

Нежданова Анна Владимировна

Эффекты гетерологичной экспрессии генов транскрипционных факторов (*MADS-box*, *YABBY*) и редактирования генов метаболизма (*PHO1a*, *PDS*) на особенности регуляции онтогенеза *Nicotiana tabacum* и *Solanum tuberosum*

Специальность: 1.5.6 Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2024

Работа выполнена в группе Биоинженерии растений и лаборатории Системной биологии растений Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

Научный руководитель: **Щенникова Анна Владимировна**,
кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории Системной биологии растений, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Официальные оппоненты: **Фролов Андрей Александрович**
доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией аналитической биохимии и биотехнологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН)

Брускин Сергей Александрович
кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией функциональной геномики, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Защита состоится 23 января 2025 года в 11:00 часов на заседании диссертационного совета 24.1.016.01 (Д 006.027.01) на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» по адресу 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499)976-65-44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке института и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ: <http://www.vniisb.ru/ru/council/>

Автореферат разослан _____ 2024 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Романов Дмитрий Викторович

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Огромное морфологическое разнообразие царства растений считается следствием эволюционных преобразований растений-предшественников в процессе естественного отбора. Доместикация отдельных видов и последующий отбор по качественным признакам привели к появлению культивируемых растений. Ключевые позиции среди мишеней эволюции и доместикации занимают гены транскрипционных факторов (ТФ). С семейством генов *YABBY*-доменных ТФ ассоциируют появление плоского листа и многообразие его форм, а также асимметричное развитие всех надземных латеральных органов. С семейством генов *MADS*-доменных ТФ связывают появление и многообразие цветковых растений, а также регуляцию практически всех аспектов онтогенеза. Функции генов *YABBY* и *MADS-box* консервативны у видов растений и, одновременно, имеют генотип-специфичные особенности, что открывает широкие перспективы использования данных генов в селекции сельскохозяйственных культур, направленной на улучшение хозяйственно-ценных признаков (например, стрессоустойчивость, урожайность). Таким образом, сравнительные (как межвидовые, так и внутривидовые) структурно-функциональные исследования генов *YABBY* и *MADS-box* имеют высокую актуальность для селекционных программ. Помимо практического значения, такие исследования способствуют увеличению объема знаний об эволюции и онтогенезе растений.

Степень разработанности. В 1989 году вышла первая публикация по характеристике гомеотических мутаций в цветке *Arabidopsis thaliana* (Bowman et al., 1989). Уже в 1991 году данные мутации были ассоциированы с *MADS-box* генами, на основе чего была предложена ABC-модель развития цветка (Meyerowitz et al., 1991), которая позднее была дополнена до модели ABC(E) (Ma et al., 1991). Дальнейшие исследования привели к появлению модели Квартет (Theißen and Saedler, 2001; Honma and Goto, 2001). В совокупности, модели ABC(E) и Квартет постулируют наличие генетических активностей А, В, С и Е, разные сочетания которых определяют идентичность цветковых органов. За каждую активность отвечают гены семейства *MADS-box*, функционирующие в составе тетрамерных комплексов (Honma and Goto, 2001). Был охарактеризован возможный вклад *MADS-box* транскрипционных факторов в эволюцию, доместикацию и стрессовый ответ растений (Schilling et al., 2018; Theißen et al., 2018; Castelán-Muñoz et al., 2019). Кроме того, было показано, что помимо роли в развитии цветка, *MADS-box* транскрипционные факторы участвуют практически во всех процессах онтогенеза растения (Smaczniak et al., 2012).

Первые работы, характеризующие гены семейства *YABBY*, появились в конце 1990-х годов (Bowman and Smyth, 1999). В последующие годы показана значимость транскрипционных факторов семейства *YABBY* для эволюции, онтогенеза (Bartholmes et al., 2012), селекции (Zhang et al., 2020a) и стрессовой реакции (Hou et al., 2019) растений.

В нашей лаборатории были идентифицированы и частично охарактеризованы семейства генов *MADS-box* хризантемы и подсолнечника (Шульга и др., 2008, 2015; Shchennikova et al., 2004; Сизенева и др., 2013; Щенникова и др., 2003, 2011), а также семейство генов *YABBY* подбельника (Shchennikova et al., 2018) и *YABBY*-ген хризантемы *CDM51* (не опубликовано).

Цели и задачи исследования. Целью работы стала оценка функциональной активности целевых генов *YABBY* и *MADS-box* в развитии растения, а также в ответе растения на стрессовые факторы.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать структуру и филогению семейств YABBY- и MADS-доменных ТФ у исследуемых в работе видов растений;

2. Охарактеризовать функцию отдельных генов YABBY и MADS-box с помощью получения и анализа трансгенных растений со сверхэкспрессией данных генов (индивидуальной или совместной);

3. Охарактеризовать возможное участие MADS-box генов в стрессовом ответе с помощью получения и анализа трансгенных растений с нарушением метаболизма каротиноидов или крахмала.

Научная новизна. Получены и охарактеризованы трансгенные растения табака с индивидуальной и/или совместной сверхэкспрессией: YABBY-генов (*MhyFIL1*, *MhyFIL3* и *CDM51*) подъяльника и хризантемы; MADS-box генов хризантемы (*CDM44*, *CDM37*, *CDM86* и *CDM115*), томата (*SIMADS5*) и подсолнечника (*HAM45* и *HAM59*). Определена возможная роль исследуемых YABBY-генов в асимметричном развитии листьев и апикальной меристемы побега, и целевых MADS-box генов в спецификации органов цветка. Определена дифференциальная экспрессия генов MADS-box в ответ на изменение метаболизма крахмала и каротиноидов у полученных трансгенных растений картофеля и табака с редактированной последовательностью гена крахмалфосфорилазы *PHO1a* или гена фитоиндесатуразы *PDS*.

Практическая значимость работы. Полученные результаты практически значимы, поскольку гены YABBY и MADS-box определяют многие хозяйственно ценные признаки сельскохозяйственных культур, включая сроки цветения и созревания, урожайность, качество плодов и семян, стрессоустойчивость. Данные об аллельной вариабельности и/или дифференциальной экспрессии YABBY и MADS-box генов между сортами и линиями одной культуры могут быть использованы для поиска доноров целевых признаков в селекции улучшенных сортов.

Методология и методы исследования. В работе были использованы штаммы *E. coli* XL1, *A. tumefaciens* AGL0 и *S. cerevisiae* Pj69-4a, растения *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, *Solanum lycopersicum* и *Monotropa hypopitys*, и плазмидные вектора pGD121 (сверхэкспрессия в растении), p201N (CRISPR/Cas9-редактирование), pGEMT-easy (промежуточное клонирование), pAD-GAL4 и pBDCam-GAL4 (анализ белок-белковых взаимодействий). Получение генетических конструкций осуществляли стандартными методами клонирования. Анализ белок-белковых взаимодействий проводили в двухгибридной дрожжевой GAL4-системе, согласно стандартному протоколу. Для получения трансгенных растений со сверхэкспрессией трансгена или с конструкцией для CRISPR-Cas9-редактирования использовали агробактериальную трансформацию. Для получения препаратов нуклеиновых кислот, проведения ПЦР, ПЦР-РВ (анализ экспрессии гена) и биохимического анализа (содержание крахмала, каротиноидов, хлорофиллов, антоцианов) использовали стандартные наборы и методы. Для анализа данных использовали пакеты программ NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>), а также программы MEME 5.5.4 ('motif discovery': <https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), TomExpress (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>), Clone Manager (<https://ru.freownloadmanager.org/Windows-PC/Clone-Manager.html>) и Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/>). Подробно методология и методы исследования изложены в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые за защиту:

1. *YABBY*-гены *MhyFIL1*, *MhyFIL3* (подбельник) и *CDM51* (хризантема) входят в *YABBY*-подсемейство *FILAMENTOUS FLOWER* и участвуют в асимметричном развитии листьев и апикальной меристемы побега.
2. *MADS-box* гены *SIMADS5* (томат) и *CDM44* (хризантема) входят в *MADS*-подсемейство *SEPALLATA3* и могут участвовать в спецификации лепестков и генеративных органов.
3. *MADS-box* гены *HAM45*, *HAM59* (подсолнечник) и *CDM37* (хризантема) входят в *MADS*-подсемейство *AGAMOUS* и связаны с контролем идентичности цветковой меристемы и генеративных органов.
4. *MADS-box* гены *CDM86* и *CDM115* (хризантема) входят в *MADS*-подсемейство *PISTILLATA/APETALA3* и могут участвовать в спецификации лепестков и тычинок.
5. *MADS-box* гены подсемейств *SEPALLATA* и *FRUITFULL* могут участвовать в регуляции стрессового ответа растений.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Результаты работы представлены на конференциях, форумах, съездах и конгрессах: XIX Конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (15–16 апреля 2019, Москва); XI-я Международная научно-практическая конференция, приуроченная к 60-летию со дня образования РУДН «Инновационные процессы в сельском хозяйстве» (25-27 апреля 2019, Москва); VII-X международные научно-практические конференции «Биотехнология: наука и практика» (16-20 сентября 2019, Севастополь; 22-26 сентября 2020 Ялта; 20-24 сентября 2021, Ялта; 12-16 сентября 2022, Алушта); Международные форумы «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (27-29 мая 2020, 26-29 октября 2021, 31 октября-1 ноября 2022, Москва); The 6th International Scientific Conference «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021)» (14-18 июня 2021, Новосибирск); 45th FEBS Congress (3-8 июля, 2021, Ljubljana, Slovenia); 26-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых с международным участием «БИОЛОГИЯ – НАУКА ХХІ ВЕКА» (9-13 апреля, 2023); X Съезд Общества физиологов растений России (18-23 сентября 2023, Уфа); Конгресс «CRISPR-2023» (11-13 сентября 2023, Новосибирск); XXIV Конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии» (23–27 сентября 2024, Москва).

Достоверность полученных результатов основывается на использовании достаточного объема экспериментального материала, соответствующих для поставленных задач методов исследования и методов обработки данных.

По материалам диссертации опубликовано 8 научных публикаций, индексируемых в Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад. Результаты получены соискателем лично или при его непосредственном участии.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит 19 таблиц и 62 рисунок. Библиография включает 255 ссылок.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.6 – Биотехнология, а именно областям исследований: биотехнология растительных и животных клеток, создание генетически модифицированных организмов растительного, животного и микробного

происхождения (ГМО и ГММ) на основе направленного редактирования геномов и синтетической биологии; биотехнологии клеточных культур.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Структурно-функциональный анализ семейств YABBY у подбельника и хризантемы

Структура семейств транскрипционных факторов (ТФ) YABBY подбельника *Monotropa hypopitys* L. (Ericaceae) и хризантемы *Chrysanthemum x morifolium* (Asteraceae) была охарактеризована в сравнении с другими видами Asterids и модельным растением *Arabidopsis thaliana* L. (Rosids). На дендрограмме анализируемые белки распределились по подсемействам FIL, YABBY2, YABBY5, CRC и INO (рис. 1). В группу FIL вошло большинство ТФ, включая CDM51 (хризантема), MhyFIL1 и MhyFIL3 (подбельник), которые были выбраны для дальнейшего анализа. Ближайшими гомологами MhyFIL ожидаемо стали белки видов порядка Верескоцветные (Ericales), а CDM51 – сем Asteraceae и Solanaceae (рис. 1).

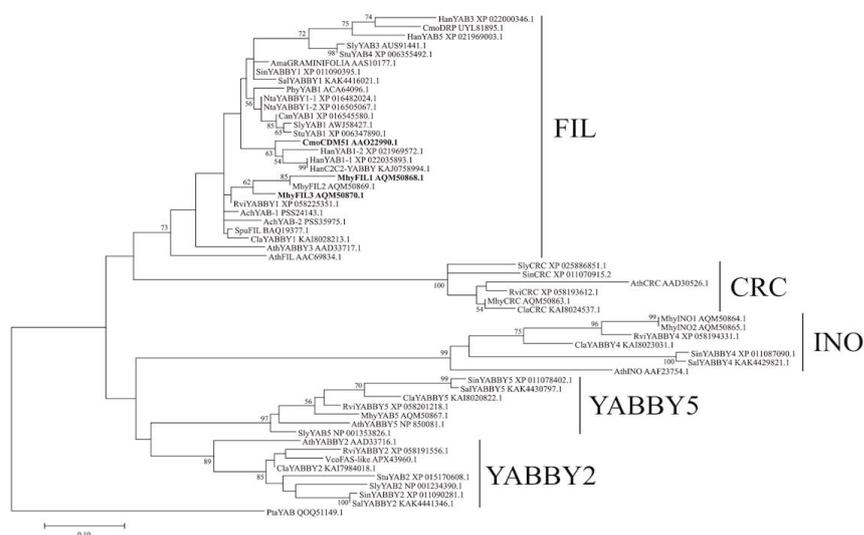


Рисунок 1 – Филогения ТФ семейства YABBY у *M. hypopitys* и *C. x morifolium* в сравнении с гомологами у видов семейств Asteraceae, Solanaceae, Ericaceae, Actinidiaceae, Sarraceniaceae, Theaceae, Pedaliaceae, Plantaginaceae, Brassicaceae, Gymnospermae

Структурный анализ последовательностей CDM51, MhyFIL1 и MhyFIL3 определил положение YABBY-домена, состоящего из C₂C₂ домена цинкового пальца и HLH-домена, что соответствует структуре ТФ сем YABBY. Были выявлены консенсусы, определяющие наиболее консервативные области YABBY-домена, а также (в междоменных областях) мотивы, специфичные для белков подсемейства FIL, включая мотивы с вероятной функциональной нагрузкой (FIL-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -I, -H). Проведенный анализ показал, что CDM51, MhyFIL1 и MhyFIL3 являются структурными гомологами FIL и, следовательно, могут выполнять функции, близкие FIL.

Для подтверждения этого были получены трансгенные растения табака (*N. tabacum*) со сверхэкспрессией генов *CDM51*, *MhyFIL1* или *MhyFIL3* (как в смысловой (*s*), так и в антисмысловой (*as*) ориентации): *FIL1s* (3 регенеранта), *FIL1as* (5), *FIL3s* (12), *FIL3as* (11), *51s* (3) и *51as* (18). Линии со смысловой ориентацией трансгена существенно отличались от контроля: кустились и, в случае выживания, крайне поздно цвели, формируя намного меньше цветков (рис. 2).

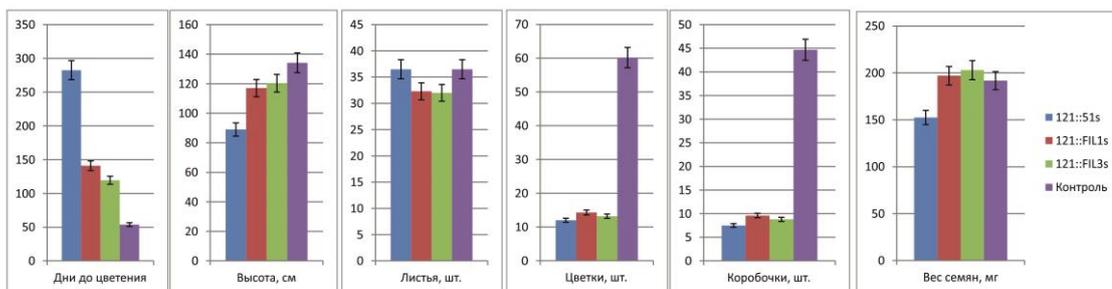


Рисунок 2 – Характеристики растений *FIL1s*, *FIL3s* и *51s* в сравнении с нетрансгенным контролем

Листья регенерантов *FIL1s*, *FIL3s* и *51s* закручивались к нижней (абаксиальной) стороне, что предполагает нарушение идентичности клеток верхней (адаксиальной) поверхности листа. В пазушных меристемах листьев наблюдалось побегообразование, а корневая система трансформировалась в короткий утолщенный корень с наростами зеленой окраски (рис. 3). Из всего куста цвел, как правило, только один побег и только в случае его возврата к дикому типу (предположительно, за счет замалчивания трансгена). Цветки визуально не отличались от контроля, однако имели тенденцию к опадению из-за отмирающих цветоножек.



Рисунок 3 – Трансгенные растения *FIL1s*, *FIL3s* и *51s* (*35S::FIL*) в сравнении с контролем (WT)

Микроскопический анализ листьев растений *FIL1s*, *FIL3s* и *51s* обнаружил на верхней стороне структуры, подобные устьицам, которые в норме характерны для нижней поверхности (рис. 4). Мы предполагаем, что верхняя поверхность листа приобрела признаки нижней, что привело к скручиванию таких листьев.

Девять регенерантов T_0 *FIL1s* (6), *FIL3s* (2) и *51s* (1) смогли зацвести и дать семена. Растения T_1 имели еще большие в сравнении с родителями морфологические нарушения, что приводило к гибели растений. Таким образом, изменение идентичности клеток под влиянием сверхэкспрессии генов подсемейства *FIL* оказалось критичным для развития и выживания растений. Эффекты от действия генов подбельника и хризантемы были схожими, что говорит о консервативности функции данных генов в определении идентичности абаксиальной поверхности листа, несмотря на отсутствие у подбельника листьев. Также, кустящийся, поздно цветущий (или не цветущий) фенотип трансгенных растений и нарушения архитектуры корневой системы подтвердили предполагаемое участие *FIL*-генов в корректном развитии апикальных меристем.

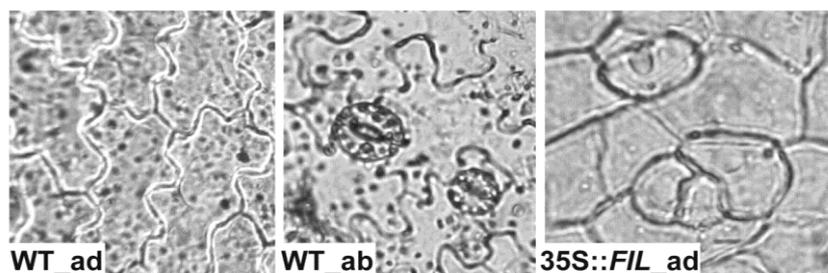


Рисунок 4 – Микроскопические фотографии верхней (ad) и нижней (ab) поверхности листа контроля (WT) и трансгенных растений (35S::*FIL*)

2. Структурно-функциональный анализ целевых *MADS-box* генов

Согласно моделям ABC(E) и Квартет, MADS-доменные ТФ МКС^c-типа выполняют генетические активности классов А, В, С и/или (Е) и в составе тетрамерных комплексов определяют идентичность органов цветка: чашелистиков (AAEE), лепестков (AB₁B₂E), тычинок (CB₁B₂E) и пестика (CSEE). Проведенный нами сравнительный структурный анализ семейств MADS-ТФ у хризантемы, подсолнечника, поддельника, томата и *A. thaliana* классифицировал белки по девяти известным подсемействам (рис. 5). Анализ структуры этих белков подтвердил присутствие консервативных доменов (MADS, I, K) и вариабельной С-концевой области, что позволило отнести белки к типу МКС^c. Дополнительный поиск консенсусов обнаружил статистически достоверные мотивы, составляющие домены MADS, I и К, а также С-концевые консенсусы, специфичные для каждого подсемейства и, предположительно, связанные с их функциональными особенностями.

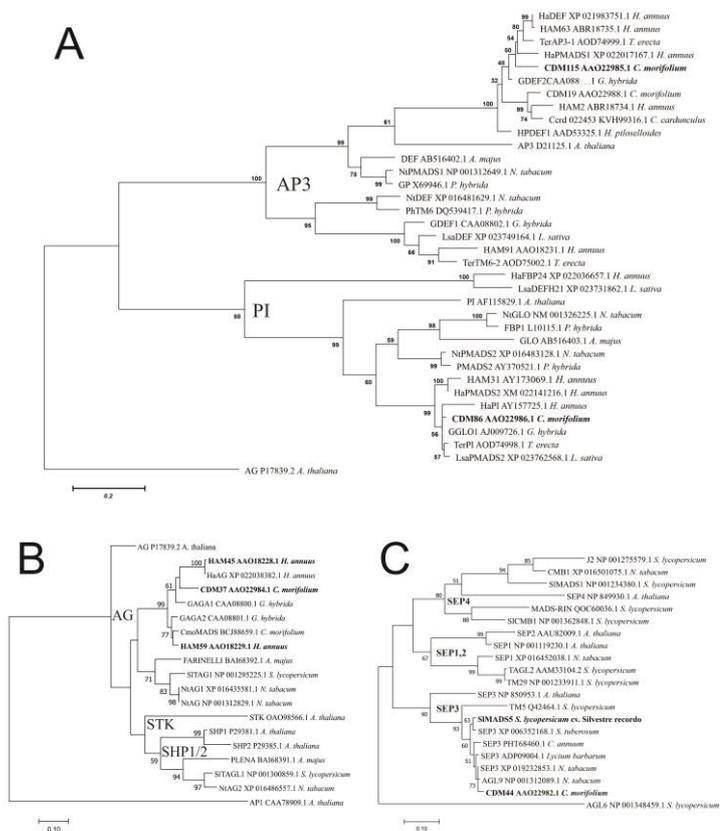


Рисунок 5 – Дендрогаммы, построенные для MADS-доменных ТФ подсемейств AP3/PI (А), AG/SHP/STK (В) и SEP1–4 (С)

На основании результатов структурного анализа для функционального исследования были отобраны белки, имеющие отношение к генетическим активностям В, С и Е: CDM37 (хризантема), HAM45 и HAM59 (подсолнечник) (подсемейство AG, С-активность), CDM86 и CDM115 (хризантема) (PI/AP3, В-активность), CDM44 (хризантема) и SIMADS5 (томат) (SEP3, Е-активность). В рамках ABC(E)-модели, CDM44 и SIMADS5 могут участвовать в дифференцировке всех органов цветка, кроме чашелистиков. CDM37, HAM45 и HAM59 – тычинок и пестика, а CDM86 и CDM115 – лепестков и тычинок.

Для последующего функционального анализа нами были использованы ранее полученные в лаборатории растения табака со сверхэкспрессией генов *CDM44*, *CDM37*, *HAM45* и *HAM59*. Были получены и охарактеризованы трансгенные растения табака с индивидуальной сверхэкспрессией генов *SIMADS5*, *CDM86* и *CDM115*, а также с одновременной сверхэкспрессией нескольких *MADS-box* генов.

2.1. Роль *MADS-box* гена *SIMADS5* (томат) Е-активности в развитии растения

Проведенный *in silico* анализ (<http://tomexpress.toulouse.inra.fr/>) профиля экспрессии гена *SIMADS5* в растении томата выявил его транскрипты только в репродуктивных органах с максимумом на последних стадиях развития плода, что подтверждает Е-активность гена *SIMADS5*. Для получения трансгенных растений кДНК гена *SIMADS5* была клонирована для томата сорта *Silvestre recordo*. Для анализа белок-белковых взаимодействий ТФ *SIMADS5* были также клонированы кДНК *TAG1* (С-активность) и *FUL2* (А) как предположительных партнеров.

Были получены и охарактеризованы растения T_0 со сверхэкспрессией гена *SIMADS5s* (18 линий) и *SIMADS5as* (3). Растения *SIMADS5s* (*vs.* контроль) зацветали значительно позже, формировали утолщенные надземные органы и имели другие существенные отличия (рис. 6, 7). Анализ растений T_1 *SIMADS5s* от линий T_0 с ярко выраженным фенотипом (5-16 и 5-17) выявил дополнительные изменения – значительно усиление окраски венчика цветка (маджента *vs.* светло-розовый цвет у контроля) (рис. 7). Потомки T_2 этих линий уже на стадии проростков отличались практически отсутствием междоузлий и погибали, за исключением потомков линии 5-16-7, которые повторили родительский фенотип.

В листьях и меристеме побега (до цветения и при переходе к цветению) контроля, а также в листьях и меристеме побега долго нецветущих растений T_1 *SIMADS5s* (5-16-7 и 5-17-1) была определена экспрессия трансгена *SIMADS5* и генов табака, связанных с репродуктивным развитием: *NtWUS* (поддержание пула стволовых клеток в меристемах); *NtLFY* и *MADS-box* ген *NtAPI* (контроль инициации цветения и, для *NtAPI*, А-активность); *MADS-box* гены *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtSEP3* (Е), *NtAG* и *NtPLE* (С). Транскрипты *SIMADS5* присутствовали, ожидаемо, у 5-16-7 и 5-17-1; остальные гены имели низкий уровень экспрессии, за исключением активации в репродуктивной меристеме контроля. Таким образом, был подтвержден нерепродуктивный статус меристемы побега трансгенных линий, видимо, в связи с ее некорректным развитием, о чем говорит утолщение стебля и листьев и укорочение междоузлий. Мы предполагаем, что данный эффект может быть следствием неспецифических взаимодействий ТФ *SIMADS5* с другими белками и генами табака в меристемном домене.

Проведенный анализ белок-белковых взаимодействий показал, что ТФ *SIMADS5* образует димеры с *FUL2* и *TAGL1*, что согласуется с моделями Квартет и ABC(E) и подтверждает совместную роль данных ТФ в спецификации плодолистиков. Поскольку сверхэкспрессия гена *SIMADS5* повлияла на усиление антоциановой окраски венчика (рис. 7),

мы предполагаем также участие ТФ SIMADS5 в положительной регуляции генов пути биосинтеза антоцианов, что согласуется с литературными данными.

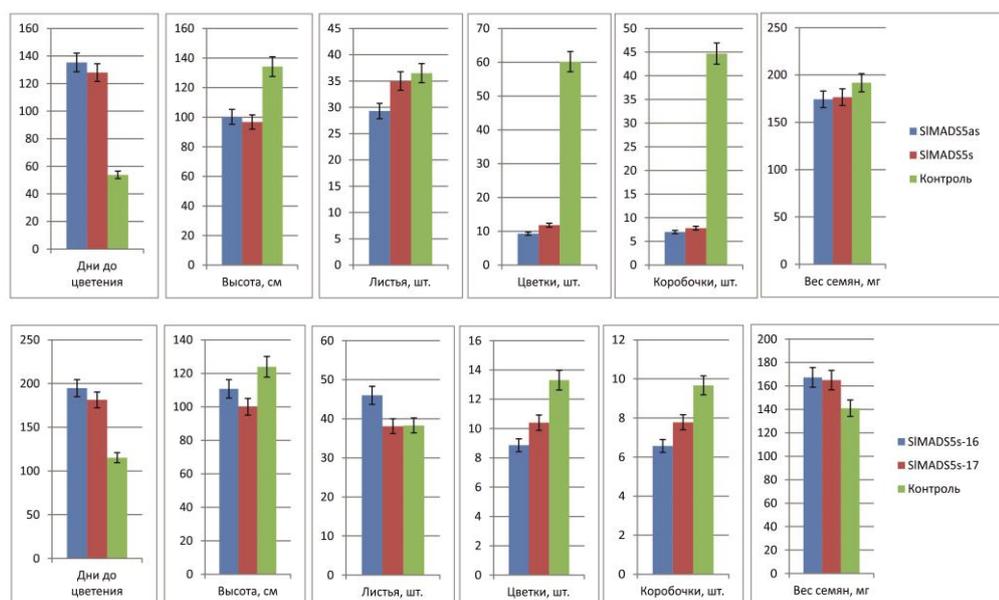


Рисунок 6 – Характеристика растений T₀ SIMADS5as и SIMADS5s (верх) и T₁ SIMADS5s 5-16 и 5-17 (низ)

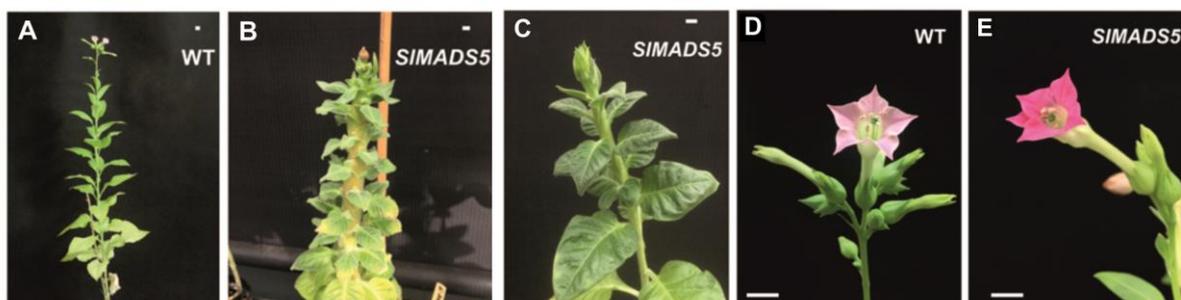


Рисунок 7 – Эффект сверхэкспрессии гена SIMADS5s на фенотип растения (B–C, E) в сравнении с контролем (WT) (A, D)

2.2. Сверхэкспрессия MADS-box гена CDM44 (хризантема) E-активности в растении табака

Было выращено и охарактеризовано поколение T₁ от полученных ранее в лаборатории трансгенных растений табака со сверхэкспрессией гена CDM44. Показано, что их отличие от контроля состоит в поздней инициации цветения, большем количестве цветков (рис. 8) и существенной задержке созревания семенной коробочки; последнее согласуется с известной ролью ТФ подсемейства SEP в созревании сочного плода.

Проведенный анализ эффекта холодового стресса (10°C) на рост растений T₃ от линии 44-31-6 показал, что сверхэкспрессия гена CDM44 приводит к повышенной устойчивости растений к низким температурам в сравнении с контролем, который демонстрировал ослабленный набор вегетативной массы, увядание листьев и пониженное накопление хлорофиллов.

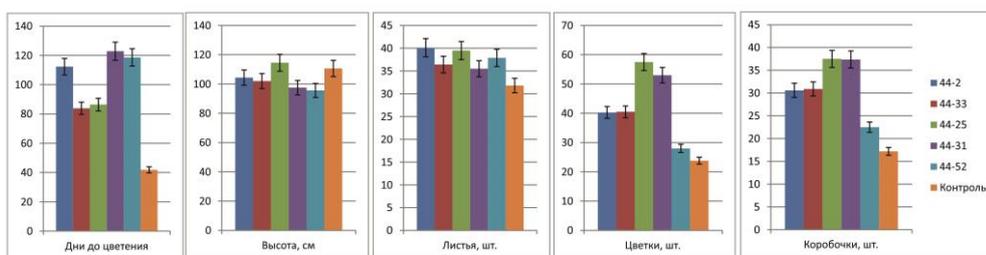


Рисунок 8 – Сравнение характеристик контрольного и трансгенных растений табака T₁ CDM44s

2.3. Совместная сверхэкспрессия *MADS-box* генов *HAM45* и *HAM59* (подсолнечник) С-активности в растении табака

В результате скрещивания растений со сверхэкспрессией *HAM45* и *HAM59* были получены линии F₁ с одновременной сверхэкспрессией двух генов. Анализ поколения F₂ от линии F₁ 13-1 и F₃ от линий F₂ 13-1-1, 13-1-4 и 13-1-7 с наиболее яркими отличиями от контроля обнаружил существенные отличия (*vs.* контроль) трансгенных линий по морфологическим характеристикам, времени цветения и фертильности (понижена) (рис. 9).

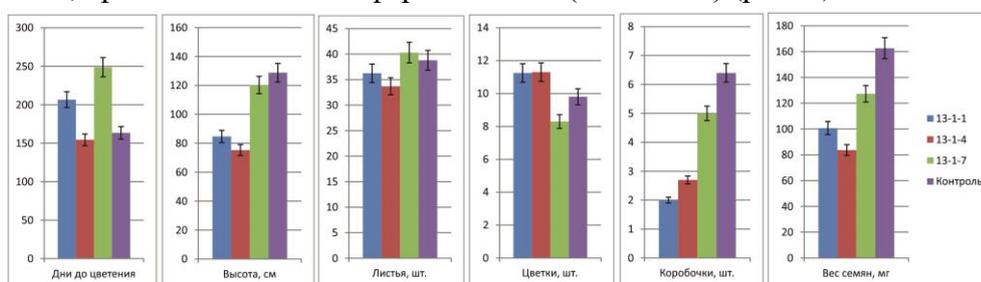


Рисунок 9 – Характеристики контрольных и трансгенных (*HAM45s* x *HAM59s*) растений табака

Чашелистики цветков у данных линий имели признаки плодолистиков (включая эктопические нектарники), а лепестки – тычинок (развитие структур, подобных пыльникам), как и родительские растения *HAM45s*. Пониженная фертильность была связана с нарушением раскрытия пыльников, меньшим количеством пыльцы, укорочением тычиночных нитей и сужением трубки венчика (рис. 10).

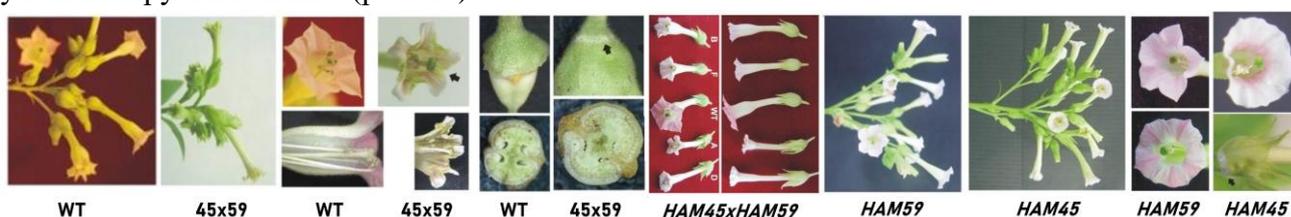


Рисунок 10 – Фенотип цветков контроля (WT) и растений *HAM45s*; *HAM59s*; *HAM45s* x *HAM59s*

Наблюдаемые нами фенотипические изменения (околоцветник с признаками репродуктивных органов) при одновременной сверхэкспрессии двух генов С-активности соответствуют постулатам моделей Квартет и ABC(E). Также они подтверждают роль ТФ *HAM45* и *HAM59* в определении идентичности меристемы цветка и репродуктивных цветковых органов.

2.4. Сверхэкспрессия *MADS-box* гена *CDM37* (хризантема) С-активности в растении табака

Анализ ранее полученных растений табака со сверхэкспрессией гена *CDM37* позволил отобрать линии для дальнейшего исследования: 37-33 (T_1), сходная с контролем, и 37-1-7-8 (T_3), значительно отличающаяся от контроля. Были охарактеризованы потомки T_2 от 37-33 и T_4 от 37-1-7-8 (рис. 11). Состав и строение соцветий и цветков T_2 37-33 не имели отклонений от нормы, тогда как T_4 37-1-7-8 демонстрировали сильные изменения в морфологии цветка (рис. 12), подобные наблюдаемым нами у растений *HAM45s* (рис. 10). Функциональное сходство *CDM37* и *HAM45* соответствует структурной близости генов (рис. 5). Наблюдаемые нами изменения у линии 37-1-7-8 соответствуют постулатам моделей Квартет и ABC(E). Также они подтверждают роль ТФ *CDM37* в определении идентичности меристемы цветка и репродуктивных цветковых органов.

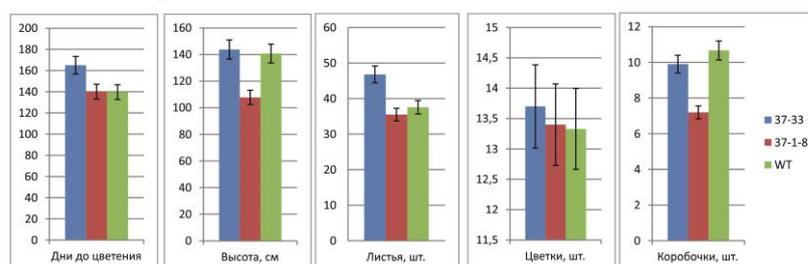


Рисунок 11 – Характеристики линий *CDM37s* (T_2 37-33, T_4 37-1-7-8) в сравнении с контролем



Рисунок 12 – Соцветия и цветки контрольного (WT) и трансгенных (T_2 37-33, T_4 37-1-7-8) растений табака

2.5. Совместная сверхэкспрессия *MADS-box* генов *CDM44*, *HAM45* и *HAM59* (E + C) в растении табака

В результате скрещивания линий 13-1-1 (*HAM45s* x *HAM59s*) и 44-31-6 (*CDM44s*) были получены и охарактеризованы гибридные линии F_1 со сверхэкспрессией всех трех генов и поколение F_2 (линии 13-1-1-17, 13-1-1-64 и 13-1-1-82) (рис. 13).

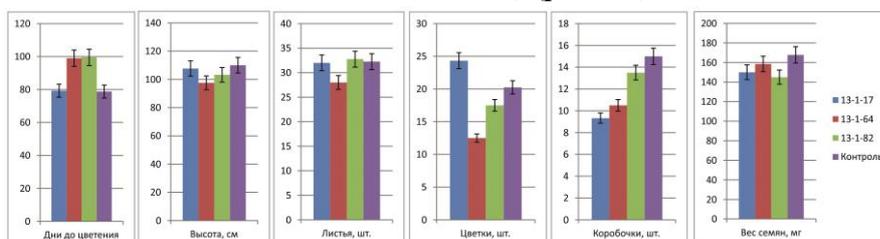


Рисунок 13 – Характеристики F_2 растений *HAM45s* x *HAM59s* x *CDM44s* в сравнении с контролем

Растения F_2 характеризовались менее выраженными фенотипическими признаками родительской линии 13-1-1 (рис. 9, 10), то есть сверхэкспрессия *CDM44*, скорее, нивелировала фенотип растений *HAM45s* x *HAM59s*, нежели привнесла новые изменения.

2.6. Индивидуальная и одновременная сверхэкспрессия *MADS-box* генов *CDM86* и *CDM115* (хризантема) В-активности в растениях табака

Были получены трансгенные линии табака T_0 со сверхэкспрессией генов В-активности хризантемы *CDM86* (26 линий *CDM86s* и 24 *CDM86as*) и *CDM115* (26 линий *CDM115s*). Все они отличались от контроля по времени цветения и морфологическим признакам (рис. 14).

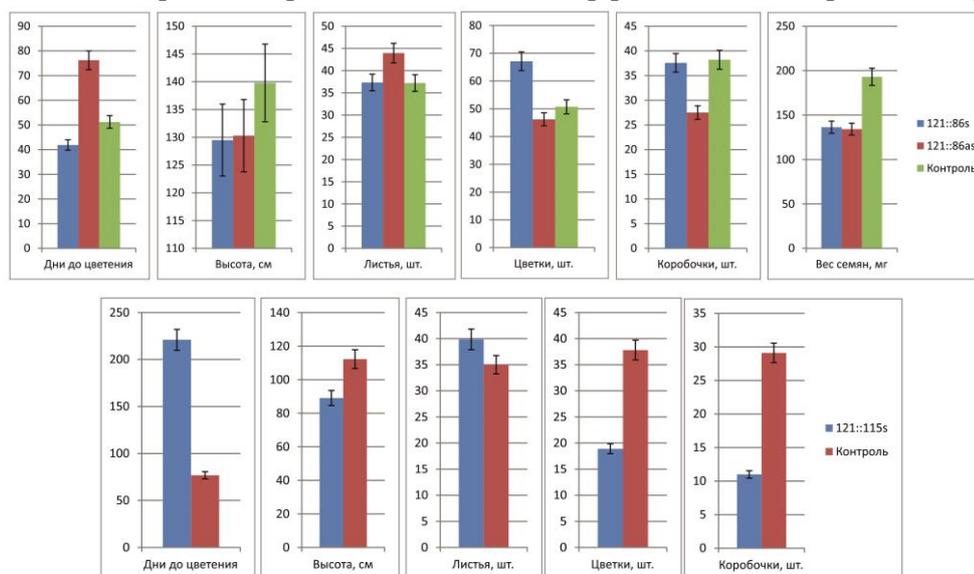


Рисунок 14 – Характеристики линий табака поколения T_0 *CDM86s*, *CDM86as* и *CDM115s*

Анализ потомков T_1 растений *CDM86s* и *CDM115s* показал, что все они цветут значительно позже контроля и образуют существенно меньше семян. Ряд растений *CDM86s* характеризовался изменением идентичности завязи пестика в цветке, тогда как цветки *CDM115s* не отличались внешне от контроля. Растения T_1 3-1, 88-117 и 36-3 (*CDM86s*) и 4-26, 11-52 и 22-171 (*CDM115s*) были скрещены с получением линий F_1 с одновременной сверхэкспрессией обоих трансгенов и проведен анализ потомства F_2 этих линий (рис. 15).

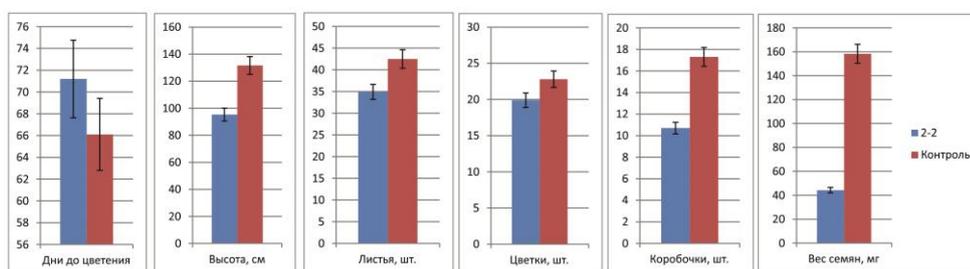


Рисунок 15 – Характеристики растений 2-2 (F_2) *CDM86s* x *CDM115s* в сравнении с контролем

Линия F_2 2-2 демонстрировала наибольшие в сравнении с контролем и другими линиями изменения морфологии, сходные с фенотипом растений *CDM86s*, но с повышенной экспрессивностью и, в дополнение, частичным изменением идентичности чашелистиков (рис. 15, 16). Наблюдаемые гомеотические изменения согласуются с моделью ABC(E), постулирующей участие генов В-активности в спецификации лепестков и тычинок.

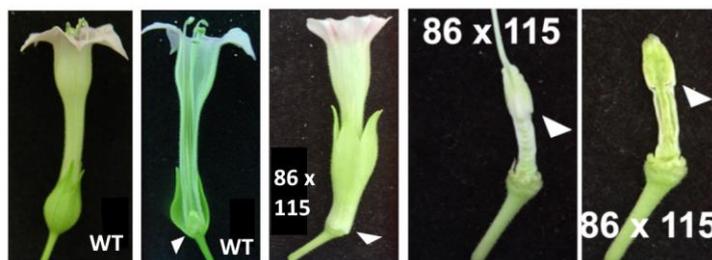


Рисунок 16 – Цветок контроля (WT) и растений F₂ CDM86 x CDM115

2.7. Одновременная сверхэкспрессия *MADS-box* генов CDM37, CDM86 и CDM115 (С + В) в растениях табака

Растения T₂ линии 2-2-13 (CDM86s x CDM115s) были скрещены с растениями T₄ линии 37-1-7-8-4 (CDM37s) – реципрокные скрещивания 13-2 и 13-5. Характеристика растений F₂ с одновременной сверхэкспрессией трех генов показала, что растения поздно цветут и имеют пониженную фертильность. Анализ линий F₃ 13-2-3 и 13-2-7 показал, что цветы растения стали раньше контроля, однако сохранили родительский фенотип, в том числе фенотип измененного цветка и сниженной фертильности (рис. 17).

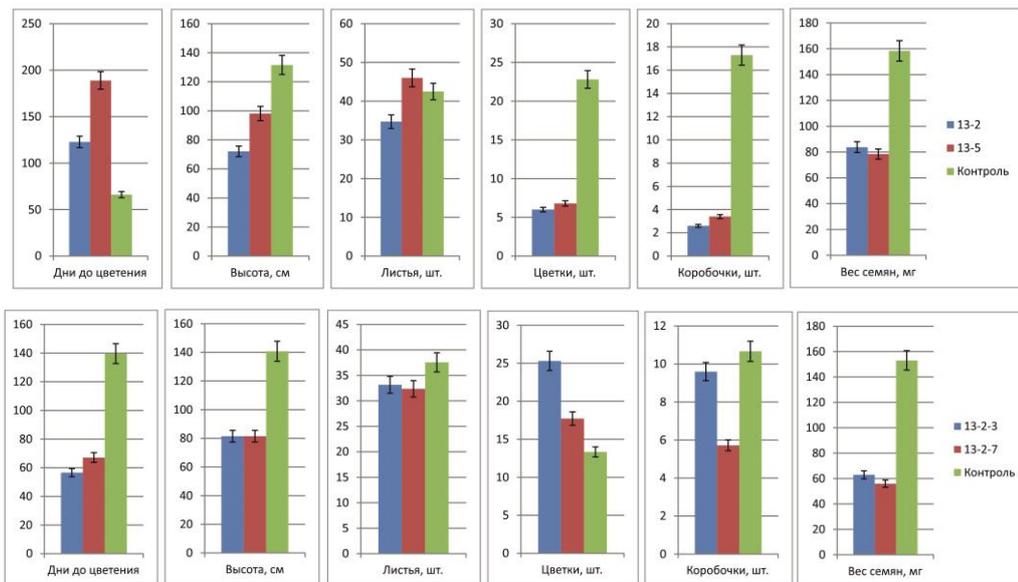


Рисунок 17 – Характеристики растений F₂ и F₃ CDM86s x CDM115s x CDM37s

Таким образом, одновременная сверхэкспрессия генов В- и С-активности влияет на время инициации цветения, морфологию вегетативной части растения и фертильность. В соответствии с моделями Квартет и ABC(E), чашелистики приобрели признаки лепестков, лепестки – тычинок, тычинки – лепестков, а пестик – лепестков и тычинок (рис. 18).



Рисунок 18 – Цветок: CDM86s x CDM115s x CDM37s (C, D, F, G), родители (A – CDM37s, B – CDM86s x CDM115s), контроль (E)

3. Участие *MADS-box* генов в стрессовых реакциях растений

3.1. Экспрессия *MADS-box* генов в трансгенных растениях картофеля *S. tuberosum* с измененным метаболизмом крахмала за счет внесения мутации в последовательность гена пластидной крахмалфосфорилазы *PHO1a*

Известными мишенями *MADS-box* ТФ являются гены метаболизма углеводов, которые тесно связаны с адаптацией растений к стрессовым условиям. Защитная реакция растений всегда связана с модуляцией содержания растворимых сахаров, что опосредуется, в частности, деградацией крахмала, осуществляемой амилазами (гидролиз) и крахмалфосфорилазами (фосфоролиз).

Мы получили 39 трансгенных регенерантов T_0 четырех сортов картофеля *S. tuberosum* (Мишка (6 линий), Люкс (17), Терра (11) и Жуковский ранний (5)) с измененным обменом крахмала за счет редактирования (CRISPR-Cas9) последовательности гена *PHO1a* и определили в этих растениях экспрессию *MADS-box* генов, которые могут быть связаны с ответом растения на стресс. Все растения отличались от исходных сортов повышенной стимуляцией корне- и побегообразования (рис. 19).

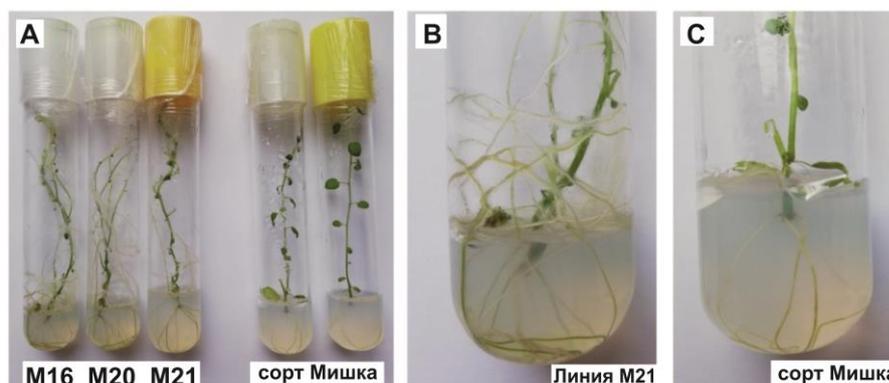


Рисунок 19 – Морфологические эффекты редактирования гена *PHO1a*

Секвенирование редактируемого сайта *PHO1a* показало, что трансгенные линии несут несинонимичную мутацию 782g→t, приводящую к радикальному замещению G261V в N-концевом функциональном домене GT35_Glycogen_Phosphorylase крахмалфосфорилазы, расположенном перед каталитическим центром.

Анализ содержания крахмала в корнях и листьях контроля и отредактированных линий в нормальных условиях роста (21°C) и в ответ на холодовой стресс (4°C) показал существенные различия между линиями, между сортами, между листьями и корнями, и между режимами роста (рис. 20). Анализ профиля экспрессии гена *PHO1a* и генов гидролиза крахмала (β -амилаз *StBAM1*, *StBAM9* и ингибитора амилаз *StAI*) показал, что характер экспрессии генов специфичен для сортов и линий, а также для листьев и корней, в том числе в ответ на пониженные температуры (рис. 21). Изменения в экспрессии генов линия vs. сорт, по всей видимости, являются следствием внесенной мутации в последовательность *PHO1a*. При этом отсутствие закономерностей может отражать индивидуальный характер приспособления линий к изменениям в фосфоролизе крахмала.

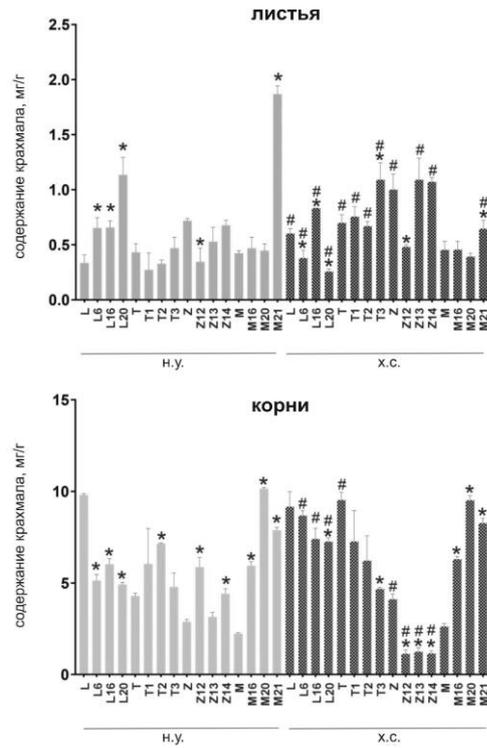


Рисунок 20 – Содержание крахмала у линий картофеля vs. контроль при 21°C (н.у.) и 4°C (х.с.)

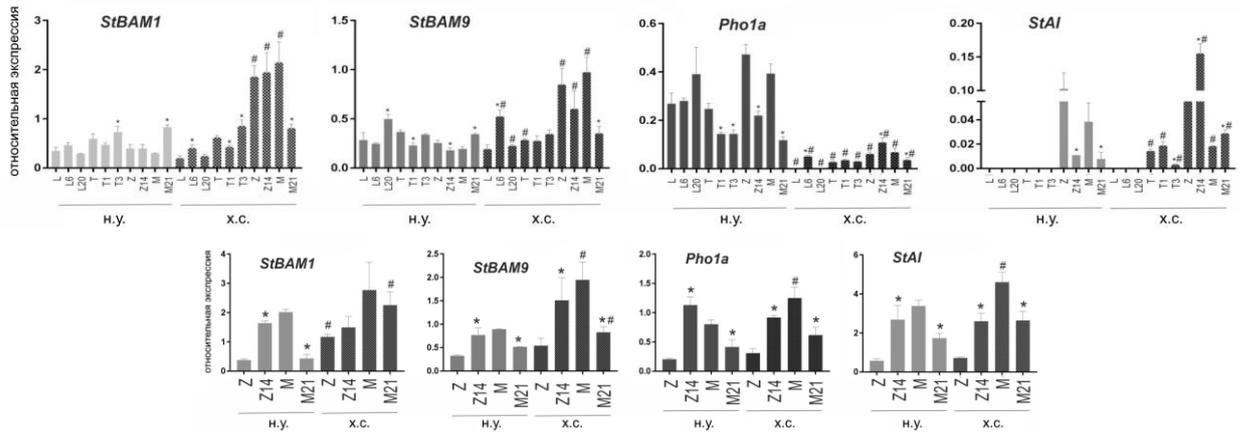


Рисунок 21 – Уровень экспрессии генов катаболизма крахмала в листьях (верх) и корнях (низ) сортов и редактированных линий при 21°C (н.у.) и 4°C (х.с.)

Анализ в тех же тканях экспрессии *MADS-box* генов *StFUL1*, *StFUL2*, *StSOC1* и *StMADS23* обнаружил транскрипты *StFUL1*, 2 и *StMADS23* в большинстве образцов и дифференциальную экспрессию этих генов в ответ на холод (рис. 22), что подтверждает роль *MADS-box* генов активностей А (*StFUL1*, 2) и Е (*StMADS23*) в регуляции метаболизма крахмала.

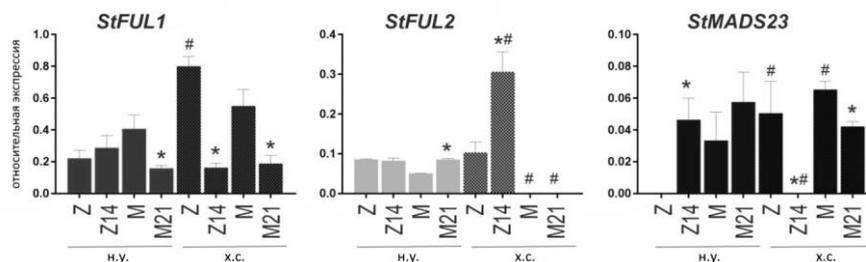


Рисунок 22 – Профиль экспрессии *MADS-box* генов в корнях сортов и линий при 21°C (н.у.) и 4°C (х.с.)

3.2. Экспрессия *MADS-box* генов в трансгенных растениях табака *N. tabacum* с измененным метаболизмом крахмала за счет неполного нокаута гена пластидной крахмалфосфорилазы *NtPHO1-L1*

Было получено 12 трансгенных регенерантов T₀ с кассетой для CRISPR/Cas9-редактирования гена *NtPHO1-L1*, фенотипически не отличающихся от контроля. В последовательности *NtPHO1-L1* были обнаружены 5 вариантов делеций: (1) a13–g17→del(5nt)#; (2) a13–t18→del(6nt)#; (3) a11–g17→del(7nt)#; (4) a/g16–g17→del(2nt)#; (5) a11–t18→del(8nt)#, которые приводят к образованию значительно укороченного белка (1, 3, 4 и 5) или замещению KRY→N (2). Анализ 20 растений T₁ от линии T₀ Nt1 позволил отобрать растения Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15, в геноме которых присутствуют все пять вариантов измененного аллеля *NtPHO1-L1* наряду с аллелем дикого типа. Линии отличались от контроля по ряду параметров (рис. 23), а Nt1-13 и Nt1-15 – заметно более бледной окраской листьев.

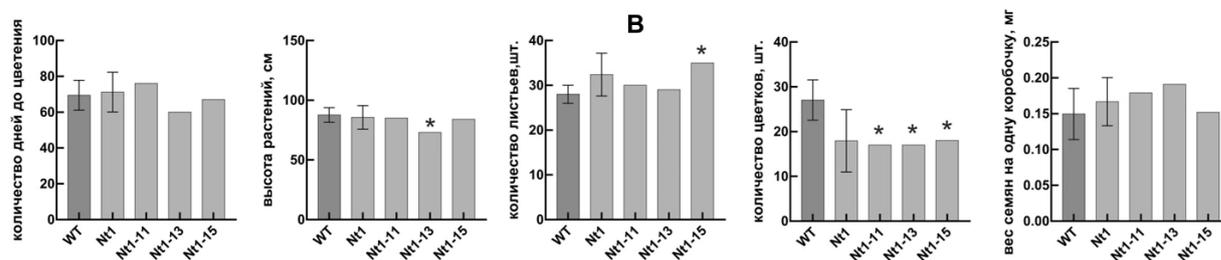


Рисунок 23 – Редактированные линии T₁ Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 в сравнении с контролем WT

В ткани листа у линий было определено содержание каротиноидов (сумма), хлорофиллов (*a* и *b*), крахмала и сахаров (глюкоза, фруктоза, сахароза). Было обнаружено, что содержание пигментов уменьшилось у Nt1-13 и Nt1-15, и у всех трех линий увеличилось количество крахмала и фруктозы (рис. 24). Таким образом, даже неполный нокаут гена *NtPHO1-L1* стимулирует накопление транзиторного крахмала в фотосинтезирующей ткани химерных (по факту редактирования) растений.

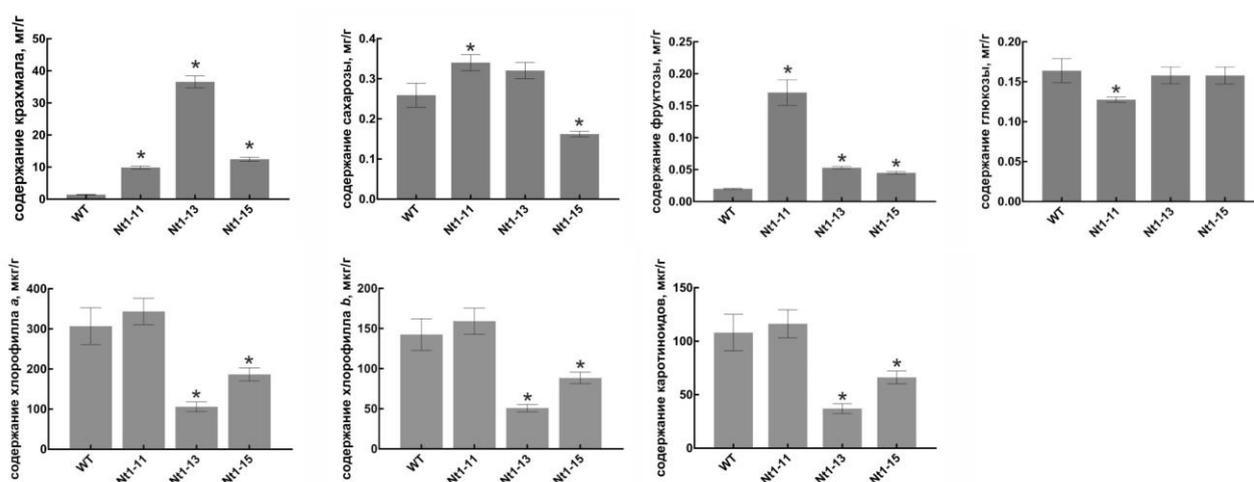


Рисунок 24 – Концентрация пигментов и углеводов в листьях Nt1-11, Nt1-13, Nt1-15 и WT

Анализ экспрессии генов деградации крахмала *NtPHO1-L1*, *NtGWD*, *NtBAM1*, *NtBAM9* и *NtAI* в листьях Nt1-11, Nt1-13 и Nt1-15 показал, что полученный профиль специфичен для каждой линии и отличается от контроля (рис. 25). Это может быть интерпретировано, как

индивидуальная попытка каждой конкретной линии приспособиться к изменению метаболизма крахмала. Анализ экспрессии ключевых генов пути биосинтеза каротиноидов (*NtPSY2*, *NtPDS*, *NtCRTISO*, *NtZDS*, *NtVDE*) также обнаружил существенные отличия редактированных линий от контроля без каких-либо корреляций (рис. 25).

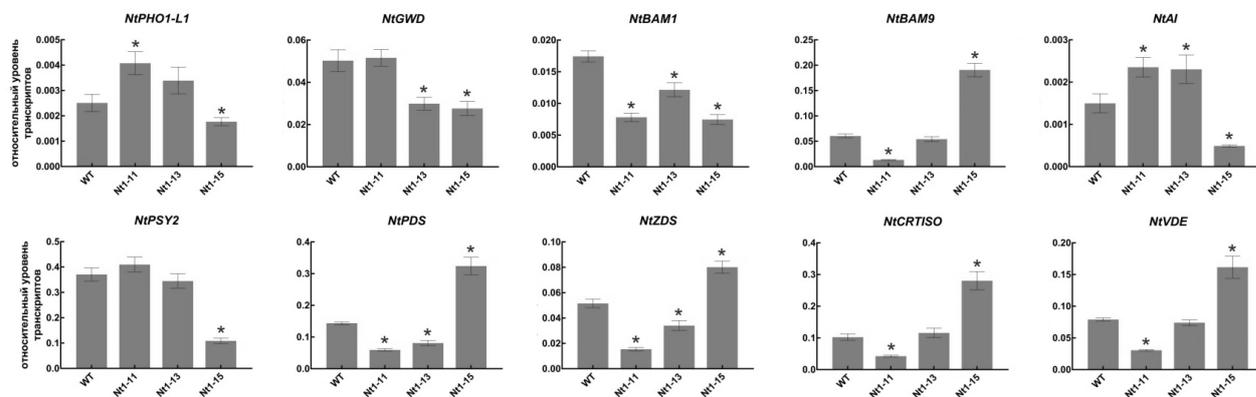


Рисунок 25 – Экспрессия генов деградации крахмала (верх) и биосинтеза каротиноидов (низ) в листьях линий Nt1-11, Nt1-13, Nt1-15 и WT

MADS-доменные ТФ, как известно, участвуют в регуляции генов каротиногенеза и углеводного обмена. Анализ экспрессии четырех *MADS-box* генов (*NtSEP1*, 2, 3, *NtFUL1*) в листьях редактированных линий показал, что транскрипты *NtSEP1*, *NtSEP2* и *NtFUL1* присутствуют у всех образцов, тогда как *NtSEP3* только у Nt1-11 и Nt1-15 (рис. 26). У линии Nt1-13 с наибольшим снижением содержания хлорофиллов/каротиноидов и наибольшим накоплением крахмала уровень транскриптов всех *MADS-box* генов был сопоставим с контролем (рис. 26). Таким образом, неполный нокаут гена *NtPHO1-L1* может изменять метаболизм транзиторного крахмала и пигментов в листьях. В ответ растения изменяют профиль экспрессии *MADS-box* генов подсемейств *SEP* и *FUL* как предположительных регуляторов генов метаболизма углеводов и каротиноидов.

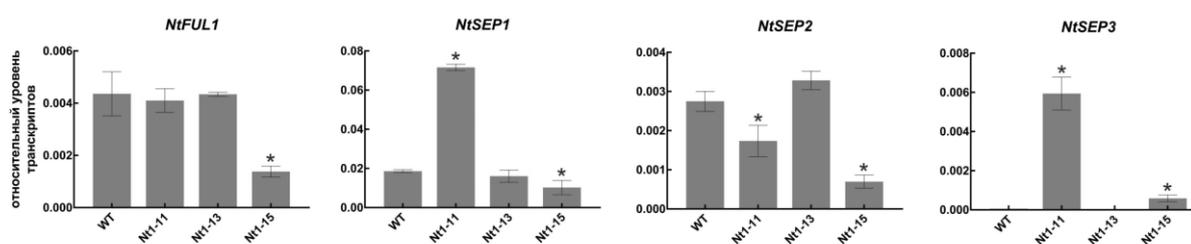


Рисунок 26 – Экспрессия *MADS-box* генов в листьях линий Nt1-11, Nt1-13, Nt1-15 и WT

3.3. Экспрессия *MADS-box* генов в трансгенных растениях табака *N. tabacum* с измененным метаболизмом каротиноидов за счет неполного нокаута гена фитоиндесатуразы *NtPDS*

Кроме генов метаболизма крахмала, известными мишенями MADS-box ТФ является большинство генов метаболизма каротиноидов, которые тоже ассоциированы с приспособлением растений к любым стрессовым условиям. В растениях каротиноиды – это, прежде всего метаболиты, незаменимые для осуществления фотосинтеза и фотозащиты. Отсутствие данных пигментов полностью нарушает фотосинтез, а также наработку провитамина А и фитогормонов (стриголактонов и абсцизовой кислоты (АБК)). Одна из первых

стадий синтеза каротиноидов заключается в преобразовании 15-*цис*-фитоина под действием фитоиндесатуразы PDS, подавление которой приводит к отсутствию каротиноидов, а снижение экспрессии снижает стрессоустойчивость растения.

Нами были получены регенеранты T₀ табака с неполным нокаутом (CRISPR-Cas9) гена PDS, характеризующиеся белой (тип 1), зеленой (тип 2) или мозаичной бело-зеленой (тип 3) окраской листьев (рис. 27). Пигментация линий типа 3 свидетельствовала о химерности растения по нокауту гена. Группа жизнеспособных регенерантов состояла из растений типа 2 (18 линий) и 3 (9), которые имели некоторые морфологические отличия от контроля и делились по времени цветения (рис. 28).



Рисунок 27 – Регенеранты с различной окраской листьев (B, C, E) в сравнении с контролем (A, D)

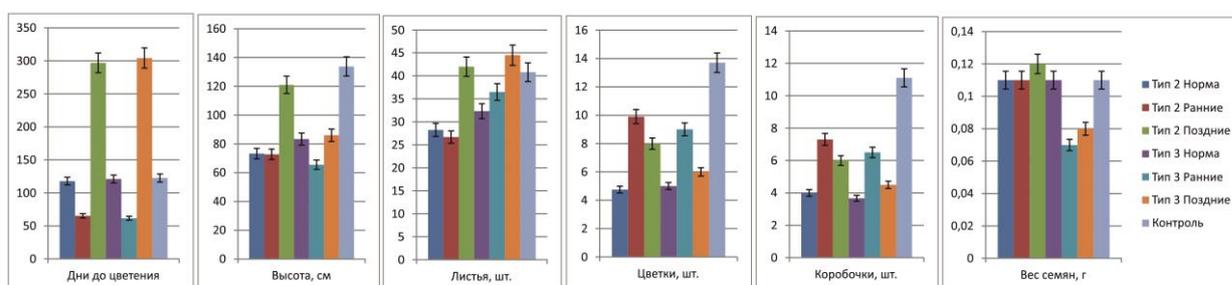


Рисунок 28 – Сравнение характеристик полученных регенерантов табака с контролем

Секвенирование участка редактирования обнаружило 2 SNPs у растений типов 2 и 3, а также три варианта инделей ($t351 \rightarrow del(1nt)\#$, $350^{\wedge}351 \rightarrow ins^{\wedge}g\#$, $350^{\wedge}351 \rightarrow ins^{\wedge}t\#$) в случае типа 3. Все индели приводили к сбою рамки считывания и синтезу укороченного белка.

Анализ регенерантов типа 3 – двух наиболее поздно цветущих линий L28 и L29 (346 и 461 день vs. 122 у контроля), показал существенное снижение количества хлорофиллов и каротиноидов в листьях (рис. 29), что согласовалось с мозаичной окраской листа и могло стать причиной морфологических изменений и сроков цветения.

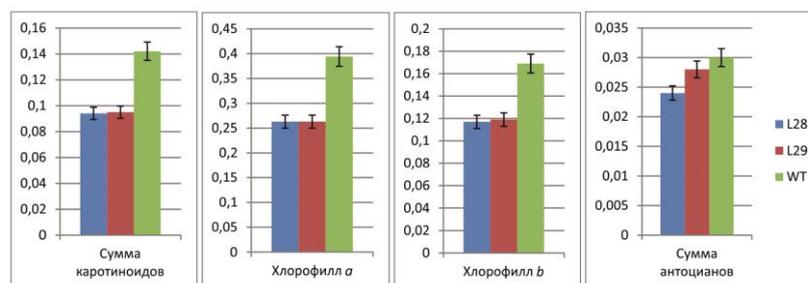


Рисунок 29 – Концентрация (мг/г сырого веса) пигментов в листьях линий L28 и L29

Было показано, что по отношению к контролю уровень транскриптов *NtPDS* снизился (L28) или повысился (L29), *NtCrtRB1* не изменился (L28, L29), *NtPSY2* повысился (L28, L29), а уровень всех остальных генов каротиногенеза увеличился (L29) или не изменился (L28) (рис. 30). Это предполагает индивидуальный характер адаптации каждой из линий к дефициту каротиноидов и фитогормонов как производных каротиноидов (АБК, стриголактоны).

Анализ экспрессии пяти *MADS-box* генов в листьях линий L28 и L29 показал, что только два из них – *NtSEP1* и *NtFUL1*, активны, и значительные отличия от контроля демонстрировал только ген *NtSEP1* (рис. 30), что предполагает участие ТФ NtSEP1 (E-активность) в регуляции генов биосинтеза каротиноидов в листьях табака.

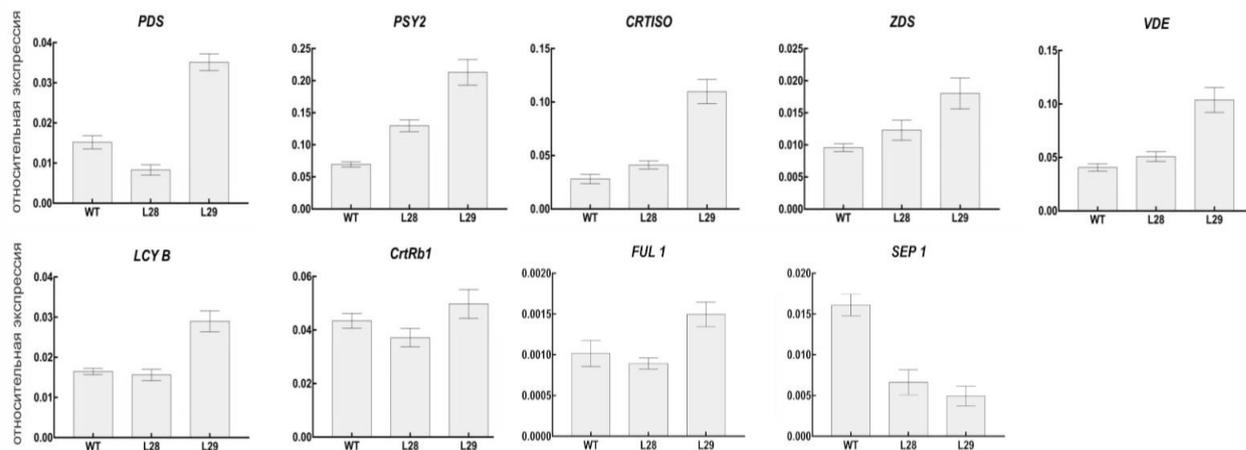


Рисунок 30 – Экспрессия генов биосинтеза каротиноидов и *MADS-box* генов *NtSEP1* и *NtAGL8* в листьях линий L28 и L29

4. Заключение

В диссертационном исследовании была проведена структурно-филогенетическая характеристика семейств генов YABBY-доменных и MADS-доменных (МИКС^c) ТФ у видов растений сем Solanaceae (томат, табак, др.), Asteraceae (хризантема, подсолнечник) и Ericaceae (подъельник). Функционально охарактеризованы отдельные гены YABBY и MADS-box, которые предположительно выполняют наиболее важные роли в развитии растения, а именно, гены YABBY, представляющие подсемейство FIL как наиболее многочисленное и древнее, а также MADS-box гены, ассоциированные с выполнением генетических активностей В, С и Е. С этой целью получены и охарактеризованы трансгенные растения табака со сверхэкспрессией (индивидуальной или комбинаторной) данных генов.

На основании полученных результатов сделан вывод о том, что гены подсемейства FIL подъельника (*MhyFIL1*, *MhyFIL3*) и хризантемы (*CDM51*) участвуют в определении асимметричного развития листа и, в случае подъельника, сохранили свои функции, несмотря на отсутствие у данного вида листьев. Наблюдаемые изменения фенотипа растений со сверхэкспрессией генов MADS-box подтвердили, что гены *CDM44* и *SIMADS5* (Е-активность) играют роль в закладке лепестков и репродуктивных органов, *CDM37*, *HAM45* и *HAM59* (С-активность) – пестика и семязачатков, а *CDM86* и *CDM115* (В-активность) – лепестков и тычинок. Полученные нами данные свидетельствуют о высокой консервативности генетических механизмов контроля процессов развития у видов растений.

Проведен анализ возможного участия MADS-box генов в регуляции адаптивной реакции растения при воздействии абиотических стрессовых факторов (холод, нарушение углеводного обмена или биосинтеза каротиноидов). Показано, что растения со сверхэкспрессией гена *CDM44* обладают повышенной холодостойкостью при обработке пониженными температурами в процессе роста. Получены трансгенные растения табака и картофеля с нарушенным метаболизмом крахмала или каротиноидов за счет редактирования (нокаут или мутация) генов соответствующих путей (в случае крахмала – ген крахмалфосфорилазы *PHO1a/NtPHO-L1*; в случае каротиноидов – ген фитоиндесатуразы *PDS*). Показано, что введенные метаболические нарушения сопровождаются дифференциальной экспрессией MADS-box генов подсемейств *SEP* и *FUL*, что говорит о возможной роли этих генов в регуляции сигнальных путей стрессового ответа растения.

Фундаментальная значимость результатов связана с научным вкладом в исследования механизмов регуляции морфогенеза растений. Практическая ценность заключается в том, что функции исследуемых MADS-box и YABBY генов ассоциированы с различными хозяйственно-ценными признаками сельскохозяйственных культур, такими как сроки цветения и созревания, урожайность, характеристики плодов и семян, стрессоустойчивость, разнообразие фенотипов цветка декоративных видов (MADS-box), а также морфологией вегетативной надземной части растения, формой плода, количеством семян (YABBY). Поэтому данные об аллельной вариативности и/или дифференциальной экспрессии YABBY и MADS-box генов между сортами и линиями одной культуры могут быть использованы для поиска перспективных источников целевых признаков в селекции новых улучшенных сортов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что *YABBY*-гены *MhyFIL1*, *MhyFIL3* (подъельник) и *CDM51* (хризантема) кодируют ортологи ТФ подсемейства FILAMENTOUS FLOWER и могут определять асимметричное развитие листьев и апикальной меристемы побега подъельника и хризантемы.
2. Показано, что гены подъельника *MhyFIL1* и *MhyFIL3* сохранили свою функцию, несмотря на отсутствие листьев у вида *Monotropa hypopitys*.
3. Установлено, что *MADS-box* гены *CDM44* (хризантема) и *SIMADS5* (томат) кодируют ортологи ТФ подсемейства SEPALLATA3 и могут определять идентичность лепестков, тычинок и пестика цветка у хризантемы и томата (Е-активность), а также регулировать созревание плода (*CDM44*) и биосинтез каротиноидов/антоцианов (*SIMADS5*).
4. Установлено, что *MADS-box* гены *CDM37* (хризантема), *HAM45* и *HAM59* (подсолнечник) кодируют ортологи ТФ подсемейства AGAMOUS и могут участвовать в дифференцировке цветковой меристемы, тычинок и пестика у хризантемы и подсолнечника (С-активность).
5. Установлено, что *MADS-box* гены *CDM86* и *CDM115* хризантемы кодируют ортологи ТФ подсемейств PISTILLATA и APETALA3, соответственно, и могут в составе гетеродимера определять идентичность лепестков и тычинок цветка у хризантемы (В-активность).
6. Показано, что сверхэкспрессия *MADS-box* гена *CDM44* (хризантема) приводит к повышенной холодостойкости трансгенных растений табака.
7. Показано, что *MADS-box* гены подсемейств SEPALLATA и FRUITFULL могут участвовать в регуляции стрессового ответа растений, в том числе посредством регуляции экспрессии генов метаболизма крахмала и каротиноидов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Nezhdanova A.V., Kulakova A.V., Slugina M.A., et al. Effect of partial knockout of the plastid starch phosphorylase gene *NtPHO1-L1* on the metabolism of carbohydrates and carotenoids in *Nicotiana tabacum* L. leaves // Russian Journal of plant physiology. – 2024. – Т. 71. – №. 163.
2. Нежданова А. В., Слугина М. А., Кулакова А. В., и др. Влияние мозаичного нокаутирования гена фитоиндесатуразы *NtPDS* на биосинтез каротиноидов у *Nicotiana tabacum* L // Физиология растений. – 2023. – Т. 70. – №. 6. – С. 601–611.
3. Nezhdanova A. V., Efremov G. I., Slugina M. A., et al. Effect of a radical mutation in plastidic starch phosphorylase PHO1a on potato growth and cold stress response // Horticulturae. – 2022. – Т. 8. – №. 8. – С. 730.
4. Nezhdanova A. V., Kamionskaya A. M., Shulga O. A., Shchennikova A. V. Chrysanthemum *SEP3*-like gene *CDM44* overexpression does not affect transgenic tobacco flowering, whereas enhances its tolerance to cold stress // FEBS Open Bio. – 2021. – Т. 11. – №. S1. – С. 287.
5. Slugina M., Nezhdanova A., Dyachenko E., Shchennikova A. Constitutive expression of tomato TF *LeMADS5* gene in tobacco plants alters flower morphology // FEBS Open Bio. – 2021. – Т. 11. – №. S1. – С. 287.
6. Нежданова А. В., Щенникова А. В. Факторы транскрипции семейства MADS растений: связь с признаками доместикиции и перспективы для селекции (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – №. 5. – С. 823–842.
7. Нежданова А. В., Слугина М. А., Дьяченко Е. А., и др. Структурно-функциональный анализ MADS-бок гена *SIMADS5* томата *Solanum lycopersicum* L // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2021. – Т. 25. – №. 5. – С. 492–501.
8. Щенникова А. В., Камионская, А. М., Нежданова, А. В., и др. Факторы транскрипции MhyFIL1 и MhyFIL3 (*Monotropa hypopitys*) определяют асимметричное развитие боковых органов надземной части растения // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №. 4. – С. 405–411.

Публикации в других изданиях, тезисы докладов

1. Нежданова А.В., Щенникова А.В. Эффекты гетерологичной экспрессии генов транскрипционных факторов (*MADS-box*, *YABBY*) и редактирования генов метаболизма (*PHO1a*, *PDS*) на особенности регуляции онтогенеза *Nicotiana tabacum* и *Solanum tuberosum* // XXIV Всероссийская молодежная научная конференция с международным участием «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». Тезисы докладов. – 2024. – С.
2. Кочиева Е.З., Слугина М.А., Нежданова А.В., и др. Эффект CRISPR/Cas9 редактирования пластидной крахмалфосфорилазы PHO1a у сортов картофеля *Solanum tuberosum* L. // Тезисы докладов конгресса CRISPR-2023. Гены и клетки. – 2023. – Т. XVIII – С. 20–21.
3. Нежданова А.В., Щенникова А.В. Получение растений табака *Nicotiana tabacum* L. с отредактированным геном крахмал-фосфорилазы PHO1a // X Съезд общества физиологов растений России. Всероссийская научная конференция с международным участием. Тезисы докладов. – 2023. – С. 267–267
4. Нежданова А.В., Щенникова А.В. CRISPR/Cas9 нокаут гена фитоиндесатуразы PDS в геноме табака *Nicotiana tabacum* L. блокирует биосинтез каротиноидов в листьях //

Сборник тезисов 26-ой Пущинской школы-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века». – 2023. – С. 298–299.

5. Нежданова А. В., Ефремов Г. И., Кочиева Е. З., и др. Получение редактированных растений картофеля с измененным метаболизмом сахарозы // Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Тезисы докладов. – 2022. – С. 223–224.

6. Нежданова А. В., Щенникова А. В. Влияние редактированной пластидной крахмалфосфорилазы PHO1A на развитие и стрессовый ответ растений картофеля // Тезисы докладов X Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». Актуальная биотехнология. – 2022. – №. 1. – С. 63–65.

7. Нежданова А. В., Камионская А. М., Щенникова А. В. Идентификация и характеристика семейства генов MADS-box перца *Capsicum annuum* L. // Тезисы докладов IX Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». Актуальная биотехнология. – 2021. – №. 1. – С. 87–90.

8. Нежданова А. В., Слугина М. А., Ефремов Г. И., и др. Получение растений картофеля с редактированным геномом и измененным метаболизмом крахмала. // Международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Тезисы докладов. – 2021. – С. 363–365.

9. Nezhdanova A. V., Slugina M. A., Dyachenko E., et al. Functional analysis of *Solanum lycopersicum* L. MADS-box gene *SIMADS5* // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. Тезисы докладов. – 2021. – С. 156–156.

10. Нежданова А. В., Камионская А. М., Щенникова А. В. Суперэкспрессия гена хризантемы *CDM44* повышает устойчивость растений табака к пониженным температурам // Тезисы докладов VIII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». Актуальная биотехнология. – 2020. – №. 3. – С. 193–194.

11. Нежданова А. В., Камионская А. М., Слугина М. А., и др. Получение растений табака с редактированным геномом: оценка влияния выключения активности гена фитодесатуразы на развитие растения // Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Тезисы докладов. – 2020. – С. 346–349.

12. Нежданова А. В., Камионская А. М., Щенникова А. В. Совместная оверэкспрессия генов хризантемы *CDM86*, *CDM115* и *CDM37* изменяет идентичность всех органов цветка и снижает фертильность табака // Тезисы докладов VII Международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика». Актуальная биотехнология. – 2019. – №. 3. – С. 69–71.

13. Nezhdanova A. V., Shchennikova A. V., Kamionskaya A. M. Characteristics of transgenic *Nicotiana tabacum* plants with ectopic expression of chrysanthemum MADS-box genes // Тезисы докладов XI-ой Международной научно-практической конференции, приуроченной к 60-летию со дня образования РУДН «Инновационные процессы в сельском хозяйстве». Innovative in Agriculture. – 2019. – С. 82–83.

14. Нежданова А. В., Щенникова А. В., Скрябин К. Г. *YABBY*-гены полярного развития листьев, сохранили свою функцию у растения без листьев-микогетеротрофа *Monotropa hypopitys* // 19-я Всероссийская конференция молодых учёных «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». Тезисы докладов. – 2019. – С. 50–51.