

grown in six countries. *Frontiers in Plant Science*, 2017. № 8. P. 1–14. doi: 10.3389/fpls.2017.00907.

- 4 Классификация и диагностика почв СССР // М.: Колос, 1977. 224 с.
- 5 Зоны морозостойкости, USDA-зоны, температурные значения [Электронный ресурс]. URL: <http://www.pro-rasteniya.ru/glossariy/zoni-morozostoykosti-usda-zonitemperaturnieznacheniya> (дата обращения: 20.03.2022).
- 6 Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. М.: Колос, 1989. Вып. 2: 195 с.

DOI 10.18699/GPB2024-38

Редактирование генома возделываемых сортов пшеницы и ячменя с использованием направленной нуклеазы Cas9 для улучшения сельскохозяйственных признаков

Киселёва А.А.^{1,2}, к.б.н., с.н.с.; Тимонова Е.М.^{1,2}, к.б.н., н.с.; Бережная А.А.², м.н.с.; Короткова А.М.^{1,2}, м.н.с.; Коложвари А.Э.¹, лаб-иссл.; Нестеров М.А.^{1,2}, м.н.с.; Кочетов А.В.^{1,2}, д.б.н., ак., директор; Салина Е.А.^{1,2}, д.б.н., г.н.с, проф.

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

²Курчатовский геномный центр, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*email: antkiseleva@bionet.nsc.ru

В данной работе мы адаптировали протоколы для библистической трансформации возделываемых сортов пшеницы и ячменя. С использованием данного подхода мы получили растения линии Велют с ускоренным колошением благодаря редактированию генов PPD-1 и растения ячменя сорта «Целинный 5» с голозерным фенотипом в результате редактирования гена NUD.

Ключевые слова: мягкая пшеница, ячмень, геномное редактирование.

Genome editing of wheat and barley cultivars using Cas9 nuclease to improve agricultural traits

Kiseleva A.A., Timonova E.M., Berezhnaya A.A., Korotkova A.M., Kolozhvari A.E., Nesterov M.A., Kochetov A.V., Salina E.A.

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Kurchatov Genomics Center of the Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

*email: antkiseleva@bionet.nsc.ru

In this work, we adapted protocols for biolistic transformation of cultivated varieties of barley and wheat. Using this approach, we obtained wheat plants of the Velut line with accelerated heading due to editing of the PPD-1 genes and barley plants of

the Tselinny 5 variety with a naked grain phenotype resulted from mutations in NUD gene.

Key words: common wheat, barley, genome editing.

Главными методологиями улучшения сельскохозяйственных культур в современном сельском хозяйстве являются скрещивание, мутагенез и трансгенез. Скрещивание является наиболее традиционным подходом, и оно сейчас дополняется современными технологиями, такими как маркер-опосредованная селекция, то есть скрещивание основано на информации о маркерах и генах, связанных с важными признаками. Но этот подход имеет ряд недостатков, таких как перенос нецелевых фрагментов генома и низкая скорость создания сортов. После 2010 годов стали появляться работы и исследования по редактированию генома растений с использованием CRISPR/Cas9. Этот подход позволяет более точно и предсказуемо вносить изменения в целевые гены, не оставляя следов чужеродных последовательностей [1].

В селекционных работах использование этого подхода открывает новые возможности для целенаправленного улучшения многих сельскохозяйственных культур. Пшеница (*Triticum aestivum* L.) и ячмень (*Hordeum vulgare* L.) являются одними из важнейших зерновых культур в мире. Мягкая пшеница является третьей по величине продовольственной культурой в мире и важным источником нашего ежедневного рациона во всем мире. Ячмень является четвертой по значимости зерновой культурой с точки зрения производства и используется в качестве диплоидной модели для более сложных полиплоидных злаков, таких как гексаплоидная пшеница.

Чаще всего для трансформации культурных растений используют биобаллистику или агробактериальную трансформацию вектором, который содержит все необходимые элементы для геномного редактирования. У этих подходов есть ряд недостатков и ограничений. Основной – невозможность редактировать немодельные сорта растений, поскольку многие признаки, такие как регенерационная способность или склонность к трансформации, у большинства сельскохозяйственных культур является очень генотип-специфичным [2].

Трансформация пшеницы дополнительно затруднена из-за большого размера генома и полиплоидии. Помимо получения улучшенных генотипов, целью настоящего исследования была оптимизация метода геномного редактирования на основе системы CRISPR/Cas9 с использованием бомбардировки частицами для немодельных сортов ячменя и пшеницы.

Для изменения времени колошения линии мягкой пшеницы Велют, которая отличается высокой продуктивностью и устойчивостью к патогенам, в качестве генов-мишеней выбрали гены *PPD-1*, которые регулируют чувствительность

растения к фотопериоду. В результате биобаллистической трансформации вектором, содержащим сразу две направляющие РНК, была получена коллекция из 52 растений с мутациями по целевым генам, у 7 из которых отсутствовала встройка вектора. Данную генетическую модель мы использовали для изучения влияния различных мутаций в промоторных областях генов *PPD-1* на время колошения.

Для редактирования ячменя был выбран ген *NUD*, мутации в котором приводят к формированию голозерного фенотипа. Голозерный ячмень имеет более высокое содержание в зерне белка и лизина, более высокое содержание β -глюкана, а также его переработка проще и дешевле [3]. Поскольку способность к регенерации остается проблемой для культивируемых сортов ячменя, мы использовали бинарный ДНК-вектор JD633, содержащий химеру генов *GRF4-GIF1*, которые кодируют факторы роста, для повышения эффективности регенерации [4]. Нами получено пять растений T0 ячменя сорта «Целинный 5», несущих несколько моно- и биаллельных мутаций в гене *NUD*. Два из них представляют собой свободные от встройки вектора растения и были использованы для получения стабильных линий T1.

Таким образом, в ходе работы, используя усовершенствованные протоколы биолистической трансформации, мы получили растения возделываемых сортов ячменя и пшеницы с отредактированными сельскохозяйственно-значимыми генами.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Курчатовского Геномного Центра ИЦиГ СО РАН № 075-15-2019-1662.

Список литературы

- 1 Chen, Kunling, Yanpeng Wang, Rui Zhang, Huawei Zhang, and Caixia Gao. 2019. "CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture." *Annual Review of Plant Biology* 70 (1): 667–97. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>.
- 2 Cardi, Teodoro, Jana Murovec, Allah Bakhsh, Justyna Boniecka, Tobias Brueggemann, Simon E. Bull, Tom Eeckhaut, et al. 2023. "CRISPR/Cas-Mediated Plant Genome Editing: Outstanding Challenges a Decade after Implementation." *Trends in Plant Science* xx (xx): 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2023.05.012>.
- 3 Железнов, А.В., Т.В. Кукоева, and Н.Б. Железнова. 2013. "Ячмень Голозерный: Происхождение, Распространение и Перспективы Использования." *Вавиловский Журнал Генетики и Селекции*. 17 (2): 286–97. <https://vavilov.elpub.ru/jour/article/view/150>.
- 4 Debernardi, Juan M., David M. Tricoli, Maria F. Ercoli, Sadiye Hayta, Pamela Ronald, Javier F. Palatnik, and Jorge Dubcovsky. 2020. "A GRF–GIF Chimeric Protein Improves the Regeneration Efficiency of Transgenic Plants." *Nature Biotechnology* 38 (11): 1274–79. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0703-0>.