

Разработка и применение системы геномного редактирования ячменя (*Hordeum vulgare*) для получения трансгенных линий с целью изучения метаболизма жирных кислот

Короткова А.М.^{1*}, Колосовская Е.В.³, Вихорев А.В., Герасимова С.В., Хертиг К.³, Кумлен Й.³, Хлесткина Е.К.^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), Санкт-Петербург, Россия

³ Институт генетики растений и исследований сельскохозяйственных культур им. Лейбница, Гатерслебен, Германия

* korotkova@bionet.nsc.ru

Ключевые слова: ячмень; CRISPR/Cas9; цитохром P450; кетоацил-КоА-синтетазы

Мотивация и цель: Ячмень (*Hordeum vulgare*) является одной из ключевых зерновых культур, широко используемых в сельском хозяйстве и пищевой промышленности. Анализ транскриптомных данных, полученных при изучении мутантов ячменя по гену *HvWin1*, кодирующему регуляторный белок семейства AP2/ERF и управляющему биосинтезом восков [1], позволил выделить четыре гена, проявляющих значительные изменения экспрессии в этих мутантах относительно растений дикого типа. Целью данного исследования является применение системы направленного геномного редактирования ячменя сорта Golden promise путем нокаута отобранных генов, непосредственно участвующих в метаболизме жирных кислот. К ним относятся ген, кодирующий цитохром P450, и три гена, кодирующих кетоацил-КоА-синтетазы.

Методы и алгоритмы: Для разработки векторов системы CRISPR/Cas9 использовались последовательности гена, кодирующего цитохром P450, и трех генов, кодирующих кетоацил-КоА-синтетазы, полученные из базы данных ячменя сорта Golden promise. Последовательности были проанализированы с помощью инструментов Benchling и WU-CRISPR для определения оптимальных участков для разрезания и разработки соответствующих направляющих РНК. Вторичная структура направляющих РНК была предсказана с использованием программы RNAfold. Сконструированные векторы экспрессии содержали кодирующую последовательность нуклеазы Cas9, оптимизированную для кукурузы, направляющую РНК и промотор U6 пшеницы *Triticum aestivum*. Финальные наборы были переклонированы в бинарный вектор pBi (DNA cloning service, Hamburg, Germany) и получили названия pEK7, pEK13, pEK17, pEK25.

Результаты: Полученные векторы экспрессии (pEK7, pEK13, pEK17, pEK25) были успешно использованы для трансформации незрелых зародышей ячменя сорта Golden promise методом агробактериальной трансформации. В результате было получено несколько трансгенных линий ячменя с мутациями в соответствующих генах: 23 растения-регенеранта для гена, кодирующего цитохром P450; а также 38, 44 и 23 растения-регенеранта для трех различных

генов, кодирующих кетоацил-КоА-синтетазы. Полученные трансгенные линии ячменя будут охарактеризованы в поколении T1 для анализа изменений в составе жирных кислот по сравнению с контрольными растениями дикого типа.

Выводы: В результате данного исследования была успешно разработана и применена система CRISPR/Cas9 для редактирования генома ячменя сорта Golden promise с целью нокаута генов, непосредственно вовлеченных в метаболизм жирных кислот, включая ген, кодирующий цитохром P450, и три гена, кодирующие кетоацил-КоА-синтетазы. Были получены многочисленные независимые трансгенные линии ячменя с мутациями в указанных генах, представляющие ценный материал для дальнейших исследований и манипуляций с биосинтезом жирных кислот в ячмене с целью улучшения качественных характеристик этой важной сельскохозяйственной культуры. Полученные результаты открывают перспективы для создания новых сортов ячменя с улучшенными характеристиками и могут значительно способствовать увеличению эффективности сельского хозяйства.

Финансирование: Работа выполнена при поддержке РНФ № 21-66-00012.

Development and application of genome editing system in barley (*Hordeum vulgare*) for generating transgenic lines to study fatty acid metabolism

Korotkova A.M.^{1*}, Kolosovskaya E.V.³, Vihorev A.V., Gerasimova S.V., Hertig C.W.³, Kumlehn J.³, Khlestkina E.K.^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Federal Research Center N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

³ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany

* korotkova@bionet.nsc.ru

Key words: barley; CRISPR/Cas9; cytochrome P450; ketoacyl-CoA synthetases

Motivation and Aim: Barley (*Hordeum vulgare*) is one of the key cereal crops widely used in agriculture and the food industry. The analysis of transcriptomic data obtained from studying barley mutants for the *HvWin1* gene, encoding a regulatory protein of the AP2/ERF family and involved in wax biosynthesis [1], identified four genes that significantly changed their expression in these mutants. The aim of this study was to apply targeted genome editing in barley, specifically knockout of the selected genes directly involved in fatty acid metabolism. These genes include the cytochrome P450 gene and three genes encoding ketoacyl-CoA synthetases.

Methods and Algorithms: To develop CRISPR/Cas9 vector constructs, gene sequences encoding cytochrome P450 and three genes encoding ketoacyl-CoA synthetases were utilized. These sequences were obtained from the database of cultivar Golden promise. The sequences were analyzed using Benchling and WU-CRISPR tools to identify optimal cleavage sites and design corresponding guide RNAs (gRNAs). The secondary structure of the gRNAs was predicted using the RNAfold program. The constructed expression vectors contained the coding sequence of Cas9 nuclease optimized for maize, along with the gRNA and the U6 promoter from *Triticum aestivum*. The final constructs

were re-cloned into the binary vector p6i (DNA cloning service, Hamburg, Germany) and designated as pEK7, pEK13, pEK17, and pEK25.

Results: The obtained expression vectors (pEK7, pEK13, pEK17, pEK25) were successfully utilized for the transformation of immature embryos of Golden promise barley using the Agrobacterium-mediated transformation method. As a result, several transgenic barley lines carrying mutations in the respective genes were obtained: 23 regenerated plants for the cytochrome P450 gene; as well as 38, 44, and 23 regenerated plants for the three different genes encoding ketoacyl-CoA synthetases. These generated transgenic barley lines will be characterized in the T1 generation to analyze changes in fatty acid composition compared to wild-type control plants.

Conclusion: As a result of this study, a successful CRISPR/Cas9 system was developed and applied for genome editing in Golden promise barley, aiming to knock out genes directly involved in fatty acid metabolism, including the cytochrome P450 gene and three genes encoding ketoacyl-CoA synthetases. Numerous independent transgenic barley lines carrying mutations in these genes were generated, providing valuable material for further research and manipulation of fatty acid biosynthesis in barley to improve its qualitative traits. These findings open up avenues for developing new barley cultivars with enhanced characteristics, contributing significantly to agricultural efficiency.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (grant number 21-66-00012).

Список литературы/References

1. Gerasimova S.V., Kolosovskaya E.V., Vikhorev A.V. et al. WAX INDUCER 1 regulates β -diketone biosynthesis by mediating expression of the cer-cqu gene Cluster in barley. *Int J Mol Sci.* 2023;24:6762. doi 10.3390/ijms24076762