



ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034
тел./факс 328-97-88
<http://www.spbu.ru>
ОКПО 02068516 ОГРН 1037800006089
ИНН/КПП 7801002274/780101001

Генеральному директору
ООО «СоюзСемСвекла»
Р.В. Бердникову

п. ВНИИСС, д.81
Воронежская область, 396030
Рамонский район

16.10.2024 № 01/1-39-13923

на № _____ от _____

О направлении отчёта о НИР

Уважаемый Роман Владимирович!

Настоящим Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» направляет в Ваш адрес отчётные документы по II этапу договора на НИР от 20.05.2024 № от 20-05/2024 по теме: «Разработка молекулярных маркеров, ассоциированных с признаком «размер корнеплода» у сахарной свеклы, изучение влияния генов-регуляторов развития корнеплода на формирование урожайности сахарной свеклы».

Приложение: Отчет о НИР на 15 л. в 1 экз.

и.о. Проректор по научной работе



Е. В. Лебедева
С. В. Микушев
15.10.2024

Богданова Ольга Александровна, o.bogdanova@spbu.ru

ПРАВИТЕЛЬСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
(СПбГУ)

УДК 575.1



СВЕРЖДАЮ

Директор по научной работе

С.В. Микушев

2024 г.

Е.В. Лебедева
15.10.2024

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
по договору на НИР № 20-05/2024 от 20.05.2024

«Разработка молекулярных маркеров, ассоциированных с признаком «размер корнеплода» у сахарной свеклы, изучение влияния генов-регуляторов развития корнеплода на формирование урожайности сахарной свеклы»


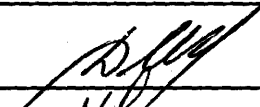
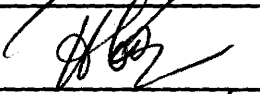
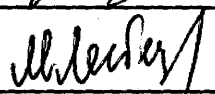
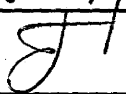



(промежуточный, 2 этап)

Руководитель НИР:
д.б.н., профессор Кафедры генетики
и биотехнологии

Л.А. Лутова

Санкт-Петербург
2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

<p align="center">Руководитель темы</p> <p align="center">д.б.н., профессор кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ</p> <p align="center">Л.А. Лутова</p>	 <p align="center">подпись</p>	<p align="center">Лутова Л.А.</p>
<p>Исполнители</p>		
<p>к.б.н. И.Е. Додуева</p>		
<p>к.б.н. В.Е. Творогова</p>		
<p>к.б.н. М.А. Лебедева</p>		
<p>к.б.н. М.С. Ганчева</p>		
<p>к.б.н. М.С. Бурлаковский</p>		
<p>К.А. Кузнецова</p>		
<p>к.б.н. И.С. Бузовкина</p>		
<p>Представители заказчика</p>		
<p>к.б.н. Е.О. Колесникова</p>		
<p>Е.Н. Малыхин</p>		
<p>Е.Г. Кислинская</p>		

РЕФЕРАТ

Отчет 13 с., 4 рис., 1 табл., 10 источников.

Ключевые слова: сахарная свекла, запасающий корень, агробактериальная трансформация, генное редактирование, композитные растения, ген *BvBEL1*.

Объект исследования: 2 линии сахарной свеклы, предоставленные заказчиком; штамм *Agrobacterium rhizogenes*, несущий конструкцию для редактирования гена *BvBEL1*, полученную нами за отчетный период 2023 года; контрольный штамм *Agrobacterium rhizogenes*, несущий конструкцию для сверхэкспрессии гена глюкуронидазы (*35S::GUS*).

Цель работы

Разработать и протестировать молекулярные маркеры, ассоциированные с признаком “размер корнеплода” у сахарной свеклы, оценить влияние редактирования гена *BvBEL1* на развитие корнеплода свеклы, получить данные о механизмах влияния биопрепарата «Флавобактерин» на развитие корнеплода.

Задачи работы

Задача 1: Выявление полиморфизмов, ассоциированных с признаком «размер корнеплода» у свеклы

1. Секвенирование и анализ последовательностей генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* у 20 линий свеклы, предоставленных заказчиком.
2. Биоинформатический анализ последовательностей генов свеклы *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у линий свеклы по данным, полученным за отчетные периоды 2023 и 2024 года (всего 40 линий)
3. Анализ распределения выявленных полиморфизмов последовательностей генов свеклы *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1*, *BvBEL1* у линий свеклы с разным размером корнеплода

Задача 2 (на второй этап работы): Получение композитных растений свеклы, содержащих отредактированный ген *BvBEL1* в корнях

1. Трансформация проростков двух предоставленных заказчиком линий свеклы штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, содержащим вектор для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом
2. Выращивание композитных растений свеклы
3. Генотипирование корней композитных растений свеклы
4. Фенотипирование композитных растений свеклы

Задача 3: Изучение механизмов действия биопрепарата «Флавобактерин» на проявление признака “размер корнеплода”:

1. Обработка предоставленных заказчиком форм свеклы биопрепаратом «Флавобактерин» и контрольным биопрепаратом;

2. Выращивание растений в контролируемых условиях до стадии активного роста корнеплода;

3. Анализ анатомии и гистологии корнеплода и экспрессии маркерных генов у растений свеклы, обработанных биопрепаратом «Флавобактерин» и контрольным биопрепаратом.

Задача 4. Разработка молекулярного маркера, ассоциированного с признаком «размер корнеплода»: (будет выполнена в случае выявления разницы по распределению полиморфизмов любого из генов *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1* у линий с разным проявлением признака «размер корнеплода»):

1. Разработка и тестирование ПЦР-маркеров, ассоциированных с признаком «размер корнеплода», и полученных на основе данных секвенирования генов свеклы *BvKNOX6*, *BvLET6*, *BvFT1* и *BvBEL1*, проведенного исполнителем за отчетные периоды 2023 и 2024 года.

За второй отчетный период нами была выполнена работа по задаче 2.

Основные результаты работы за второй отчетный период

За отчетный период были получены композитные растения свеклы с редактированным геном *BvBEL1*. Для этого проведена трансформация проростков двух предоставленных заказчиком линий свеклы штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, содержащим полученный нами вектор для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, содержащим вектор для сверхэкспрессии гена глюкуронидазы (*35S:GUS*). Композитные растения были выращены в условиях *in vitro*, генотипированы, пересажены в грунт.

Были получены следующие результаты:

1. Проведена трансформация проростков двух предоставленных заказчиком линий свеклы штаммом *A. rhizogenes*, содержащим полученный нами вектор для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом *A. rhizogenes*, содержащим вектор для сверхэкспрессии гена глюкуронидазы (*35S:GUS*).

2. Композитные растения свеклы, трансформированные штаммом *A. rhizogenes*, содержащим вектор для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом *35S:GUS*, были выращены в условиях *in vitro* и генотипированы. Наличие вставки в настоящий момент подтверждено у 48 растений, редактирование гена *BvBEL1* – у 4 растений.

3. Композитные растения с подтвержденной вставкой конструкции для редактирования гена *BvBEL1* и контрольной конструкции *35S:GUS* были пересажены в условия аэропонной культуры, а затем в грунт. Проведено первичное фенотипирование полученных растений, на первой стадии (ювенильные растения до формирования запасяющего корня). Отличий от контроля не выявлено.

Вывод

Показана эффективность работы конструкции для редактирования гена *BvBEL1*, полученной нами в 2023 году. Это подтверждается редактированием гена *BvBEL1* у 4 трансформированных растений свеклы, несущих вставку данной конструкции. Полученные растения свеклы с отредактированным геном *BvBEL1* в корнях необходимо дополнительно фенотипировать на стадии товарной спелости корнеплода.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	7
Основная часть	8
1. Обоснование направлений исследований	8
2. Материалы и методы исследований	9
3. Результаты исследований	11
3.1. Получение и выращивание композитных растений свеклы с редактированным геном <i>BvBEL1</i> в корне	11
3.2. Генотипирование корней композитных растений свеклы, несущих конструкцию для редактирования гена <i>BvBEL1</i> в корнях	11
4. Заключение	13
Список использованных источников	15

ВВЕДЕНИЕ

Сахарная свекла (разновидность *Beta vulgaris*) занимает центральное место среди корнеплодных культур, культивируемых в России, а также входит в десятку самых значимых сельскохозяйственных растений (Kuznetsova et al., 2020; Fernie, Yan, 2019). В связи с этим, выявление генетических механизмов развития запасующих корней у свеклы является актуальным на сегодняшний день исследованием.

К числу выявленных регуляторов развития запасующего корня у свеклы относятся гены, кодирующие транскрипционные факторы семейств BELL (BELLRINGER-LIKE) и KNOX (KNOTTED-RELATED HOMEBOX), которые взаимодействуют, образуя гетеродимеры (Lin et al., 2013). Комплексы транскрипционных факторов BELL-KNOX участвуют в контроле разных программ развития растений и имеют множество мишеней (Niu, Fu, 2022), регулируя, в том числе, развитие запасующих побегов (клубней) картофеля (Zoukova et al., 2023) и, предположительно, запасующего корня у корнеплодных культур (Natarajan et al., 2019). В число мишеней комплексов BELL-KNOX входят гены биосинтеза фитогормонов, регуляторы развития меристем, а также гены кодирующие белки семейства FT, которые выполняют функцию туберигенов – регуляторов развития запасующих органов в зависимости от длины дня (Teo et al., 2017; Zoukova et al., 2023). Тем не менее, точные функции генов семейства *BEL* в развитии корнеплода свеклы не были изучены.

В рамках сотрудничества с ООО «СоюзСемСвекла» нами была изучена динамика экспрессии генов в ходе формирования корнеплода у разных линий свеклы. Было показано, что экспрессия гена *BvBEL1* стабильно повышалась при росте корнеплода у всех исследованных форм свеклы. Таким образом, этот ген является одним из основных кандидатов на роль регулятора роста корнеплода у этой культуры.

С целью подтверждения функций гена *BvBEL1* как регулятора роста корнеплода у свеклы мы решили провести эксперимент по редактированию этого гена и оценить эффект потери функции *BvBEL1* на развитие запасующего корня.

Важным способом изучения функций любого гена является оценка влияния мутаций, нарушающих его функции, на определенные программы развития. Технологии редактирования генов, наиболее эффективной из которых является система CRISPR/Cas9, широко используются для проведения «нокаута» генов (направленного «выключения», искусственной мутации, приводящей к потере функции) (Закиян и др., 2016). В связи с этим, на втором этапе в задачи нашей работы входила оценка влияния редактирования гена *BvBEL1* на развитие растений свеклы и размер корнеплода.

В 2023 году в рамках сотрудничества с ООО «СоюзСемСвекла» нами была получена генетическая конструкция для редактирования гена *BvBEL1* на основе вектора pHSE401 (Xing et al., 2014). Корректность встраивания мишеней была подтверждена секвенированием полученных векторов (Рис. 1). Редактируемый фрагмент приходится на середину первого экзона гена *BvBEL1* (253-272 нп), что позволяет предположить, что итогом успешной трансформации растений и редактирования гена *BvBEL1* может быть синтез нефункционального белкового продукта.

В 2024 году мы провели трансформацию предоставленных заказчиком двух линий свеклы штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, несущим конструкцию для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, несущим конструкцию для сверхэкспрессии репортерного гена глюкононидазы (*35S::GUS*). Затем было проведено генотипирование полученных композитных растений по следующей схеме: 1) выделение ДНК из регенерированных корней, 2) ПЦР с праймерами к отредактированному участку гена *BvBEL1*, 3) секвенирование ПЦР-фрагментов, 4) анализ полученных последовательностей и оценка эффективности редактирования. Композитные растения были пересажены из стерильной культуры *in vitro* в гидропонную культуру, затем в грунт.

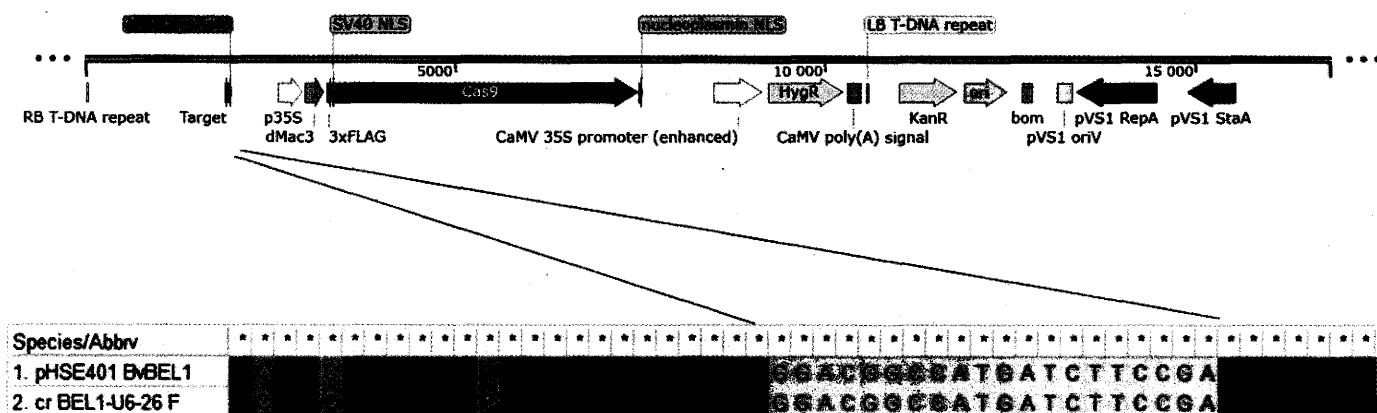


Рисунок 1. Вектор для редактирования гена *BvBEL1*: вверху – схема вектора, внизу – последовательность вставки (выделена желтым).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обоснование направлений исследований

В связи со значением сахарной свеклы как одной из важнейших сельскохозяйственных культур, выявление генетических механизмов развития запасящих корней у этого объекта является актуальным на сегодняшний день исследованием. Ранее, при анализе динамики экспрессии генов свеклы в ходе формирования запасящего корня ген *BvBEL1* был выделен как один из основных кандидатов на роль регулятора роста корнеплода. По литературным данным, гомологи этого гена у других растений регулируют фитогормональный баланс и развитие меристем (Niu, Fu, 2022), а также формирование запасящих осевых органов (Zoukova et al., 2023; Natarajan et al., 2019).

Для подтверждения регуляторной функции гена *BvBEL1* в контроле размера корнеплода свеклы мы получили генетическую конструкцию для редактирования гена *BvBEL1*.

За второй отчетный период 2024 г. мы провели работу по получению композитных растений свеклы с редактированным геном *BvBEL1*. Для этого предоставленные заказчиком асептические проростки двух линий свеклы были трансформированы штаммом *Agrobacterium rhizogenes*, несущим вектор для редактирования гена *BvBEL1*, полученный нами в 2023 году в рамках сотрудничества с ООО «СоюзСемСвекла», а также контрольным штаммом.

2. Материалы и методы исследований

2.1. Растительный материал

Материал 2 линий свеклы для получения композитных растений с редактированным геном *BvBEL1* в корне был предоставлен в виде асептических проростков на твердой среде Мурасиге-Скуга в стерильных банках.

2.2. Штаммы *Agrobacterium rhizogenes*

В работе были использованы 2 штамма *Agrobacterium rhizogenes*, полученные на основе лабораторного штамма Arqua:

- 1) Штамм, содержащий генетическую конструкцию для редактирования гена *BvBEL1*, полученную нами в 2023 году в рамках сотрудничества с ООО «СоюзСемСвекла»
- 2) Контрольный штамм, несущий конструкцию для сверхэкспрессии репортерного гена глюкуронидазы (*35S:GUS*)

2.3. Трансформация свеклы *Agrobacterium rhizogenes*

Трансформация проростков свеклы *A. rhizogenes* была проведена по протоколу, описанному в Iina et al., 2012. У асептических проростков свеклы отрезали главный корень и половину гипокотыля, после чего на свежий срез гипокотыля наносили свежую культуру *A. rhizogenes* одного из использованных штаммов. Кокультивацию проростков с *A. rhizogenes* проводили в течение 5 дней на твердой среде MS с 10 г/л сахарозы. Для уничтожения бактерий растения пересаживали на твердую среду MS с 10 г/л сахарозы, содержащую 300 мг/л цефотаксима (антибиотик широкого спектра действия). Через неделю была получена первая волна регенерированных придаточных корней, которые удаляли (поскольку большая их часть является нетрансгенными или химерными), то же самое проделали со второй волной корней. Третью волну корней, среди которых, согласно Iina et al., 2012, наблюдается наиболее высокий процент трансформированных, сохраняли и использовали для генотипирования.

2.4. Выращивание композитных растений свеклы с редактированным геном *BvBEL1* в корне

После генотипирования (см. ниже) композитные растения свеклы с трансформированными корнями пересаживали из асептической культуры и выращивали

7 дней на аэропонной установке для адаптации и наращивания корневой системы. Затем растения пересаживали в вермикулит, выращивали на нем 14 дней и пересаживали в грунт Terra Vita Universal.

2.5. Выделение ДНК

Суммарную ДНК выделяли из индивидуальных корней трансформированных растений свеклы с помощью следующего экспресс-метода:

Корень растирали пестиком в присутствии экстрагирующего буфера (200 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 250 мМ NaCl, 25 мМ EDTA (pH 8.0), 0.5 % SDS) и осаждали остатки растительной ткани центрифугированием при 12000 об/мин в течение 5 минут с последующим перенесением супернатанта в чистую пробирку. Осаждали ДНК изопропанолом 2 мин при комнатной температур ес последующим центрифугированием при 12000 об/мин в течение 5 минут. Промывали осадок холодным 75% этанолом и высушивали под потоком воздуха в ламинаре. Осадок растворяли в 50-100 мкл стерильной дистиллированной воды с помощью пипетирования.

Полученную ДНК использовали для проведения ПЦР с целью генотипирования корней трансформированных растений свеклы.

2.6. Полимеразная цепная реакция

Для ПЦР ДНК трансформированных корней свеклы использовали праймеры к гену *BvBEL1*, фланкирующие редактированный участок:

BvBEL1 F1 ATGATGGCAACATACTTTCATGG

BvBEL1 R1 СТАCTGTTACCTGACTCTGATGCTGT

а также праймеры для проверки наличия вставки Cas9:

zCAS9-ID F CGGCCTCGATATTGGGACTAACTCT

zCAS9-ID R CTTATCTGTGGAGTCCACGAGCTTC

Реакции ПЦР проводили при следующих условиях: 1) 60 сек. при 94°C – 1 цикл; 2) 60 сек. при 94°C, 30 сек. при 54°C, 40 сек. при 72°C - 30 циклов; 3) 5 мин. при 72°C – 1 цикл.

После прохождения циклов ПЦР проводили электрофорез в 1% агарозном геле, в который добавляли интеркалирующий краситель бромистый этидий (0,1%) для визуализации ДНК в ультрафиолетовом спектре. Для определения примерного размера ПЦР-фрагментов использовали маркер длин ДНК 100+ (Евроген).

Целевые фрагменты выделяли из геля с помощью набора реактивов и колонок Cleanup Mini (Евроген) по прилагаемому протоколу. Секвенирование ПЦР-фрагментов было проведено в ресурсном центре СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

2.7. Биоинформатические методы

Анализ данных секвенирования ПЦР-фрагментов гена *BvBEL1*, а также выравнивание последовательностей участка этого гена, полученных из разных трансформированных корней, проводили с помощью программы MegaX v. 11.

3. Результаты исследований

3.1. Получение и выращивание композитных растений свеклы с редактированным геном *BvBEL1* в корне

За отчетный этап мы провели трансформацию предоставленных заказчиком двух линий свеклы штаммом *A. rhizogenes*, несущим конструкцию для редактирования гена *BvBEL1*, и контрольным штаммом *A. rhizogenes*, несущим конструкцию для сверхэкспрессии репортерного гена глюкононидазы (*35S:GUS*).

Корни композитных растений были подвергнуты генотипированию (см. ниже), после чего растения пересаживали из условий стерильной культуры в грунт по следующей схеме, повышающей процент выживаемости растений:

- 1) Пересадка из стерильной культуры в условия аэропонной культуры
- 2) Пересадка из аэропонной культуры в вермикулит
- 3) Пересадка с вермикулита в грунт

Фотографии трансформированных растений свеклы в разных условиях представлены на рис. 2.

3.2. Генотипирование корней композитных растений свеклы, несущих конструкцию для редактирования гена *BvBEL1* в корнях

Перед пересадкой трансформированных растений в аэропонную культуру мы провели их генотипирование по следующей схеме:

- 1) Выделение ДНК из индивидуальных корней с помощью экспресс-метода (см. раздел 2.5)
- 2) ПЦР ДНК индивидуальных корней с праймерами к гену *BvBEL1*, фланкирующими редактируемый участок (для последующего секвенирования данного участка гена *BvBEL1*), а также с праймерами к вставке Cas9 (для контроля встраивания конструкции для редактирования).
- 3) Выделение и секвенирование ПЦР-фрагментов, полученных при амплификации ДНК индивидуальных корней с праймерами к участку гена *BvBEL1*
- 4) Анализ результатов секвенирования, подтверждение редактирования гена *BvBEL1* в определенных корнях

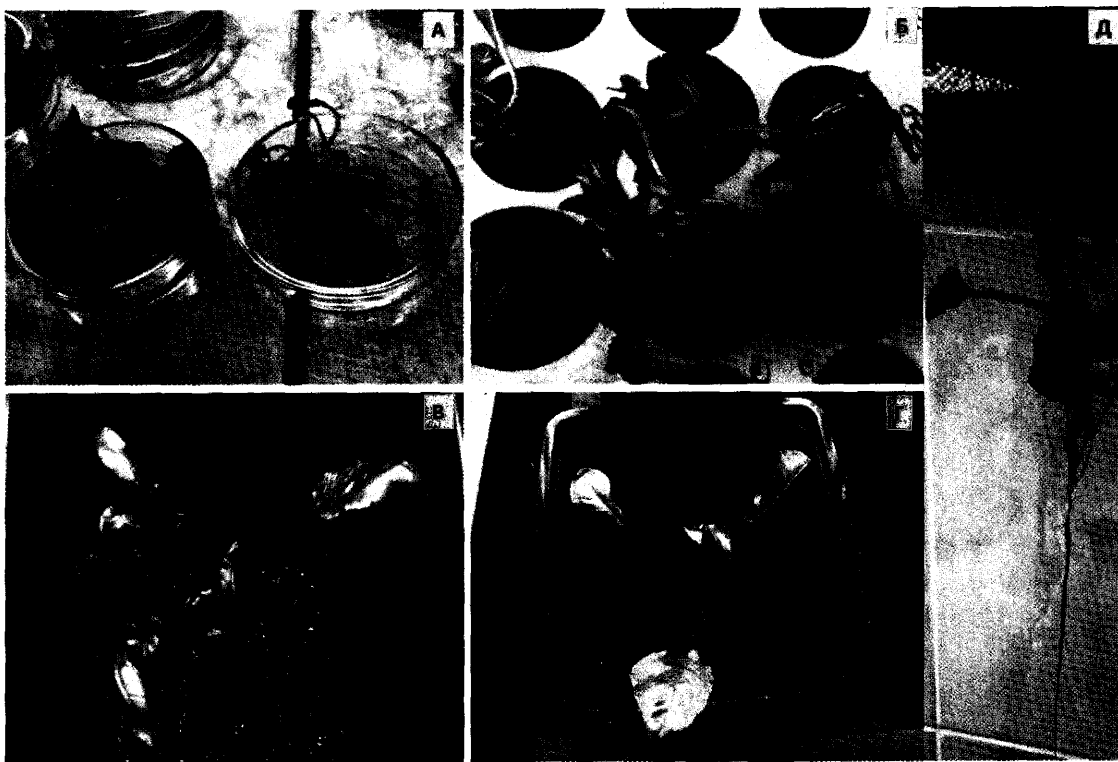


Рисунок 2. Трансформированные растения свеклы в разных условиях: А – стерильная культура, Б – аэропонная культура, В – вермикули, Г - грунт, Д – оценка развития корневой системы после аэропонной культуры.

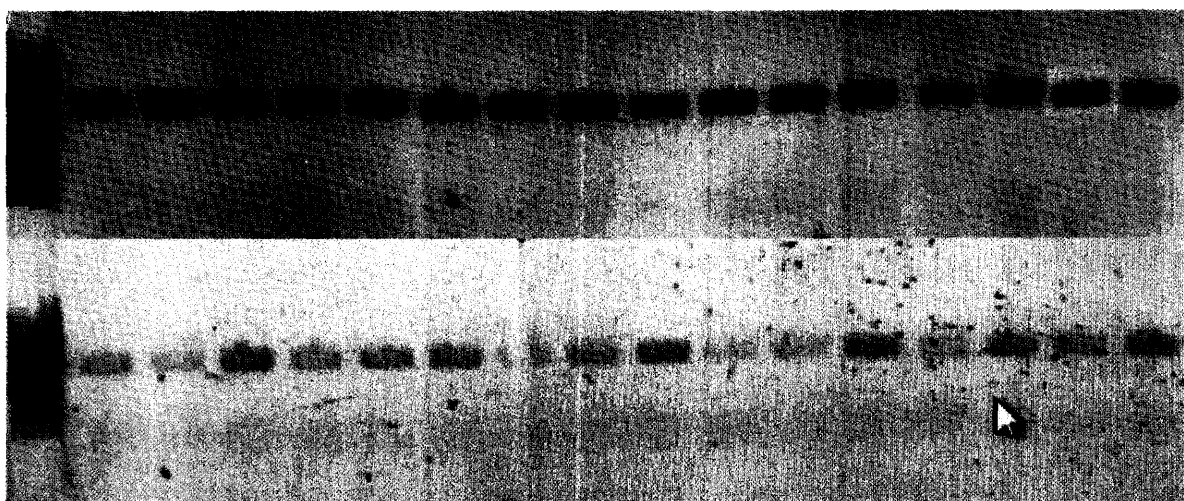


Рисунок 3. Электрофореграммы ПЦР-фрагментов трансформированных корней свеклы с праймерами к участку гена *BvBEL1* (вверху) и вставке Cas9 (внизу).

Всего в результате трансформации переданных заказчиком 48 растений линии 1 и 75 растений линии 2 за отчетный период наличие перенесенной вставки было подтверждено для 27 композитных растений линии 1 и 16 композитных растений линии 2. По результатам секвенирования ПЦР-фрагментов участка гена *BvBEL1* у трансформированных корней наличие редактирования (сдвига рамки считывания за счет

вставки или выпадения нуклеотидов) показано для 3 растений линии 1 и 1 растения линии 2.

Суммарные данные по количеству трансформированных и отредактированных композитных растений свеклы представлены в табл. 1.

Примеры электрофореграмм ПЦР-фрагментов, полученных при ПЦР ДНК трансформированных корней свеклы, приведены на рис. 3.

Выравнивание участка гена *BvBEL1* у трансформированных корней с успешным редактированием и референсной последовательности участка гена *BvBEL1* представлено на рис. 4

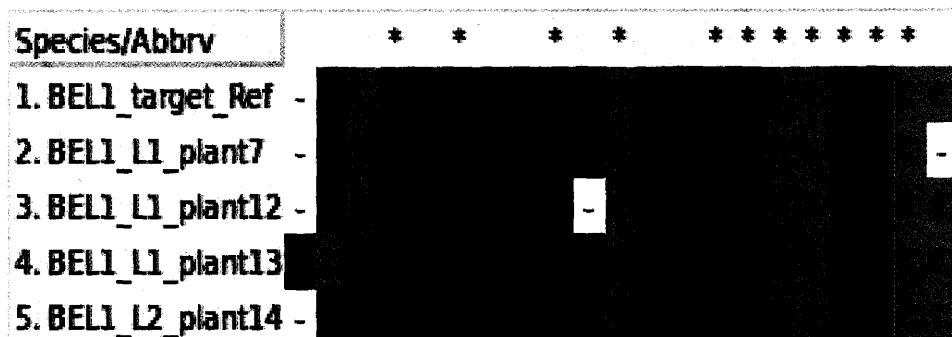


Рисунок 4. Пример отредактированной таргетной последовательности в 1 экзоне гена *BvBEL1* у растений № 7, 12 и 13 линии 1 и растения № 14 линии 2, предоставленных заказчиком. Визуализация данных выполнена в программе MegaX v. 11.

Таблица 1. Суммарные данные по количеству трансформированных и отредактированных композитных растений свеклы

	Число полученных от заказчика растений	Число трансгенных растений	Число отредактированных растений
Линия 1	48	27	3
Линия 2	75	16	1

4. Заключение

За второй отчетный период 2024 г. мы провели работу по получению композитных растений свеклы с отредактированным геном *BvBEL1*, который по нашим ранее полученным данным является регулятором развития корнеплода. Основными результатами работы за отчетный период являются следующие:

- 1) Показана эффективность работы конструкции для редактирования гена *BvBEL1*, полученной нами в 2023 году
- 2) Получены композитные растения свеклы с отредактированным геном *BvBEL1* в корнях. В дальнейшем необходимо дополнительно фенотипировать такие

растения, а также неотредактированные растения из того же опыта и контрольные растения с геном *GUS*, на стадии товарной спелости корнеплода.

Вывод

Показана эффективность работы конструкции для редактирования гена *BvBEL1*, полученной нами в 2023 году. Это подтверждается редактированием гена *BvBEL1* у 4 трансформированных растений свеклы, несущих вставку данной конструкции. Полученные растения свеклы с отредактированным геном *BvBEL1* в корнях необходимо дополнительно фенотипировать на стадии товарной спелости корнеплода.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Закиян С.М., Медведев С.П., Дементьева Е.В., Власов В.В. Редактирование генов и геномов. Издательство СО РАН, 2016, 432 с..
2. Fernie A.R, Yan J. De Novo Domestication: An Alternative Route toward New Crops for the Future. *Mol Plant*. 2019 May 6;12(5):615-631.
3. Ilina EL, Logachov AA, Laplaze L, Demchenko NP, Pawlowski K, Demchenko KN. Composite Cucurbita pepo plants with transgenic roots as a tool to study root development. *Ann Bot*. 2012 110(2): 479-489.
4. Kuznetsova K.A., Dodueva I.E., Pautov A.A., Krylova E.G., Lutova L.A. Genetic control of storage root development. *Russian Journal of plant physiology*. 2020. V.67, P. 589-605.
5. Lin T., Sharma P., Gonzalez D.H., Viola I.L., Hannapel D.J. The impact of the long-distance transport of a BEL1-Like messenger RNA on development. *Plant Physiol*. 2013. V.161. P.760-772.
6. Natarajan B., Kondhare K.R., Hannapel D.J., Banerjee A.K. Mobile RNAs and proteins: Prospects in storage organ development of tuber and root crops. *Plant Sci*. 2019. V. 284. P. 73-81.
7. Niu X, Fu D. The Roles of BLH Transcription Factors in Plant Development and Environmental Response. *Int J Mol Sci*. 2022 23(7):3731.
8. Teo CJ, Takahashi K, Shimizu K, Shimamoto K, Taoka KI Potato Tuber Induction is Regulated by Interactions Between Components of a Tuberigen Complex. *Plant Cell Physiol*. 2017. V.1;58(2):365-374.
9. Xing HL, Dong L, Wang ZP, Zhang HY, Han CY, Liu B, Wang XC, Chen QJ. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol*. 2014. V. 29;14:327.
10. Zounková A, Konečný J, Lipavská H, Mašková P. BEL transcription factors in prominent Solanaceae crops: the missing pieces of the jigsaw in plant development. *Planta*. 2023. V. 259(1):14.