Геномные технологии

УДК 633.853.55:575.1:577.21

doi: 10.15389/agrobiology.2021.1.20rus

СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПРОМОТОРОВ ГЕНОВ *U6* КЛЕЩЕВИНЫ (*Ricinus communis* L.) И СОЗДАНИЕ НА ИХ ОСНОВЕ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9*

О.С. АЛЕКСАНДРОВ ✉, Г.И. КАРЛОВ

Клещевина — важная сельскохозяйственная культура, которую выращивают во многих странах мира и используют в основном для получения касторового масла, широко применяемого в различных отраслях промышленности. Жмыхи и шроты, которые остаются после отжима масла, богаты белком и перспективны для использования в качестве протеиновых добавок при производстве кормов, однако содержат токсины — белок рицин и алкалоид ричинин. Одним из способов детоксификации клещевины может стать геномное редактирование с помощью системы CRISPR/Cas9. Эта технология заключается в разрезании целевого участка интактной ДНК ферментом Cas9 при содействии короткого направляющего фрагмента РНК. Доставка в клетку редактируемого растения генов, кодирующих Cas9 и направляющую РНК, часто осуществляется с помощью плазмидных векторов. Для эффективного синтеза направляющей РНК в таких векторах обычно используют промоторы генов, кодирующих малые ядерные РНК. При редактировании двудольных растений чаще всего используют промотор *U6* гена арабидопсиса, однако эффективность редактирования повышается, если использовать векторные конструкции с промотором редактируемого растения. В настоящей работе впервые проведена амплификация, секвенирование и анализ промоторов гена *U6* клещевины. Найденные последовательности были проанализированы и использованы в конструировании CRISPR/Cas9 векторов для дальнейшего редактирования генов рицина. Нашей целью было изучение промоторов гена *U6* клещевины с помощью биоинформационных и молекулярно-генетических подходов. В работе использовали растения клещевины (*Ricinus communis* L.) сортов Занзибар Грин и Гибзонская. ДНК выделяли из молодых листьев. Обработку последовательностей, выравнивание и определение степени гомологии проводили в программе GenDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>). Праймеры для амплификации промоторов гена *U6* клещевины подбирали с помощью программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). ПЦР проводили на амплификаторе C-100 («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Продукты ПЦР разделяли в 1,5 % агарозном геле при 6 В/см в камере для горизонтального электрофореза Sub-Cell GT («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Ампликоны очищали с помощью набора GeneJET PCR Purification Kit («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Очищенные ампликоны клонировали с помощью вектора pAL2-T («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. При конструировании CRISPR/Cas9 векторов использовали плазмиду pRGE31, эндонуклеазы рестрикции HindIII и SbfI («Сибэзис», Россия) и необходимые олигонуклеотиды. При вырезании продуктов рестрикции из геля их очищали с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США). Был проведен биоинформационный поиск в базе генетических данных GenBank и обнаружено 12 скаффолдов, содержащих последовательность гена *U6* клещевины. Шесть промоторов, включающих неповрежденные регуляторные элементы USE и TATA-бокс, были использованы при подборе праймеров для амплификации на матрице ДНК клещевины сортов Занзибар Грин и Гибзонская. Продукты ПЦР, состоящие из единичных фрагментов, были клонированы и секвенированы. Анализ полученных последовательностей ампликонов показал, что промоторные области полностью совпадали между сортами. Степень идентичности промоторов из разных ампликонов варьировала в пределах 51–77 %. При сравнении этих же промоторов с промоторами гена *U6* других растений степень гомологии составляла 42–64 %. Последовательности промоторов, содержащие неповрежденные мотивы USE и TATA-бокс, были использованы для конструирования CRISPR/Cas9 векторов, которые могут применяться для эффективного редактирования генов клещевины, участвующих в синтезе рицина и ричинина.

Ключевые слова: клещевина, промотор, *U6* гены, секвенирование, геномное редактирование, CRISPR/Cas9, конструирование векторов.

Клещевина (*Ricinus communis* L.) — это сельскохозяйственное растение семейства Молочайные (*Euphorbiaceae*), культивируемое во многих странах мира. Возделывается в основном ради семян, из которых получают ценный продукт — касторовое масло, используемое в различных отраслях

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, Соглашение от 21 июля 2017 г. № 17-74-10233 по научному проекту: «Адаптация элементов технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 для улучшения генома клещевины обыкновенной (*Ricinus communis* L.)».

народного хозяйства (1). Касторовое масло практически не высыхает и сохраняет свойства в широком диапазоне рабочих температур, поэтому находит применение в системе смазки машин в пищевой промышленности и двигателей для авиамоделирования, а также служит компонентом пластичных смазок (2). В нем содержатся ценные для химического синтеза вещества — ундециленовая и себациновая кислоты, компоненты эпоксидных и алкидных смол и др. В медицине касторовое масло издавна применяется как эффективное слабительное средство (3, 4).

После извлечения масла из семян клещевины остаются богатые протеином остатки — жмыхи и шроты, перспективные для использования в качестве белковых добавок при производстве кормов. Однако в этих остатках содержатся токсичные вещества — белок рицин и алкалоид рицинин (5). Рицин представляет собой кумулятивный яд, обладающий сильным местным прижигающим действием, что приводит к развитию геморрагического гастроэнтерита. После всасывания рицина в кровеносную систему происходит агглютинация и разрушение эритроцитов, возрастает риск тромбозов, изъязвляются стенки сосудов. Кроме того, рицин негативно воздействует на центральную нервную систему, вызывая судороги, парезы и параличи (6). Токсичность рицинина намного меньше, чем у рицина, но его наличие в кормах также нежелательно. Детоксификацию жмыхов и шротов клещевины проводят чаще всего с помощью жестких термических и химических обработок, что значительно ухудшает качество белка. Снижается его переваримость и усвояемость, происходит гидролиз лизина и других дефицитных аминокислот (5). В связи с этим актуален поиск альтернативных подходов к детоксификации жмыхов и шротов клещевины, которые позволили бы отказаться от традиционных обработок.

Несомненный теоретический и практический интерес представляет получение растений клещевины, в которых не вырабатывались бы рицин и рицинин. Для создания таких растений необходимо осуществить нокаут генов, участвующих в синтезе токсинов. Один из эффективных современных способов нокаутирования генов — технология геномного редактирования с помощью системы CRISPR/Cas9. Ее компонентами служат фермент Cas9 и направляющая, или гидовая, РНК (7). Гены фермента Cas9 и направляющей РНК вводятся в клетку с помощью плазмидных векторов под соответствующими промоторами. Для гена гидовой РНК обычно используют промоторы генов малых ядерных РНК *U6* или *U3* (8). При геномном редактировании у однодольных, как правило, используют последовательности *U3* промоторов риса, в случае двудольных — *U6* промоторов арабидопсиса. Однако в ряде работ было показано, что эффективность редактирования возрастает при использовании промоторов редактируемого вида, и их введение в CRISPR/Cas9 векторы стало распространенным трендом (9-13). При изучении промоторов гена *U6* у разных видов было установлено, что они содержат два сайта узнавания РНК-полимеразы III — Upstream Sequence Element (USE) и TATA-бокс (11, 13, 14). Сайт USE имеет консенсусную последовательность RTCCCACATCG. На основе этой последовательности и последовательности самого гена *U6* арабидопсиса C. Marshallsay с соавт. (14) предложили систему праймеров для амплификации промоторов гена *U6*. Эти праймеры пригодны для изучения промоторов гена *U6* у других видов, геном которых еще не секвенирован.

На сегодняшний день секвенированы геномы ряда представителей семейства *Euphorbiaceae* (*Jatropha curcas*, *Manihot esculentum*, *Hevea brasiliensis*, *Euphorbia esula*), в том числе и геном клещевины (15-19). Также секвенированы и изучаются кодирующие рицин последовательности (20-23). Они не

содержат интронов, поэтому с них транслируется большой прекурсор, называемый препроприцин, который содержит сигнальный пептид и цепи рибина А и В, разделенные линкерным пептидом из 12 аминокислот (20). Наиболее подходят в качестве мишеней для редактирования части, кодирующие сигнальный пептид или начало цепи А (23, 24).

В настоящей работе впервые проведена амплификация, секвенирование и анализ промоторов гена *U6* клещевины. Найденные последовательности проанализированы и использованы в конструировании CRISPR/Cas9 векторов для дальнейшего редактирования генов рибина.

Нашей целью было изучение промоторов гена *U6* клещевины с помощью биоинформационных и молекулярно-генетических подходов.

Методика. В работе были использованы растения клещевины сортов Занзибар Грин («Гавриш», Россия) и Гибзонская («Гавриш», Россия).

ДНК выделяли из молодых листьев клещевины согласно методике J.J. Doyle с соавт. (25) с некоторыми модификациями (26). Обработку последовательностей, выравнивание и определение степени гомологии проводили в программе GenDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>).

Праймеры для амплификации промоторов гена *U6* клещевины подбирали с помощью программы Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Условия ПЦР на амплификаторе C-100 («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) были следующими: 5 мин при 95 °C; 30 с при 95 °C, 30 с при 50 °C, 1 мин при 72 °C (35 циклов); 10 мин при 72 °C (терминальная элонгация).

Продукты ПЦР разделяли в 1,5 % агарозном геле при 6 В/см в камере для горизонтального электрофореза Sub-Cell GT («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Результаты электрофореза визуализировали с помощью системы гель-документирования Gel Doc™ XR+ («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Ампликоны очищали с использованием набора GeneJET PCR Purification Kit («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США).

Очищенные ампликоны клонировали с помощью вектора pAL2-T («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя.

При конструировании CRISPR/Cas9 векторов использовали плазмиду pRGE31, эндонуклеазы рестрикции HindIII и SbfI («Сибэнзим», Россия) и необходимые олигонуклеотиды. При вырезании продуктов рестрикции из геля проводили очистку с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo Fisher Scientific, Inc.», США).

Результаты. В базе генетических данных GenBank было обнаружено 12 скаффолдов, содержащих последовательность гена *U6* клещевины, — AASG02000063, AASG02000163, AASG02000719, AASG02001323, AASG02002949, AASG02003223, AASG02003842, AASG02006600, AASG02019053, AASG02021200, AASG02020516, AASG02025904. Однако характерные USE и TATA элементы были выявлены в промоторной области гена *U6* только у шести из этих скаффолдов — AASG02021200, AASG02020516, AASG02006600, AASG02000719, AASG02025904, AASG02002949. Сравнение полученных результатов и результатов поиска промоторов гена *U6*, имеющих USE и TATA-элементы, в геномах других представителей семейства *Euphorbiaceae* показало, что их количество может быть разным. В геномах *Jatropha curcas* и *Manihot esculentum* (сорт W14) так же, как и у клещевины, имеется 6 таких промоторов, однако у *Hevea brasiliensis* и *Euphorbia esula* их больше (соответственно 9 и 23).

Последовательности скаффолдов AASG02021200, AASG02020516, AASG02006600, AASG02000719, AASG02025904, AASG02002949, а также одного скаффолда без USE и TATA-элементов AASG02000063 использовали для подбора праймеров (табл. 1) и последующей амплификации

фрагментов, содержащих up-stream область соответствующих генов *U6* (рис. 1). Во всех случаях, кроме AASG02000063, амплифицировались единичные фрагменты ожидаемой длины (ампликоны Rc200, Rc516, Rc600, Rc719, Rc904 и Rc949). Поскольку в случае с AASG02000063 помимо целевого амплифицировались еще два дополнительных фрагмента, этот вариант up-stream области далее не изучался. Единичные фрагменты остальных вариантов были клонированы и секвенированы.

1. Праймеры, подобранные для амплификации промоторной области гена *U6* у анализируемых скаффолдов клещевины (*Ricinus communis* L.)

Праймер	Последовательность	Скаффолд	Ампликон	Длина ампликона, п.н.
RcU6-200f	5'-TGGATAAGAGGAGATTCTTGAATTG-3'	AASG02021200	Rc200	392
RcU6-200r	5'-AGGGGGCCATGCTAATCTTCT-3'			
RcU6-516f	5'-GTTGGCAGCCTTCAGATTTC-3'	AASG02020516	Rc516	590
RcU6-516r	5'-AGGGGGCCATGCTAATCTTCT-3'			
RcU6-600f	5'-CTCCGAATTATATTTGGGGTTTT-3	AASG02006600	Rc600	280
RcU6-600r	5'-AAAAATTTGGACCATTCTCTCG-3'			
RcU6-719f	5'-ACCTGTGAGGTGGCTTTCTG-3'	AASG02000719	Rc719	346
RcU6-719r	5'-CGGTGTCTGTTTGCCCTAAT-3'			
RcU6-904f	5'-AGCCCATTTTGGGGTGTAT-3'	AASG02025904	Rc904	512
RcU6-904r	5'-AGGGGGCCATGCTAATCTTCT-3'			
RcU6-949f	5'-TTCTGGGAGGTATGCATCAA-3'	AASG02002949	Rc949	401
RcU6-949r	5'-AAAAATTTGGACCATTCTCTCG-3'			
RcU6-063f	5'-CAACCCGACTCCTTCATCAT-3'	AASG02000063	Rc063	584
RcU6-063r	5'-AGGGGGCCCTACTTTGATACC-3'

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации на матрице ДНК клещевины (*Ricinus communis* L.) сортов Занзибар Грин (1-7) и Гибзонская (8-14) при использовании праймеров, подобранными для амплификации промоторной области гена *U6*: 1 и 8 — Rc600f/Rc600r, 2 и 9 — Rc904f/Rc904r, 3 и 10 — Rc949f/Rc949r, 4 и 11 — Rc063f/Rc063r, 5 и 12 — Rc516f/Rc516r, 6 и 13 — Rc200f/Rc200r, 7 и 14 — Rc719f/Rc719r; M — маркер молекулярных масс с шагом 100 п.н. (100 bp DNA Ladder, M-214S, «Jena Bioscience GmbH», Германия).

2. Степень гомологии (%) между шестью выбранными промоторами *U6* генов клещевины (*Ricinus communis* L.)

Промотор	Rc200ZG	Rc516ZG	Rc600ZG	Rc719ZG	Rc904ZG	Rc949ZG
Rc200ZG	100	56	53	77	57	50
Rc516ZG		100	63	57	67	62
Rc600ZG			100	54	63	54
Rc719ZG				100	53	51
Rc904ZG					100	59
Rc949ZG						100

Анализ последовательностей ампликонов, полученных у сортов Занзибар Грин (Rc200ZG, Rc516ZG, Rc600ZG, Rc719ZG, Rc904ZG, Rc949ZG) и Гибзонская (Rc200Gib, Rc516Gib, Rc600Gib, Rc719Gib, Rc904Gib, Rc949Gib), показал, что у этих сортов промоторные области полностью совпадали между собой, а также с соответствующими последовательностями в скаффолдах AASG02021200, AASG02020516, AASG02006600, AASG02000719, AASG02025904, AASG02002949. Однако вне промоторных областей, содержащих регуляторные элементы, было обнаружено два полиморфных сайта: G/A замена в положении –228 от начала гена *U6* у ампликона Rc200Gib и T/A замена в положении –351 от начала гена *U6* у Rc904Gib. Очевидно, что изучаемые промоторные области достаточно консервативны у сортов одного вида.

3. Нуклеотидные последовательности случайно выбранных промоторов у видов растений из разных семейств, использованные для оценки степени гомологии между ними и шестью промоторами *U6* генов клещевины (*Ricinus communis* L.)

Шифр	Последовательность	GenBank acc. no.	Первый нуклеотид	Последний нуклеотид
abrus1	5'-GCCCCACATCGAACAGTATTATCAAAGCATGACACAATATATAGCAAAAGAAACACGCAGAGAGT-3'	XM_027482675	708	644
arachis1	5'-GTACCACATCGAGTAGCATCATATAAAGCTCTGACAATATATATAGCAGAGGGTGCAAGAAAGGCTC-3'	XM_025790263	575	511
arachis2	5'-GTCCACATCGCTTAGTATCAGACCCTCTGACAGAATATATATCAAAGGAAACACAAAAGGCTC-3'	XR_003810923	117	181
arachis4	5'-GTCTCACATCGCCCGAGTTTGTAGAAACCAATACTTATATATCAGAGGGCGAAGCAAGGCTC-3'	XM_025845620	218	281
bras_ol1	5'-GTCCACATCGCTCAGGTGAAGGAGAAGGAGCTGCGTTTATATAGCGATGAAGTCACGAAAGTGATT-3'	LR031877	48176336	48176271
bras_rap1	5'-CTCCACATCGCTCAGCGAAGCAAAAGAAGCTCTGTTTATATACTTTACAGAGTCAAGAAAGATGATT-3'	LR031575	1103139	1103205
bras_rap2	5'-CTCCACATCGTTTATCAGAGAAGCAGAAGCCGAGTTTATATAGGGACGGAGTGACGAAGGAGATT-3'	LR031575	1143184	1143119
cicer1	5'-GTCCACATCGAATACATGTATCCCATTTTCCATATTTATATAACGCAGGTTAACCATGTCAGTAT-3'	CP039335	30486401	30486452
cicer2	5'-GTCCACATCGAATACATTTATCCCTTTTCCGTTATTTATATAACGCAGGTTAACCATGGAGTTT-3'	CP039335	30494676	30494740
cicer3	5'-GTCCACACCGAATCATCTATCATTTTTCGCTTTTATATAACCCATGTTAATCATTAGGTTT-3'	CP039335	30512524	30512587
cicer4	5'-GTCCACATCGTCTAAATATTCGAATATTTAATATTTATATAACAATGTTTCGAGCAGTATAGTAT-3'	CP039333	18318744	18318807
cicer7	5'-GTCCACACCGGTACGCATAACATGTGTTTCAGTGTTTATAATACCCCTCGCACACATCATCAAC-3'	CP039333	31682334	31682398
cicer8	5'-GTTCCACATCGTCTACATCTATCATTTTTCGCTTTTATATAACCCATGAGCCGCAATGAAGGCTT-3'	CP039333	39009683	39009747
cichorium1	5'-CGTCCATACCGACAGTAAAGTACTTCCCGTCGCTTATATAGCGCAGCTCGGCGACTATCATC-3'	MK455779	235	299
cichorium2	5'-GTCCCATACCGACAGTAAAGTACTTCCCGTCGCTTATATAGCGCAGCTCGGCGACTATCATC-3'	MK455779	236	299
cichorium3	5'-TTCCACATCGCTCTTTGAAGCAACATCGCCATGCTTTATATAGCTTGGCTTCCAAACATATATC-3'	MK455773	235	299
cichorium4	5'-TTCCACATCGATGATTGAAACGATTCTCGGTGTTTATATAGCCTGGCTTCCAAATCAATATC-3'	MK455776	238	302
cichorium5	5'-CTCCACATCGATGATCGGAACGGTGTGTTTCGTCCTTATATAGCTCGGGTTCCAACCATTTATC-3'	MK455775	238	302
citrullus1	5'-GTCCACATCGGTAAAGTTTGTATCTAGTTTACGCTTTATATACTAAGACTGCAGTACAAGGCTT-3'	VOOL01000005	2250542	2250477
cynara1	5'-AATCCACATCGCCTTTAACGATATCCAGTGCTAGCTTTATATGGCGGAGGTCGGCAGCTAAGATC-3'	XR_003069239	1	65
goss_aim1	5'-ATCCCATATCGCTAAAGAACTATAACACAGGAGCGTTTATATAAGCGAAAGAAGCAGCAAATGATT-3'	CP032562	3130166	3130101
goss_aim2	5'-ATCCCATATAGCTAAAGAAATTAGGAAAAATTTATTGTTTATAAAGGCAAGGAAGAACTATTATT-3'	CP032562	3328533	3328468
goss_aim3	5'-ATCCCGCATCGCTAAAGAAATTGAAAAAATTTATTGTTTATATAGGAAAAACAAGCTGACTATGATT-3'	CP032562	3351518	3351452
goss_aim4	5'-ATCCCGCATCGCTAAAGAAATTGAAAAAATTTATTGTTTATATAGGAAAAACAAGCTGACTATGATT-3'	CP032562	3351518	3351452
gossipoides1	5'-ATCCCATATCGCTAAAGAACTAAAAATGCGCAAGTATTTTATATAAGCGAAAGAAACAGCATTAGTGT-3'	CP032252	2333488	2333423
gossipoides2	5'-ATCCCATATTGCTAAAGAAATTAACAATACTATTGTTTATATAGGCAAAAGAAACACCGTAGCAGT-3'	CP032252	2341665	2341600
gossipoides3	5'-ATCCCATATCTCTAAAGAAATTAACAACTACTATTGTTTATATAGGCAAAAGAAAGCAGCGTTGATT-3'	CP032252	2343934	2343869
ipomea1	5'-CTCCACATCGGGCGATGAAGCAGCTCTCTCCAGTACACATACTCCGCCATTGGAAGAAGAAGAAC-3'	CP025668	7620112	7620047
ipomea2	5'-CTCCACATCGGCCAATGAGCCATCTTACTTCCAGTACATATACTCCGCCATGGAAGCTCTTATC-3'	XR_004100417	33	97
ipomea3	5'-CTCCACATCGGGCTGATGAACAACCTTGCTCCAGTATACATACTCTATCATGGAAGCACTGAGC-3'	XM_031272161	1	65
ipomea4	5'-GTCCACATCGGCCAATGAGCCATCTTACTTCCAGTACATATACTCCGCCATTGGAAGCACTTATG-3'	CP025668	7980996	7981060
ipomea5	5'-TTCCACATCGGGCGATGAAGCAGCTCTCTCCATTACACATACTCCGCCATTGAGGAAGGAGAAT-3'	CP025668	7984209	7984274
lotus1	5'-GTCCACACCGGATAAACATACAGAAATATGAGTGTTTATAAGCAAATAGTCAGCAATAAGGTTT-3'	AP010923	70411	70347
lotus2	5'-GTCCACATCGGCTATGTTGATTAAGATTTTATAGTTTATATCTACTACAGAACCAAGTATT-3'	AP010923	68417	68353
tea1	5'-GTCCACATCGAACTTCGACGTTATAGACATGGAAGTTTATAAGAAAGAAAGAGAAAGACGTT-3'	XR_003649102	150	215
tomato1	5'-CTCCCTCATCGCTTACAGAAAAAGCTATATGCTGTTTATATGCGAAATCTAACAGTGTAGTTT-3'	XM_004230407	25	89
tomato2	5'-CTCCCTCATCGCTTACAGAAAAAGCTATATGCTGTTTATATGCGAAATCTAACAGTGTAGTTT-3'	XS1447	198	261
vigna1	5'-GTCCACATCGTCCAAACATGTCAACCTCCATGTTTAAAAACGCACGCTACTCGCTGCTGTT-3'	CP039354	53496613	53496677
vigna2	5'-GTCCACACCGTATACTTTCACTAGAGGTTTAGTGTTTATATAGATACAGACTGCATCCAAGCTT-3'	CP039350	33742544	33742608

Похожая ситуация наблюдается и у сортов маниока AM560-2 и KU50. Промоторные области генов *U6* из их скаффолдов LTU101019634 (нуклеотиды 16035-16336) и JPQF01078381 (нуклеотиды 1216-1517), а также LTU101021841 (нуклеотиды 27091-27392) и JPQF01070438 (нуклеотиды 16559-16860) полностью совпадают.

Сравнение секвенированных промоторов генов *U6* клещевины между собой показало среднюю гомологию, варьирующую в пределах 51-77 % (табл. 2). Сравнение этих же промоторов со случайно выбранными промоторами генов *U6* ряда других случайно выбранных видов растений из разных семейств демонстрировало сходные показатели степени гомологии — 42-64 % (табл. 3, 4).

4. Степень гомологии (%) между шестью выбранными промоторами *U6* генов клещевины (*Ricinus communis* L.) и случайно выбранными промоторами *U6* генов других видов растений из разных семейств

Шифр	Промотор					
	Rc200ZG	Rc516ZG	Rc600ZG	Rc719ZG	Rc904ZG	Rc949ZG
abrus1	48	53	56	46	60	62
arachis1	52	53	57	47	55	49
arachis2	54	57	57	51	56	58
arachis4	54	54	63	52	49	54
bras_ol1	53	54	57	48	52	53
bras_rap1	54	55	57	56	54	52
bras_rap2	45	54	54	46	52	54
cicer1	56	54	53	53	55	52
cicer2	58	52	53	57	55	49
cicer3	59	53	50	54	51	46
cicer4	50	56	59	53	56	55
cicer7	47	64	53	50	50	55
cicer8	51	57	58	54	55	55
cichorium1	42	47	55	45	47	50
cichorium2	43	48	55	46	48	51
cichorium3	55	53	50	52	49	52
cichorium4	49	48	50	51	50	45
cichorium5	55	51	54	55	47	44
citrullus1	57	60	59	58	56	59
cynara1	52	55	63	55	56	51
goss_raim1	48	62	57	51	61	59
goss_raim2	47	58	53	50	58	56
goss_raim3	51	61	50	52	65	63
goss_raim4	50	46	50	52	65	63
gossipioides1	49	55	57	54	62	58
gossipioides2	51	60	54	51	62	61
gossipioides3	52	60	57	52	60	60
ipomea1	42	52	47	46	44	47
ipomea2	48	58	52	44	50	49
ipomea3	46	58	54	43	52	52
ipomea4	50	58	51	48	48	49
ipomea5	45	52	47	43	47	47
lotus1	46	55	58	52	63	59
lotus2	59	59	62	59	56	58
tea1	57	53	56	58	57	58
tomato1	48	47	53	48	53	51
tomato2	48	47	53	47	52	50
vigna1	52	60	57	46	53	52
vigna2	55	66	56	53	61	55

Во многом выявленное сходство обеспечивалось наличием достаточно консервативных USE и TATA элементов, в то время как гомология остальных участков была низкой (рис. 2).

Анализ последовательностей USE у изученных промоторов показал, что у клещевины имеется несколько вариантов этого регуляторного элемента: вариант А (GAACCACATCG) из ампликонов AASG02021200ZG и AASG02021200Gib, вариант В (A-CCCACATCG) из ампликонов AASG02020516ZG и AASG02020516Gib, вариант D (AT-CCACATCG) из

ампликонов AASG02000719ZG и AASG02000719Gib. В остальных трех случаях мотивы USE (C, E и F, см. рис. 2) соответствовали консенсусной последовательности RTCCCACATCG арабидопсиса.

Рис. 2. Выравнивание вариантов промоторов гена *U6* клешиевы (*Ricinus communis* L.): А — промотор из ампликонов AASG02021200ZG и AASG02021200Gib, В — из ампликонов AASG02020516ZG и AASG02020516Gib, С — из ампликонов AASG02006600ZG и AASG02006600Gib, D — из ампликонов AASG02000719ZG и AASG02000719Gib, Е — из ампликонов AASG02025904ZG и AASG02025904Gib, F — из ампликонов AASG02002949ZG и AASG02002949Gib. Красным цветом выделены варианты USE, которые совпадают с консенсусной последовательностью RTCCCACATCG арабидопсиса. Зеленым цветом выделена часть гена *U6*, которая амплифицируется с праймера Oligo3 (14).

На основании найденных промоторов генов *U6* клешиевы были созданы векторные конструкции для проведения CRISPR/Cas9 редактирования гена ризина.

При конструировании CRISPR/Cas9 векторов использовали плазмиду pRGE31, содержащую ген *Cas9* под CaMV 35S промотором, а также конструкцию для синтеза гидовой РНК: U3 промотор риса (*OsU3*), мотив из двух разнонаправленных сайтов эндонуклеазы рестрикции Bso31I (для встраивания сайта-мишени после гидролиза плазмиды этим ферментом, 2xBso31I) и последовательность, кодирующую часть гидовой РНК, которая взаимодействует с белком Cas9 (gRNAgene).

В первую очередь вели поиск сайтов для эндонуклеаз рестрикции в исходной плазмиде pRGE31 с таким расчетом, чтобы один сайт находился перед началом промотора U3, а второй — после него. В то же время оба сайта должны были отсутствовать внутри конструкции, которой предстояло лигироваться с pRGE31. В итоге были выбраны сайты HindIII и SbfI. Поскольку участок между ними полностью вмещал в себя конструкцию OsU3-2xBso31I-gRNAgene, то необходимо было синтезировать последовательность вставки, включающую 2xBso31I-gRNAgene под соответствующим промотором клешиевы.

5. Олигонуклеотиды, использованные при создании и тестировании CRISPR/Cas9 векторов с промоторами гена *U6* клещевины (*Ricinus communis* L.)

Праймер	Последовательность праймера
Олигонуклеотиды для синтеза двуцепочечных конструкций RcU6(n)-2xBso3II-gRNAgene	
forward-A	5'-GAACCACATCGATTGTTGTAGCTTTTGAATTCTTTATATGAATTAGGGCAAACAGCTGGTTGGGGAGACCGAGGTCTCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3'
forward-B	5'-AACCCACATCGTCTAGTTACGCATAACTTTAGAGTTTATAAACGCCTACAAGCAAGCACCATGCTGGAGACCGAGGTCTCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3'
forward-C	5'-GTCCACATCGTCTGGTTACGTGAGACTAATGATCCTTATATGCAAACGGGAGGCAGCATGATGCTGGAGACCGAGGTCTCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3'
forward-D	5'-AATCCACATCGGTTATTTGTCGGTCTTTAGAAGTCTTTATATGAATTAGGGCAAACAGACACCGTTGGAGACCGAGGTCTCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3'
forward-E	5'-ATCCACATCGTTTAGTTACATAAAATATTAGACTTTATAAGAAAATCAAGCTAGCTTCTGAAGTGGAGACCGAGGTCTCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3'
forward-F	5'-ATCCACATCGACAAGGAATACAAATTTAAAACGGTTTATAAGTAAACAAAAACGACATGCTACTGGAGACCGAGGTCTCGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3'
reverse	5'-AAAACAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'
Олигонуклеотиды для введения в RcU6(n)-2xBso3II-gRNAgene сайтов рестрикции	
HindIII-A	5'-AAGCTTGAACCACATCGATTTC-3'
HindIII-B	5'-AAGCTTAACCCACATCGTCTA-3'
HindIII-C	5'-AAGCTTGTTCCACATCGTCTG-3'
HindIII-D	5'-AAGCTTAATCCACATCGGTTA-3'
HindIII-E	5'-AAGCTTATCCACATCGTTTA-3'
HindIII-F	5'-AAGCTTATCCACATCGACAA-3'
SbfI-reverse	5'-CCTGCAGGAAAACAAAAAGCAC-3'
Олигонуклеотиды для проверки векторов	
35Spr-F	5'-CTATCCTTCGCAAGACCTTC-3'
Amp-R	5'-ATAATACCGCGCCACATAGC-3'
pBR322ori-F	5'-GGGAAACGCCTGGTATCTTT-3'

Для этого были синтезированы 6 олигонуклеотидов (forward-n), содержащих RcU6(n)-2xBso31I-(20bp)gRNAgene, где n — соответствующий вариант промотора U6 клешиевины, (20bp)gRNAgene — первые 20 нуклеотидов, кодирующие начало части гидовой РНК, которая взаимодействует с белком Cas9 (табл. 5). Кроме того, был синтезирован олигонуклеотид, обратный gRNAgene (reverse). После одного цикла ПЦР (5 мин при 95 °C, 30 с при 50 °C, 10 мин при 72 °C) для каждого из олигонуклеотидов forward с олигонуклеотидом reverse были получены двуцепочечные последовательности RcU6(n)-2xBso31I-gRNAgene. Такой подход был выбран как более экономичный по сравнению с полным синтезом прямых и обратных конструкций RcU6(n)-2xBso31I-gRNAgene. К тому же он позволял осуществлять экономичный синтез конструкций с любым другим промотором при замене только прямого олигонуклеотида.

Введение в последовательность вставки сайтов рестрикции HindIII и SbfI осуществляли с помощью ПЦР. Амплификацию проводили с праймерами, подобранными на бордеры конструкций RcU6(n)-2xBso31I-gRNAgene и имеющими соответствующие сайты рестрикции в 5'-области (см. табл. 5). Продукты ПЦР очищали, клонировали в АТ-векторе pAL2-T и секвенировали для проверки на отсутствие ошибок синтеза. После обработки плазмиды pRGE31 и плазмид pAL2-T с конструкциями RcU6(n)-2xBso31I-gRNAgene эндонуклеазами рестрикции HindIII и SbfI продукты разделяли с помощью электрофореза и вырезали целевые фрагменты. Очищенные фрагменты лигировали и использовали для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli*. Отбор клонов проводили методом ПЦР с праймерами, подобранными на бордеры конструкций RcU6(n)-2xBso31I-gRNAgene. Выделенные из отобранных клонов плазмиды тестировали с помощью эндонуклеаз рестрикции HindIII (линеризует целевую плазмиду) и Bso31I (не расщепляет целевую плазмиду), после чего секвенировали с использованием праймеров на вставку (SbfI-reverse) и на ключевые регионы — ген Cas9 (35Spr-F), ген устойчивости к ампициллину (*Amp^r*), ori (pBR322ori-F) (см. табл. 5).

В дальнейших экспериментах созданные векторные конструкции будут сравниваться по эффективности между собой и с векторами, содержащими промотор гена *U6* арабидопсиса. Проведение таких экспериментов целесообразно, поскольку на картофеле, например, было показано увеличение выхода мутантных форм при замене промотора для гена направляющей РНК с AtU6 (U6 промотор *Arabidopsis thaliana*, GenBank accession no. X52527.1) на StU6 (U6 промотор *Solanum tuberosum*, GenBank accession no. Z17290.1) в 2 раза (9).

К таким же выводам пришли L. Long с соавт. (11) в работе по оптимизации технологии CRISPR/Cas9 геномного редактирования хлопка. Экспрессия гидовой РНК при включении в векторную конструкцию CRISPR/Cas9 эндогенного промотора хлопка GhU6.3 (U6 промотор *Gossypium hirsutum*) вместо промотора AtU6-29 (U6 промотор *Arabidopsis thaliana*) увеличивалась в 6-7 раз. В результате эффективность внесения мутаций системой CRISPR/Cas9 повышалась в 4-6 раз (11). В свою очередь, X. Sun с соавт. (10) получили схожие результаты при сравнении эндогенных и экзогенных промоторов в кассетах CRISPR/Cas9 для редактирования генома сои. Установлено, что степень экспрессии гидовой РНК под эндогенным промотором GmU6 (U6 промотор *Glycine max*) была в 2 раза выше, чем под экзогенным промотором AtU6-26 (U6 промотор *Arabidopsis thaliana*). Эффективность редактирования генов в первом случае варьировала в пределах 14,7-20,2 %, во втором — 3,2-9,7 % (10). Приведенные результаты,

полученные при редактировании у неродственных видов растений из разных семейств, наглядно демонстрируют преимущества использования эндогенных промоторов в векторах CRISPR/Cas9. Однако важны сравнения не только эндогенных промоторов с экзогенными, но и эндогенных промоторов друг с другом. В нашей работе были найдены различные промоторы U6 клещевины, которые имеют необходимые для нормального функционирования регуляторные элементы USE и TATA, и целесообразно будет провести их сравнение между собой в экспериментах по редактированию у клещевины, так как ранее отмечалось, что не все эндогенные промоторы одинаково эффективны в управлении экспрессией генов (27-30).

Таким образом, в геноме клещевины имеется шесть промоторов генов U6 с регуляторными элементами USE и TATA. Секвенирование найденных промоторов у сортов Занзибар Грин и Гибзонская показало их высокую консервативность. Между собой эти промоторы имеют средний уровень гомологии, как и с промоторами других видов. В найденных промоторах были обнаружены USE-элементы, которые как соответствуют (у трех промоторов), так и не соответствуют (у трех других промоторов) консенсусной последовательности USE-элемента арабидопсиса. Сконструированные на основе найденных промоторов U6 клещевины CRISPR/Cas9 станут ценными инструментами для дальнейших экспериментов по геномному редактированию генома этого вида и определению эффективности различных промоторов для синтеза направляющей РНК.

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
биотехнологии,

127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: olegsandrov@gmail.com ✉, karlov@gmail.com

Поступила в редакцию
13 июля 2020 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2021, V. 56, № 1, pp. 20-31

SEQUENCING OF THE U6 PROMOTERS IN CASTOR BEANS AND VECTOR CONSTRUCTION FOR CRISPR/Cas9 GENOMIC EDITING ON THEIR BASIS

O.S. Alexandrov ✉, G.I. Karlov

All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail olegsandrov@gmail.com (✉ corresponding author), karlov@gmail.com

ORCID:

Alexandrov O.S. orcid.org/0000-0002-7146-4094

Karlov G.I. orcid.org/0000-0002-9016-103X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported by the Russian Science Foundation, Agreement No. 17-74-10233 dated July 21, 2017 on the scientific project "Adaptation of the CRISPR/Cas9 genomic editing technology elements to improve a castor bean (*Ricinus communis* L.) genome"

Received July 13, 2020

doi: 10.15389/agrobiol.2021.1.20eng

Abstract

Castor bean is an important crop in many countries. It is mainly used to obtain the castor oil, which is widely applied in various industries. The rich protein cakes and meals are remains after the oil is pressed. They are promising for use as protein additives in the fodder production. However, it is limited due to the presence of toxins. These are ricin protein and ricinine alkaloid. One of such methods can be genomic editing using the CRISPR/Cas9 system. The technology consists in cutting the target region of the intact DNA by the Cas9 enzyme with the assistance of a short guide RNA fragment. The delivery of the Cas9 and guide RNA genes into the cell of the edited plant is often carried out by plasmid vectors. For efficient synthesis of the guide RNA in such vectors, the promoters of small nuclear RNA genes are usually used. In dicotyledonous plants editing, the promoter of the *Arabidopsis* U6 gene is most often used. In this work, the amplification, sequencing and analysis of the castor bean U6 promoters were carried out at the first time. The obtained sequences were analyzed and used in the construction of CRISPR/Cas9 vectors for the ricin gene editing. Our aim was to study castor bean U6 promoters with help by bioinformatics and molecular genetic approaches. Zanzibar

Green and Gibzonskaya varieties of castor bean plants were used in this work. DNA was isolated from young leaves. The preparation of sequences, alignments and homology level calculation were carried out by GenDoc program (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html>). Primers for amplification of castor bean U6 promoters were designed by Primer3 program (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). PCR was performed using a C-100 PCR machine (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). PCR products were separated in 1.5 % agarose gel at 6 B/cm in the Sub-Cell GT electrophoresis camera (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). The amplicons were purified with the GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). The purified amplicons were cloned into the pAL2-T vector (Evrogen, Russia) according to protocol of manufacturer. In the CRISPR/Cas9 vector construction, the pRGE31, HindIII and SbfI restriction enzymes (Sibenzyme, Russia) and nucleotides were used. Purification of the digested products was carried out with the GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). Bioinformatic search were conducted in the GenBank base, and 12 scaffolds with the castor bean U6 gene were found. Six promoters with intact USE and TATA-box elements of regulation were used in the primer design for amplification with cv. Zanzibar Green and cv. Gibzonskaya DNA matrices. One fragment PCR products were cloned and sequenced. The analysis of the obtained amplicon sequences revealed that promoter regions of two studied varieties were similar. The level of promoter identity from different amplicons ranged within 51-77 %. In comparison of these promoters with ones from other plants, the level of homology was 42-64 %. The promoter sequences with intact USE and TATA-box motifs were used in construction of the CRISPR/Cas9 vectors which can be used for efficient editing of the castor bean genes involved in the ricin and ricinine synthesis.

Keywords: castor beans, promoter, U6 gene, sequencing, genome editing, CRISPR/Cas9, vector construction.

REFERENCES

1. Moshkin V.A. *Kleshchevina* [Castor beans]. Moscow, 1980 (in Russ.).
2. Aznaur'yan M.P., Eloshvili N.G., Nazarov N.V., Yakubovich H.H., Meshcheryakov C.B., Girsin Yu.A. *Izvestiya vuzov, Pishchevaya tekhnologiya*, 1993, 1-2(212-213): 87-89 (in Russ.).
3. Naughton F.C. Production, chemistry and commercial applications of various chemicals from castor oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1974, 51(3): 65-71 (doi: 10.1007/BF00000015).
4. Shul'pekova Yu.O. *Prilozhenie RMZH «Bolezni organov pishchевareniya»*, 2006, 8(2): 90-96 (in Russ.).
5. Anandan S., Kumar G.K.A., Ghosh J., Ramachandra K.S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal Feed Science and Technology*, 2005, 120(1-2): 159-168 (doi: 10.1016/j.anifeedsci.2004.10.002).
6. Gusynin I.A. *Toksikologiya yadovitykh rastenii* [Toxicology of poisonous plants]. Moscow, 1962 (in Russ.).
7. Ishino Y., Krupovic M., Forterre P. History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of Bacteriology*, 2018, 200(7): e00580-17 (doi: 10.1128/JB.00580-17).
8. Zlobin N.E., Ternovoi V.V., Grebenkina N.A., Taranov V.V. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii*, 2017, 21(1): 104-111 (doi: 10.18699/VJ17.228) (in Russ.).
9. Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Fält A.S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Reports*, 2017, 36(1): 117-128 (doi: 10.1007/s00299-016-2062-3).
10. Sun X., Hu Z., Chen R., Jiang Q., Song G., Zhang H., Xi Y. Targeted mutagenesis in soybean using the CRISPR-Cas9 system. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10342 (doi: 10.1038/srep10342).
11. Long L., Guo D.D., Gao W., Yang W.W., Hou L.P., Ma X.N., Miao Y.C., Botella J.R., Song C.P. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression. *Plant Methods*, 2018, 14: 85 (doi: 10.1186/s13007-018-0353-0).
12. Yan P.U., Chao L.I.U., JiYang L.I., TaShi A., Yan H.U., XiaoDong L.I.U. Different SIU6 promoters cloning and establishment of CRISPR/Cas9 mediated gene editing system in tomato. *Scientia Agricultura Sinica*, 51(2): 315-326.
13. Bernard G., Gagneul D., Dos Santos H.A., Etienne A., Hilbert J.-L., Rambaud C. Efficient genome editing using CRISPR/Cas9 technology in chicory. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(5): 1155 (doi: 10.3390/ijms20051155).
14. Marshallsay C., Kiss T., Filipowicz W. Amplification of plant U3 and U6 snRNA gene sequences using primers specific for an upstream promoter element and conserved intragenic regions. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(12): 3459-3466 (doi: 10.1093/nar/18.12.3459).
15. Chan A.P., Crabtree J., Zhao Q., Lorenzi H., Orvis J., Pui D., Melake-Berhan A., Jones K.M., Redman J., Chen G., Cahoon E.B., Gedil M., Stanke M., Haas B.J., Wortman J.R., Fraser-Liggett C.M., Ravel J., Rabinowicz P.D. Draft genome sequence of the oilseed species *Ricinus communis*. *Nature Biotechnology*, 2010, 28: 951-956 (doi: 10.1038/nbt.1674).

16. Horvath D.P., Patel S., Doğramaci M., Chao W.S., Anderson J.V., Foley M.E., Scheffler B., Lazo G., Dorn K., Yan C., Childers A., Schatz M., Marcus S. Gene space and transcriptome assemblies of leafy spurge (*Euphorbia esula*) identify promoter sequences, repetitive elements, high-quality markers, and a full-length chloroplast genome. *Weed Science*, 2018, 66(3): 355-367 (doi: 10.1017/wsc.2018.2).
17. Rahman A.Y., Usharraj A.O., Misra B.B., Thottathil G.P., Jayasekaran K., Feng Y., Hou S., Ong S.Y., Ng F.L., Lee L.S., Tan H.S., Sakaff M.K., Teh B.S., Khoo B.F., Badai S.S., Aziz N.A., Yuryev A., Knudsen B., Dionne-Laporte A., Mchunu N.P., Yu Q., Langston B.J., Freitas T.A., Young A.G., Chen R., Wang L., Najimudin N., Saito J.A., Alam M. Draft genome sequence of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *BMC Genomics*, 2013, 14: 75 (doi: 10.1186/1471-2164-14-75).
18. Wang W., Feng B., Xiao J., Xia Z., Zhou X., Li P., Zhang W., Wang Y., Möller B.L., Zhang P., Luo M.C., Xiao G., Liu J., Yang J., Chen S., Rabinowicz P.D., Chen X., Zhang H.B., Ceballos H., Lou Q., Zou M., Carvalho L.J., Zeng C., Xia J., Sun S., Fu Y., Wang H., Lu C., Ruan M., Zhou S., Wu Z., Liu H., Kannangara R.M., Jørgensen K., Neale R.L., Bonde M., Heinz N., Zhu W., Wang S., Zhang Y., Pan K., Wen M., Ma P.A., Li Z., Hu M., Liao W., Hu W., Zhang S., Pei J., Guo A., Guo J., Zhang J., Zhang Z., Ye J., Ou W., Ma Y., Liu X., Tallon L.J., Galens K., Ott S., Huang J., Xue J., An F., Yao Q., Lu X., Fregene M., López-Lavalle L.A., Wu J., You F.M., Chen M., Hu S., Wu G., Zhong S., Ling P., Chen Y., Wang Q., Liu G., Liu B., Li K., Peng M. Cassava genome from a wild ancestor to cultivated varieties. *Nature Communications*, 2014, 5: 5110 (doi: 10.1038/ncomms6110).
19. Wu P., Zhou C., Cheng S., Wu Z., Lu W., Han J., Chen Y., Chen Y., Ni P., Wang Y., Xu X., Huang Y., Song C., Wang Z., Shi N., Zhang X., Fang X., Yang Q., Jiang H., Chen Y., Li M., Wang Y., Chen F., Wang J., Wu G. Integrated genome sequence and linkage map of physic nut (*Jatropha curcas* L.), a biodiesel plant. *Plant Journal*, 2015, 81(5): 810-821 (doi: 10.1111/tbj.12761).
20. Halling K.C., Halling A.C., Murray E.E., Ladin B.F., Houston L.L., Weaver R.F. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13(22): 8019-8033 (doi: 10.1093/nar/13.22.8019).
21. Tregear J.W., Roberts L.M. The lectin gene family of *Ricinus communis*: cloning of a functional ricin gene and three lectin pseudogenes. *Plant Molecular Biology*, 1992, 18(3): 515-525 (doi: 10.1007/BF00040667).
22. Ladin B.F., Murray E.E., Halling A.C., Halling K.C., Tilakaratne N., Long G.L., Houston L.L., Weaver R.F. Characterization of a cDNA encoding ricin E, a hybrid ricin-*Ricinus communis* agglutinin gene from the castor plant *Ricinus communis*. *Plant Molecular Biology*, 1987, 9(3): 287-295 (doi: 10.1007/BF00166464).
23. Alexandrov O. Study of the upstream ricin gene sequences in different castor (*Ricinus communis*) varieties as a preliminary step in CRISPR/Cas9 editing. *Research on Crops*, 2020, 21(2): 344-348 (doi: 10.31830/2348-7542.2020.058).
24. Aleksandrov O.S. *Aktual'naya biotekhnologiya*, 2018, 3(26): 161-162 (in Russ.).
25. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12(1): 13-15.
26. Razumova O.V., Alexandrov O.S., Divashuk M.G., Sukhorada T.I., Karlov G.I. Molecular cytogenetic analysis of monoecious hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars reveals its karyotype variations and sex chromosomes constitution. *Protoplasma*, 2016, 253(3): 895-901 (doi: 10.1007/s00709-015-0851-0).
27. Wang M.B., Helliwell C.A., Wu L.M., Waterhouse P.M., Peacock W.J., Dennis E.S. Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants. *RNA*, 2008, 14(5): 903-913 (doi: 10.1261/rna.760908).
28. Mikami M., Toki S., Endo M. Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Molecular Biology*, 2015, 88(6): 561-572 (doi: 10.1007/s11103-015-0342-x).
29. Domitrovich A.M., Kunkel G.R. Multiple, dispersed human U6 small nuclear RNA genes with varied transcriptional efficiencies. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(9): 2344-2352 (doi: 10.1093/nar/gkg331).
30. Wang P., Zhang J., Sun L., Ma Y., Xu J., Liang S., Deng J., Tan J., Zhang Q., Tu L., Daniell H., Jin S., Zhang X. High efficient multisites genome editing in allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum*) using CRISPR/Cas9 system. *Plant Biotechnology Journal*, 2018, 16(1): 137-150 (doi: 10.1111/pbi.12755).