



- Салтыков А.Н.* Естественное возобновление дуба скального и сосны крымской под пологом искусственно созданных насаждений внутрикуэстовых ландшафтов лесостепного предгорья Крыма .....136
- Saltykov A.N.* Natural reproduction of sessile oak and Crimean pine under the canopy of artificially created plantings of intra-cuesta landscapes of the forest-steppe foothills of the Crimea
- Турчин Т.Я., Банникова О.А.* Состояние опытных культур вяза приземистого и лоха узколистного в полупустынной зоне Республики Калмыкия и расчет алгоритма их дополнения .....136
- Turchin T.Ya., Bannikova O.A.* The state of the experimental cultures of the low-growing elm and the narrow-leaved larch in the semi-desert zone of the Republic of Kalmykia and the calculation of their supplemental algorithm
- Селиховкин А.В., Варенцова Е.Ю., Демчук А.С., Мандельштам М.Ю., Мамаев Н.А., Мартирова М.Б., Шабурова Е.А.* Контроль численности короэда-типографа на локальных участках лесного фонда .....148
- Selikhovkin A.V., Varentsova E.Yu., Demchuk A.S., Mandelshtam M.Yu., Mamaev N.A., Martirova M.B., Shaburova E.A.* Control of European spruce bark beetle population in local forest areas
- Яковенко Н.В., Турчанинова Е.В.* Пространственно-временная структура встречаемости сов (Strigidae) на территории Воронежской области и сопредельных регионов в 2019–2023 гг. ....164
- Yakovenko N.V., Turchaninova E.V.* Spatio-temporal structure of owl (Strigidae) occurrence in the Voronezh region and adjacent regions in 2019–2023



DOI: 10.21178/2079–6080.2026.1.5  
УДК 630.165:575.826:630\*235.2

## Результаты секвенирования клонов осины, подвергшихся процедуре редактирования гена *LEAFY*

© Д.С. Каржаев<sup>1</sup>, М.В. Тис<sup>1</sup>, Д.А. Шабунин<sup>1</sup>, О.Ю. Бутенко<sup>1</sup>, Е.К. Потоккина<sup>1,2</sup>

### Results of sequencing of aspen clones after editing of the *LEAFY* gene

**D.S. Karzhaev, M.V. Tis, D.A. Shabunin, O.Yu. Butenko, E.K. Potokina** (Saint-Petersburg Forestry Research Institute; Saint-Petersburg State Forest Technical University named after S.M. Kirov)

In most countries, the improvement of tree species traits still relies on traditional classical breeding methods, whereas in some developed or leading countries, this challenge is increasingly addressed by employing genetic engineering techniques. The first research into genetically modifying trees began in the United States in 1987, while the large-scale industrial application of genetically modified trees was first introduced in China in 2002. However, there are concerns regarding the potential uncontrolled spread of modified trees and their possible displacement of natural species. This study aimed at selecting aspen lines with an edited region of the *LEAFY* gene, known for its involvement in the formation of inflorescences. Genotyping was performed on 227 samples of genetically modified aspen clones. A genomic library was created for sequencing using 250 bp paired-end MiSeq (Illumina, USA) protocols. Software were used: FastQC is used for a quality control of high throughput sequence data, Trimmomatic – a flexible read trimming tool for Illumina NGS data and CRISPResso2 – for the analyzing deep sequencing data, enabling rapid and intuitive interpretation of genome editing experiments. Some samples exhibited alleles with induced polymorphism at the target locus. Additionally, samples containing a two-nucleotide deletion (GA/-) at the target site were identified. Samples with the mutations described above are chimeric. Sequencing revealed that CRISPR/Cas9-induced mutations in the target gene occurred in seven plants. These plants serve as candidates for additional studies and vegetative reproduction to develop experimental forest cultures.

**Key words:** *Populus tremula*, genomic editing, blossom, sequencing, *in vitro*

**Результаты секвенирования клонов осины, подвергшихся процедуре редактирования гена *LEAFY*****Д.С. Каржаев, М.В. Тис, Д.А. Шабунин, О.Ю. Бутенко, Е.К. Потокينا**

Улучшение свойств древесных пород в большинстве стран по-прежнему происходит с помощью средств классической селекционной работы, однако в передовых — эта проблема решается уже с помощью методов геномной инженерии. Первые исследования в области генетической модификации деревьев начались в 1987 году в США, а массовое промышленное применение генетически модифицированных деревьев впервые было реализовано в Китае в 2002 году. Однако существуют опасения неконтролируемого распространения модифицированных деревьев и вытеснения ими естественных видов. В связи с чем целью данной работы было проведение отбора линий осины с отредактированным участком гена *LEAFY*, который участвует в формировании соцветий. Для этого было проведено генотипирование 227 образцов из коллекции клонов осины, подвергнутых процедуре редактирования, а затем создана ДНК-библиотека, секвенирование которой проводилось на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в режиме парных прочтений с длиной 250 п.н. Анализ качества полученных данных проводился с помощью пакета FastQC, тримминг прочтений — с использованием программы Trimmomatic, а анализ результатов секвенирования — с помощью пайплайна CRISPResso2. Были обнаружены образцы, которые содержали аллели, имеющие индуцированный полиморфизм в целевом локусе. А также были обнаружены растения, содержащие делецию в два нуклеотида (GA/-) в целевом сайте. Полученные данные свидетельствуют о том, что образцы, несущие описанные мутации, являются химерными. В итоге по данным секвенирования у 7 растений были идентифицированы CRISPR/Cas9-индуцированные мутации в целевом гене. Эти растения являются кандидатами для дальнейших экспериментов и вегетативного размножения с целью создания экспериментальных лесных культур.

**Ключевые слова:** осина, геномное редактирование, цветение, секвенирование, *in vitro*

Каржаев Дмитрий Сергеевич — науч. сотр. НИО генетики и биотехнологий, аспирант  
E-mail: karzaevd@gmail.com

Тис Маргарита Витальевна — лаборант-исследователь НИО генетики и биотехнологий, аспирант  
E-mail: mtis.lab@mail.ru

Шабунин Дмитрий Александрович — вед. науч. сотр. НИО селекции, воспроизводства и химического ухода за лесом, канд. биол. наук  
E-mail: ds1512@mail.ru

Бутенко Олеся Юрьевна — ст. науч. сотр. НИО селекции, воспроизводства и химического ухода за лесом, канд. с.-х. наук  
E-mail: din\_don@bk.ru

Потокина Елена Кирилловна — ведущий научный сотрудник НИО генетики и биотехнологии; профессор кафедры лесных культур; д-р биол. наук  
E-mail: e.potokina@yahoo.com

<sup>1</sup>ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»  
194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21  
Телефон: +7 (812) 552–80–21

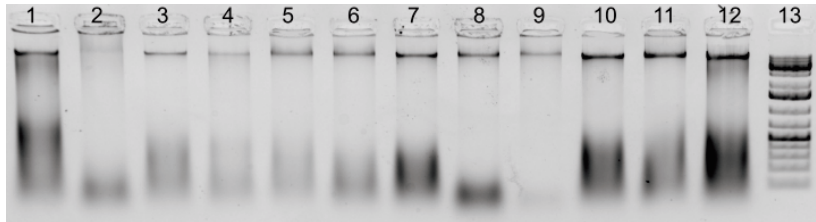
<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова  
194021 Санкт-Петербург, Институтский пер., д. 5, лит. У  
Телефон: (812) 217–92–46



трофореграмма получалась с помощью системы гель-документации ChemiDoc MP (BioRad, США). Для визуализации распределения ДНК в качестве интеркалирующего красителя использовался бромистый этидий. По результатам их анализа образцы, имеющие высокомолекулярный продукт размером > 20000 п.о. считались высокомолекулярными

и подходящими для следующего этапа исследования.

На рисунке 2 представлена электрофореграмма 12 образцов выделенной ДНК. В верхней части каждой из дорожек присутствует высокомолекулярная фракция, размером около 20000 п.о., ее наличие указывает на успешность выделения препарата ДНК.



1–12 – образцы ДНК осины; 13 – маркер длин ДНК 1000 п.о.

Рис. 2. Электрофореграмма образцов ДНК осин

*Описание ДНК-библиотеки для секвенирования участка генома клонов осины, подвергшегося процедуре редактирования*

Секвенирование ДНК-библиотеки проводилось на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq (Illumina, США) в режиме парных прочтений с длиной 250 п.н. Баркодирование образцов проводилось с использованием метода GTseq [4]. При подготовке библиотеки целевой участок отредактированного гена *LEAFY* обогащался с помощью ПЦР-реакции

с использованием специфичных праймеров, которые на 5'-конце содержали адаптеры, гомологичные последовательности 3'-конца баркодов GTseq. Во всех процедурах подготовки ДНК-библиотеки использовалась высокоточная ДНК-полимераза Phusion HF (табл. 1).

В качестве матрицы для проведения первой ПЦР использовали 2 мкл выделенной ДНК. Амплификация проводилась согласно протоколу, представленному в таблице 2.

Таблица 1

Состав ПЦР-смесей для подготовки библиотеки методом GTseq

Название компонента	Объем для одного образца, мкл	
	ПЦР-смесь-1	ПЦР-смесь-2
H <sub>2</sub> O	16,0	3,6
X5 Буффер	5,0	1,0
X25 dNTP	0,5	0,2
Праймер F	0,5	1,0
Праймер R	0,5	0,2
Phusion HF	0,5	3,6

Таблица 2

Программа первой ПЦР для подготовки библиотеки методом GTseq

Количество циклов	Температура, °C	Время, с
1	95	900
	95	30
	57 (Ramp up 5 %)	30
5	72	60
	95	30
	62	30
10	72	30
	72	300
1	4	∞

Продукт, полученный в первой ПЦР, разводили в 5 раз и использовали в качестве матрицы для обогащения отдельных образцов библиотеки баркодами GTseq. Каждый из них кодировался уникальной парой 8-нуклеотидных баркодов. Для этого и для добавления к ним адаптеров для секвенирования была выполнена вторая ПЦР (состав смеси представлен в табл. 1), проведение которой возможно благодаря наличию комплементарного перекрывающегося участка амплифицированного со специфичного праймера в ходе первой ПЦР.

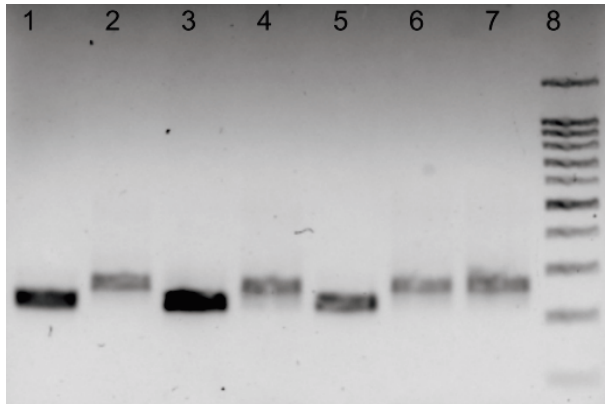
В каждую отдельную лунку ПЦР-платы с образцом добавлялся 1 мкл уникального прямого праймера, несущего баркод и адаптер Illumina. В качестве матрицы для проведения второй ПЦР использовали 3 мкл разведенной ДНК-матрицы – продукт первой ПЦР. Амплификация проводилась согласно протоколу, представленному в таблице 2.

В ходе обеих ПЦР был обогащен отредактированный локус, а также каждый образец был закодирован GTseq баркодом и к каждому из них был добавлен адаптер

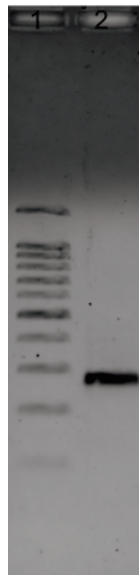
для мостиковой ПЦР, необходимый для проведения секвенирования на платформе Illumina.

Успешность обогащения ДНК-библиотеки оценивалась по изменению длины продукта методом гель-электрофореза. Библиотека на различных этапах подготовки имеет различный молекулярный размер, по его изменению можно определить успешность проведения каждого из этапов. На рисунке 3 представлена электрофореграмма ДНК-библиотеки на различных этапах подготовки, которая после первого имеет размер около 210 п.о. и находится на снимке ниже, чем продукт после второго, который имеет размер около 250 п.о.

После проверки успешности увеличения размера продуктов все образцы (по 2 мкл от каждого) смешивались в одной пробирке и переносились в стерильную 1,5 мл пробирку. Далее они очищались с помощью 0,8 объема магнитных частиц VANTIS (Vazime, Китай) согласно стандартному протоколу. Электрофорез готовой ДНК-библиотеки представлен на рисунке 4.



1, 3, 5 – образцы после первого этапа подготовки библиотеки;  
2, 4, 6, 7 – образцы после второго этапа подготовки библиотеки; 8 – молекулярный стандарт 100 п.о.  
Рис. 3. Электрофореграмма образцов на разных стадиях подготовки ДНК-библиотеки



1 – молекулярный стандарт 100 п.о.; 2 – объединенная ДНК-библиотека  
Рис. 4. Электрофореграмма ДНК-библиотеки из 227 образцов после очистки магнитными частицами

**Результаты исследования**

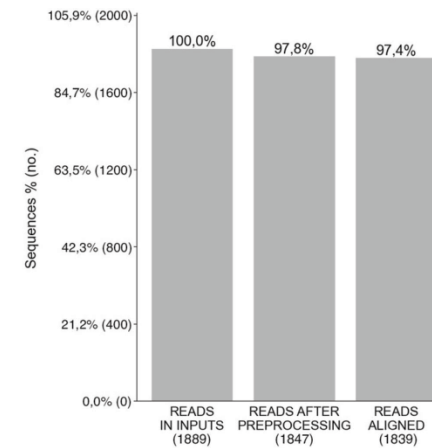
Анализ качества полученных данных, выполненный с помощью пакета FastQC [1] по отдельным образцам, показал, что запуск секвенатора прошёл успешно, качество прочтений удовлетворяет требованиям.

Далее был проведён тримминг прочтений с использованием программы Trimmomatic [2], благодаря которой были удалены прочтения низкого качества. После чего среднее значение качества прочтений по шкале Phred

для большинства из них составляло 35–36 и успешно прошли этот фильтр около 93 % пар прочтений для каждого рассмотренного образца.

Следующим этапом работы стал анализ результатов секвенирования с помощью пайплайна CRISPResso2, разработанного для анализа и интерпретации результатов экспериментов по геномному редактированию [5].

На рисунке 5 представлены гистограммы количества прочтений одного из анализируемых образцов на разных этапах обработки.



Число прочтений одного из образцов в исходных данных (слева), после предварительной обработки (посередине) и после выравнивания на референсную последовательность (справа). По вертикальной оси отложено количество прочтений. (График сгенерирован в программе CRISPResso2)

Рис. 5. Гистограмма количества прочтений одного из анализируемых образцов на разных этапах обработки

Для всех образцов соотношение количества прочтений на разных этапах было приблизительно одинаковым, близким к представленному на данном рисунке. Около 2 % из них были отфильтрованы на этапе предварительной обработки, после чего более 99 % прошедших фильтр прочтений были успешно выровнены на референс.

Затем с учётом биологических свойств белка Cas9 и структуры исследуемого ам-

пликона подводилась статистика по процентному соотношению модифицированных и немодифицированных прочтений. Первая группа включает в себя прочтения, содержащие изменения в последовательности, которые находятся в пределах прогнозируемого окна, а вторая – прочтения, идентичные референсу гена и прочтения, содержащие незначительные изменения, удалённые от сайта разреза.

Последовательности, содержащие модификации в целевом регионе, могут указывать на то, что образец имеет клетки, несущие редактированную аллель гена *LEAFY*. Незначительное количество таких прочтений также может возникать в результате ошибок секвенирования. В случае, если только часть клеток каллуса, из которых образовывался регенерант, подверглась редактированию, возможно возникновение мозаицизма, приводя-

щее к формированию растений-химер.

На рисунке 6 представлен фрагмент таблицы встречаемости аллелей, отражающей результаты выравнивания для одного из образцов, не подвергшихся редактированию.

На рисунке 7 представлен фрагмент таблицы встречаемости аллелей, отражающей результаты выравнивания для химерного образца.

Aligned_Sequence	Unedited	n_deleted	n_inserted	n_mutated	#Reads	%Reads
AAAGATCACAGAGAGAGAGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1826	99.85
AAAGATCACAGAGAGAGTGC AAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAAGATCACGGAGAGAGAGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAAGGTCACAGAGAGAGAGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05

“True” – прочтения не содержат существенных изменений в целевом участке. Столбцы 3–5 отражают количество мутаций, входящих в окно количественной оценки. (Таблица сгенерирована в программе CRISPResso2)

Рис. 6. Фрагмент таблицы встречаемости аллелей в целевом участке у растения, не имеющего успешно отредактированной аллели

Aligned_Sequence	Unedited	n_deleted	n_inserted	n_mutated	#Reads	%Reads
AAAGATCACAGAGAGAGAGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	2123	97.61
AAAGATCACAGAGAGAGAGTCAAGGGGGCAGATAGATATG	False	0	0	1	34	1.56
AAAGATCACAGAGAGAGAGACAAGGGGGCCGATAGATATG	True	0	0	0	2	0.09
AAAGATCACAGAGAGAGAGACAAGGGGGCAGCTAGATATG	True	0	0	0	2	0.09
AAAGATCACAGAGAGAGAGACACGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	2	0.09
AAAGATCACAGAGAGAGAGACAAGGGGGCCAGATAGATATG	True	0	0	0	2	0.09
AAAGATCACAGAGAGAGAGACAAGGGGGCCGATGATATG	True	0	0	0	2	0.09
AAAGATCACAGAGAGAGAGACGAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAAGGTCACAGAGAGAGGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAAGATCACAGAGAGAAAGACAAGGGGGCTGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAAGATCACAGAGAGA-AGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAAGATCACAGAGAAAGAGACAAGGTGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAATATCACAGAGATAGAGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAATATCACAGAGCGAGAGACAAGGGGGCATATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05
AAATATCACAGAGGAGAGACAAGGGGGCAGATAGATATG	True	0	0	0	1	0.05

“True” – прочтения не содержат существенных изменений в целевом участке, “False” – классифицируются как модифицированные прочтения. Столбцы 3–5 отражают количество мутаций, входящих в окно количественной оценки. (Таблица сгенерирована в программе CRISPResso2)

Рис. 7. Фрагмент таблицы встречаемости аллелей в целевом участке у растения, несущего индуцированный полиморфизм (A/T)

Анализ рисунков 6 и 7 демонстрирует, что наиболее часто встречается идентичная референсной последовательность, а также множество, незначительно отличающихся от нее. Эти последовательности возникают из-за ошибок ПЦР и секвенирования. На рисунке 7 представлена частота встречаемости аллелей у образца S97, имеющего индуцированный полиморфизм в целевом локусе. Он поддержан значительным количеством прочтений по сравнению с другими вариантами.

В результате анализа полученных данных также были обнаружены растения, содержащие делецию в два нуклеотида (GA/-) в целевом сайте.

Мы предполагаем, что образцы, несущие описанные мутации, являются химерными, то есть лишь часть клеток, из которых образовался регенерант, была успешно отредактирована. При этом количество прочтений не характеризует действительного количества отредактированных клеток из-за смещения продуктов ПЦР в сторону более представленных последовательностей. Это происходит из-за экспоненциального увеличения продуктов ПЦР, на каждом этапе подготовки библиотеки, обогащения целевого локуса, баркодирования и секвенирования с помощью мостиковой ПЦР.

Низкая эффективность биобаллистического метода редактирования, обусловленная случайным характером доставки РНП в клетки каллуса, приводит к большому количеству немодифицированных клеток. Вследствие этого все полученные растения-мутанты об-

ладают мозаичностью. Высокая частота химеризма также наблюдалась при редактировании других древесных пород и согласуется с литературными данными [8].

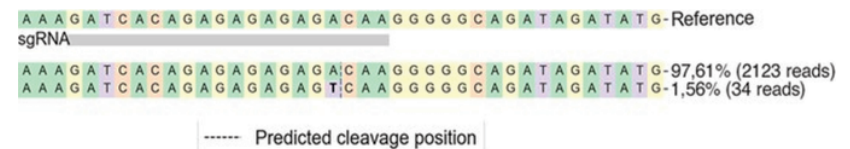
На текущий момент метод биобаллистической доставки РНП был использован для редактирования генома лишь у двух древесных пород – ливневницы и сосны веймутовой [9, 10]. Для первой также отмечена невысокая эффективность редактирования – 1,423 и 2,136 % для двух различных направляющих.

В то же время эти два исследования имеют существенное отличие от проведенного нами эксперимента. В качестве мишени для обстрела в них использовали соматические зародыши, из которых в дальнейшем получали эмбрионный каллус, в то время как мы обстреливали вегетативные каллусы, из-за чего данные об эффективности редактирования трудно соотносить с нашими результатами.

На рисунке 8 приведена визуализация двух наиболее встречаемых аллелей в данных прочтений образца S97 в сравнении с референсной последовательностью.

На рисунке 9 приведена визуализация двух наиболее встречаемых аллелей в данных прочтений образца S520 в сравнении с референсной последовательностью.

Последовательность PAM (мотив, смежный с протоспейсером), которая узнается белком Cas9, представляет собой участок из трёх нуклеотидов GGG, прилегающих к последовательности геновой РНК, как отражено на рисунках 8 и 9.



Каждый вид нуклеотидов обозначен цветом, справа – количество прочтений той или иной аллели. Вертикальная пунктирная линия представляет собой место ожидаемого разреза последовательности белком Cas9. (Изображение сгенерировано в программе CRISPResso2)

Рис. 8. Наиболее часто встречаемые варианты аллели в отредактированном образце S97

