

ИНДУКЦИЯ ЕДИНИЧНЫХ И МНОЖЕСТВЕННЫХ ЦЕЛЕВЫХ МУТАЦИЙ У ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА

Мирошниченко Дмитрий Николаевич^{1,2}, Тимербаев Вадим Рафаилович^{1,2}, Клементьева Анна Александровна², Пушин Александр Сергеевич², Сидорова Татьяна Николаевна², Литвинов Дмитрий Юрьевич^{1,3}, Назарова Любовь Андреевна^{1,3}, Баженов Михаил Сергеевич^{1,3}, Самарина Мария Алексеевна^{1,3}, Архипов Андрей Владимирович^{1,3}, Крупин Павел Юрьевич^{1,3}, Дивашук Михаил Георгиевич^{1,3}, Долгов Сергей Владимирович^{2,3}

¹Курчатовский геномный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, Москва

²Филиал Института биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Пуцино

³Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Россия, Москва

miroshnichenko@bibch.ru

Современные биотехнологии, к которым относится редактирование генома, позволяют значительно ускорить совершенствование простых признаков, контролируемых одним или несколькими генами, при этом не создавая ГМ-растения. С использованием CRISPR/Cas9 технологии редактирования ДНК, нами успешно достигнута одиночная и множественная модификация нуклеотидных последовательностей генов важных зерновых культур, таких как мягкая пшеница (*Triticum aestivum*), полба (*Triticum dicoccum*) и тритикале (\times *Triticosecale*). Для создания новых аллельных версий генов мы использовали одиночные или полицистронные генетические конструкции. Однократное геномное редактирование было направлено на индукцию новых нуклеотидных изменений в промоторной последовательности рецессивного гена *vtn-A1* с целью изменения функциональной активности генов *VRN*, контролирующих время колошения растений мягкой пшеницы. С помощью генетических конструкций, несущих единичную направляющую РНК (sgRNA), получен ряд независимых линий, содержащих различные нуклеотидные изменения, представляющие собой небольшие (однонуклеотидные), так и протяженные мутации. На их основе получены гомозиготные популяции пшеницы M2-M3 с новыми аллелями, которые не имеют фенотипических изменений по сравнению с исходным сортом, при этом демонстрируют изменение времени колошения и не содержат последовательности «инструментов» геномного редактирования. Для достижения множественного (одновременного) редактирования генов, отвечающих за состав и свойства крахмала зерен, таких как гранулсвязывающая синтаза крахмала, (GBSSI), фермент ветвления крахмала (SBEIIa 1–2), синтаза крахмала (SSIIa 3–4), изоамилаза крахмала (ISAI) и регулятор крахмала 1 (RSR1) доставляли в клетки полбы и тритикале различные типы полицистронных конструкций, состоящих из двенадцати или шести различных sgRNA. Успешная индукция целевых мутаций была подтверждена с помощью NGS во всех целевых генах первичных растений пшеницы, что значительно расширяет селекционный потенциал новых аллельных вариантов значимых генов. Анализ достигнутых результатов моно- и полигеномного редактирования будет представлен и интерпретирован в свете дальнейших геномных исследований и перспектив применения в селекции растений.

Ключевые слова: редактирование генома, генетическая инженерия растений, направленный мутагенез, зерновые, NGS

INDUCTION OF SINGLE AND MULTIPLE TARGETED MUTATIONS IN WHEAT AND TRITICALE

Miroshnichenko Dmitry^{1,2}, Timerbaev Vadim^{1,2}, Klementyeva Anna², Pushin Alexander², Sidorova Tatiana², Litvinov Dmitry^{1,3}, Nazarova Lubov^{1,3}, Bazhenov Mikhail^{1,3}, Samarina Maria^{1,3}, Arkhipov Andrey^{1,3}, Krupin Pavel^{1,3}, Divashuk Mikhail^{1,3}, Dolgov Sergey^{2,3}

¹*Kurchatov Genomic Center – All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russia Moscow*

²*Branch of Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Russia, Pushchino*

³*All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Russia, Moscow*
miroshnichenko@bibch.ru

A new modern technology such as genome editing have made it possible to accelerate improvement of genetically simple traits, which are controlled or influenced by single or a few genes, without the concerns associated with the GM crops. Here, we describe the single and multiple modifying of gene sequences of important cereal crops, such as bread wheat (*Triticum aestivum*), emmer wheat (*Triticum dicoccum*) and triticale (\times *Triticosecale*) using the CRISPR/Cas9-based genome editing approach. The single or polycistronic constructs were successfully applied for creating new allelic versions of genes. The single genomic editing was aimed to induce new nucleotide changes in the promoter of the recessive *vrn-A1* gene to modify the functional activity of VRN genes controlling the heading time of bread wheat plants. A number of independent events containing different nucleotide changes, varying from small to large indel mutations, have been generated. M2-M3 transgene-free populations that do not contain the sequence of genomic editing “tools” were then successfully produced and showed no phenotypic changes compared to the original cultivar, but demonstrated the changes in the earing time. To achieve multiplex editing of several genes involved in the grain starch composition and properties, such as the granule bound starch synthase (GBSSI), the starch branching enzyme (SBEIIa 1–2), the starch synthase (SSIIa 3–4), the starch debranching enzymes of isoamylase (ISAI) and the *starch regulator 1* (RSR1) we have delivered polycistronic construct consisting of twelve or six various sgRNAs into the cells of emmer wheat and triticale. The generation of genome-edited plants demonstrating the targeted modifications of native genes was confirmed by NGS. As a result, the panel of new allelic variants of indicated genes has been significantly expanded. The results will be discussed in terms of future genomic investigations and application for plant breeding.

Keywords: Genome editing, plant genetic engineering, directed mutagenesis, cereals, NGS