PAM) /Target site structure (PAM* is underlined)	Структура нРНК / gRNA structure
<i>BBL1</i>	5'-tatgaaatcagagtaaggtg <u>cg</u> g-3'	5'-tatgaaatcagagtaaggtg-3'
<i>BBL2</i>	5'-gaaatcagagtaaggtg <u>cg</u> g-3'	5'-gaaatcagagtaaggtg-3'

\* – PAM (protospacer adjacent motif) – мотив, связанный с протоспейсером

**Таблица 2. Список праймеров и олигонуклеотидов**  
**Table 2. List of primers and oligonucleotides**

Обозначение/ Designation	Последовательность 5'-3'/Sequence 5'-3'
PromCas F	tagagcccttaagccttaAAAAATTACGGATATGAATATAGGCATATCCG
PromCas R	cgttttctcGTTATCCAAGAAATCCTTATCCTTAATGATCTTG
CasTerm F	cttgataacGAGGAAAACGAGGATATCTTGGAG
CasTerm R	cctgcagccccgggatcaactagtAAGCCTATACTGTACTTAACCTTGATTGC
<i>BBL1_Fwd</i>	attgtatgaaatcagagtaaggtg
<i>BBL1_Rev</i>	aaaccaccttactctgatttcata
<i>BBL2_Fwd</i>	attggaaatcagagtaaggtg
<i>BBL2_Rev</i>	aaaccgcaccttactctgatttc

Каждую из подобранных нРНК интегрировали в вектор pSI57 путем встройки олигонуклеотида, содержащего ее последовательность, по сайту рестрикции *BbsI*. Двухцепочечный олигонуклеотид с липкими концами получали отжигом друг на друга пар одноцепочечных олигонуклеотидов: *BBL1\_Fwd/BBL1\_Rev* и *BBL2\_Fwd/BBL2\_Rev* (см. табл. 2) для нРНК, обозначенных *BBL1* и *BBL2* соответственно.

Стабильную трансформацию табака *N. tabacum* SR1 проводили методом биобаллистики. Готовили смесь из трех генетических векторов, несущих систему нРНК/Cas9, нацеленную на семейство генов *BBL*, и вектор pBII21, несущий ген устойчивости к антибиотику канамицину и ген-репортер бета-глюкуронидазы (*GUS*) *E. coli* (Chen et al., 2003). Смесь ДНК наносили на золотые частицы и доставляли в клетки листовых эксплантов табака при помощи генной пушки (Bio-Rad PDS-

1000 He, размер золотых частиц 1 мкм, разрывной диск 1100 пси (7,6x10<sup>6</sup> Pa), расстояние 6 см, вакуум при выстреле 27 мм рт. ст. (3,6x10<sup>3</sup> Pa)). Трансформированные экспланты помещали в чашки Петри на селективную каллусообразующую среду T1: стандартная среда MC с добавлением 20 г/л сахарозы, 1 мг/л 6-бензиламинопурина, 0,1 мг/л нафталенуксусной кислоты и 100 мг/л канамицина. Полученные каллусы перемещали на среду T2: стандартная среда MC с добавлением 20 г/л сахарозы, 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина без канамицина для органогебеза, затем получали первичные растения-регенеранты. Трансгенность полученных каллусов и регенерантов проверяли методом гистохимического окрашивания с реактивом X-Gluc для выявления активности гена β-глюкуронидазы. Жизнеспособные растения высаживали в гидропонный комплекс для анализа морфологических характеристик и фертильности. Листья расте-

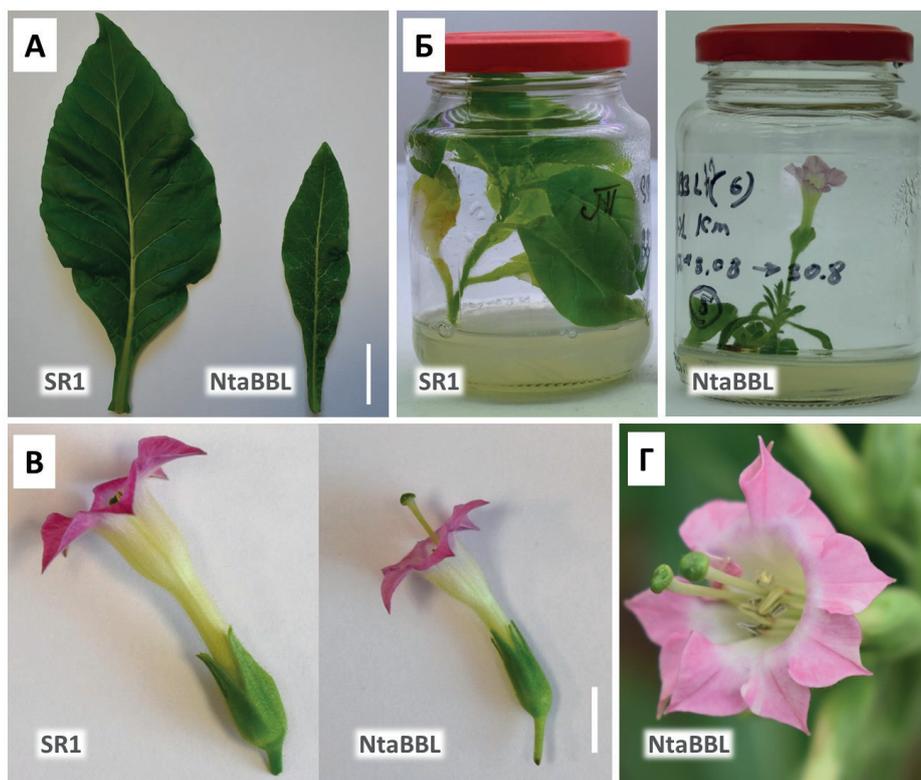
ний из гидропонного комплекса лиофильно высушивали и использовали для анализа содержания никотина. Содержание алкалоидов определяли ранее отработанным методом (Domrachev et al., 2018), позволяющим определить суммарное содержание никотина и норникотина.

Для исследования кормовой привлекательности полученных растений для колорадского жука были использованы листья из культуры *in vitro*. Было использовано три повторности по 15 личинок на каждый вариант. Личинки колорадского жука были отобраны из природно-лабораторной популяции насекомых, содержащихся на растениях картофеля в лаборатории биологической защиты растений и биотехнологий НГАУ. Срезанные листья табака помещали в пластиковую пробирку с водой объемом 1,5 мл, в которой фиксировали их ватой и пленкой Parafilm. Насекомых и листья помещали в чашки Петри. Через 24 часа учитывали смертность насекомых и площадь съеденной листовой пластинки. Площадь повреждения листа насекомыми рассчитывали в процентах от общей площади листа по фотографиям с помощью

программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>). Сравнение активности питания насекомых листьями табака проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (Ordinary one-way ANOVA, Dunnett's multiple comparison test) в программе GraphPad Prizm 8.

## Результаты

С использованием нРНК, которая, по литературным данным, показывает высокую эффективность при мутагенезе генов семейства *BBL* (Schachtsiek, Stehle, 2019), была проведена генетическая трансформация табака и получено 7 каллусов. Из четырех каллусов не удалось получить жизнеспособные растения, из трех оставшихся были получены три популяции регенерантов (NtaBBL), общим числом 72 растения поколения T<sub>0</sub>. Популяции клонов поддерживали черенкованием *in vitro*. Данные популяции отличались друг от друга по фенотипу и демонстрировали различные аномалии развития (рис. 1).



**Рис. 1. Фенотипы растений-регенерантов (NtaBBL) поколения T<sub>0</sub> после модификации с использованием системы Cas9/нРНК, нацеленной на гены семейства *BBL*.**

А: зрелые листья, масштабная линейка соответствует 5 см; Б: пример раннего цветения *in vitro*; В: цветок с удлинённым пестиком, масштабная линейка соответствует 1 см; Г: цветок, образовавшийся в результате слияния двух цветков. SR1 – соответствующий фенотип исходной линии.

**Fig. 1. Phenotypes of regenerated plants (NtaBBL) after modification using the Cas9/gRNA system for mutagenesis of *BBL* gene family members.**

A: mature leaves, scale bar corresponds to 5 cm; B: early flowering *in vitro*; C: flower with longostily, scale bar corresponds to 1 cm; D: flower fusion. SR1 – wild type phenotype.

**Таблица 3. Сравнительный анализ морфологических характеристик полученной линии NtaBBL5-14 и исходной линии SR1**

**Table 3. Comparison of morphological traits in BBL5-14 line and control (SR1)**

Признак/trait	BBL(5)14	SR1
Высота стебля, см/Stem height, cm	70-125	100-130
Количество побегов/Number of shoots	2-4	1-2
Количество узлов/Number of nodes	16-22	9-11
Длина листовой пластины, см/Leaf blade length, cm	230-260	320-340
Ширина листовой пластины, см/ Leaf blade width, cm	80-91	100-185

Среди наблюдаемых отклонений отмечалось угнетение роста и укоренения, увеличение числа междоузлий, раннее цветение, аномалии развития цветка (увеличение количества элементов цветка, лонгостилия) и отсутствие семян. Растения, полученные только из одного из семи исходных каллусов, оказались достаточно жизнеспособными для стабильного поддержания *in vitro* и для роста в условиях гидропонного комплекса. Из данной популяции была выделена линия растений NtaBBL5-14, которая была охарактеризована при выращивании в гидропонном комплексе. В таблице 3 указаны диапазоны наблюдаемых морфологических параметров полученной линии. Растения этой линии, содержащиеся в культуре *in vitro*, были использованы для оценки степени потребления личинками колорадского жука. В качестве контроля были использованы исходные растения линии SR1.

Показано, что личинки колорадского жука питались

листьями табака линии NtaBBL5-14 в десять раз активней, чем листьями табака контрольного варианта (SR1) ( $p < 0.001$ ). В частности, через 24 часа после начала эксперимента процент съеденной площади листьев табака личинками колорадского жука младших возрастов (2-3 возраста) составил  $9 \pm 3\%$  в контроле (SR1) и  $97 \pm 0.5\%$  в варианте с модификациями (NtaBBL5-14). Гибели насекомых не отмечалось в обоих вариантах. Эксперимент продемонстрировал, что листья растений T0 линии NtaBBL5-14, полученные в результате трансформации конструкциями для мутагенеза генов семейства *BBL*, пригодны для питания личинок колорадского жука и полностью съедаются в отличие от листьев исходных растений (рис. 2). При выращивании в гидропонном комплексе растения этой линии достоверно не отличались по суммарному содержанию алкалоидов от исходной линии SR1.



**Рис. 2. Потребление листьев табака личинками колорадского жука второго-третьего возраста через 24 часа после начала кормления**

А: Процент потребления листьев ( $***p < 0.001$  по сравнению с SR1). Б: Вид листьев табака через 24 часа после начала эксперимента. NtaBBL5-14 – полученная в результате модификации линия табака, SR1 – исходный генотип.

**Fig. 2. Consumption of tobacco leaves by Colorado potato beetle larvae within a 24 h period**

А: Percentage of consumed leaf area ( $***p < 0.001$ ); B: Leaves after 24 hrs of feeding experiment. NtaBBL5-14 – modified tobacco line, SR1 – wild type.

В данной работе была получена линия растений табака, пригодная для питания личинок колорадского жука. Несмотря на то, что не удалось зафиксировать достоверного снижения суммарного содержания алкалоидов в листьях полученной линии, модифицированные растения активно поедаются колорадским жуком и потенциально могут быть использованы в дальнейшем как источник корма для этих насекомых. Данный эксперимент показал возможность использования табака для создания модели взаимодействия колорадского жука и растения. Полученная линия модифицированных растений табака NtaBBL5-14 воспроизводится *in vitro* черенкованием и жизнеспособна при пересадке в сосуды с грунтом или в тепличный комплекс, однако неспособна размножаться семенами. В данной работе была использована нРНК, идентичная ранее опубликованной (Schachtsiek, Stehle, 2019), однако, полученные в результате модификации растения-регенеранты отличались сниженной жизнеспособностью и аномалиями развития, чего не было показано ранее. Единственная жизнеспособная линия растений поколения T0 не отличалась от контроля по содержанию суммы алкалоидов при выращивании в гидропонном комплексе, однако демонстрировала выраженные морфологические отличия. Таким образом, результаты, полученные в данной работе, не согласуются с ранее опубликованными, где подобная модификация влияла на содержание алкалоидов в листьях, но не на морфологические признаки растений. Можно предположить, что проводимая модификация имеет сложную природу и приводит к комплексным изменениям метаболизма и регуляции развития. Дальнейшая биохимическая и молекулярная характеристика полученных модифицированных растений табака, в том числе линии NtaBBL5-14, может дать возможность собрать новые данные как о роли отдельных копий генов семейства *BBL* в развитии растений табака, так и о биохимических особенностях растений, пригодных для питания КЖ. Поскольку данный эксперимент не позволил получить линии табака, стабильно размножающиеся семенами, авторы рассматривают возможность мутагенеза других генов метаболизма никотина у табака для создания более устойчивой модели с меньшим плейотропным эффектом. В качестве потенциальных мишеней можно рассматривать гены, кодирующие ключевые ферменты более ранних стадий биосинтеза никотина, например путресцин-N-метилтрансферазы (PMT) и хинолинатфосфорибозилтрансферазы (QPT) (Ivanova et al., 2018). Нетрансгенная, способная к воспроизводству и сохранению фенотипа линия табака, которая может служить кормом для колорадского жука, стала бы идеальной моделью для дальнейших исследований молекулярных механизмов устойчивости растений к вредителю.

*Получение модифицированных линий табака проводили при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-416-543004), исследование на колорадском жуке выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект №19-16-00019) / Generation of modified tobacco lines was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 18-416-543004), and the Colorado potato beetle research was supported by a grant from the Russian Science Foundation (Project No. 19-16-00019).*

## References/Литература

- Alyokhin A., Baker M., Mota-Sanchez D., Dively G., Grafius E. Colorado Potato Beetle Resistance to Insecticides. *American Journal of Potato Research*. 2008;85:395-413. DOI: 10.1007/s12230-008-9052-0.
- Chen P.-Y., Wang C.-K., Soong S.-C., To K.-Y. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. *Molecular Breeding*. 2003;11:287-293. DOI: 10.1023/A:1023475710642
- Domrachev D.V., Egorova A.A., Koloshina K.A., Gerasimova S.V. High-performance liquid chromatography method for the evaluation of alkaloids in *Solanaceae*. (Postanovka metodiki analiza sodержaniya alkaloidov v tkanyakh nekotorykh vidov semeystva paslenovykh metodom vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii.). In: *Joint scientific event "Field Day" within the framework of the FANO of Russia "Development of Potato Breeding and Seed Production" and the scientific conference "Theoretical Foundations and Applied Research in Potato Breeding and Seed Production" (Ob'yedinennoye nauchnoye meropriyatiye "Den' polya" v ramkakh FANO Rossii "Razvitiye selektsii i semenovodstva kartofelya" i nauchnaya konferentsiya "Teoreticheskiye osnovy i prikladnyye issledovaniya v selektsii i semenovodstve kartofelya"): abstracts; 2018 August 1-5; Novosibirsk, Russia. Novosibirsk; 2018. p.15 [In Russian] (Домрачев, Д.В., Егорова, А.А., Колошина, К.А., Герасимова, С.В. Постановка методики анализа содержания алкалоидов в тканях некоторых видов семейства пасленовых методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В кн.: *Объединенное научное мероприятие "День поля" в рамках ФАНО России "Развитие селекции и семеноводства картофеля" и научная конференция "Теоретические основы и прикладные исследования в селекции и семеноводстве картофеля": тезисы докладов, г. Новосибирск, Россия, 1-5 августа 2018 г.* Новосибирск; 2018. С.15). DOI: 10.18699/Potato-2018-11*
- Fauser F., Schiml S., Puchta H. Both CRISPR/Cas-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*. 2014;79:348-359. DOI: 10.1111/tpj.12554
- Hsiao T.H., Fraenkel G. The Role of Secondary Plant Substances in the Food Specificity of the Colorado Potato Beetle. *Annals of the Entomological Society of America*. 1968;61(2):485-493. DOI: 10.1093/aesa/61.2.485
- Ivanova K.A., Spaselikova A.V., Shumny V.K., Gerasimova S.V. The target genes for *Solanaceae* secondary metabolism engineering: evolution and genome organization. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2018;1(1):34-42. [In Russian] (Иванова К.А., Спаселикова А.В., Шумный В.К., Герасимова С.В. Генетические мишени для метаболической инженерии представителей семейства *Solanaceae*: эволюция и структурная организация. *Биотехнология и селекция растений*. 2018;1(1):34-42.). DOI: 10.30901/2658-6266-2018-1-34-42
- Kajikawa M., Shoji T., Kato A., Hashimoto T. Vacuole-Localized Berberine Bridge Enzyme-Like Proteins Are Required for a Late Step of Nicotine Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiology*. 2011;155:2010-2022. DOI: 10.1104/pp.110.170878.
- Lewis R.S., Drake-Stowe K.E., Heim C., Steede T., Smith W., Dewey R.E. Genetic and Agronomic Analysis of Tobacco Genotypes Exhibiting Reduced Nicotine Accumulation Due to Induced Mutations in Berberine Bridge Like (BBL) Genes. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11. DOI: 10.3389/fpls.2020.00368
- Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15:473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Schachtsiek J., Stehle F. Nicotine-free, nontransgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) edited by CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal*. 2019;17:2228-2230. DOI: 10.1111/pbi.13193
- Sierra N., Battey J.N.D., Ouadi S., Bakaher N., Bovet L., Willig A., et al. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nature Communications*. 2014;5:3833. DOI: 10.1038/ncomms4833
- Weber D. Colorado beetle: pest on the move. *Pesticide Outlook*. 2003;14(6):256-259. DOI: 10.1039/b314847p