

УЛУЧШЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ ЦЕННОСТИ ЗЕРНА СОРГО С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ: АНАЛИЗ ПОТОМСТВА МУТАНТОВ С ПОВЫШЕННОЙ ПЕРЕВАРИВАЕМОСТЬЮ КАФИРИНОВ

Эльконин Л. А.¹, Геращенко Г. А.², Борисенко Н. В.¹, Сарсенова С.Х.¹, Панин В. М.¹

¹Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока

²Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа
lelkonin@gmail.com

Сайт-направленный мутагенез посредством генетических конструкций, несущих систему CRISPR/Cas, является эффективной технологией, активно используемой для решения самых разных задач генетики и селекции растений. Одной из таких задач является улучшение питательной ценности зерна сорго – высокоурожайной жаро- и засухоустойчивой злаковой культуры, приобретающей всё большее значение в условиях аридизации климата. Существенным недостатком сорго является низкая питательная ценность зерна, обусловленная, в том числе, устойчивостью его запасных белков – кафиринов – к протеолитическому расщеплению.

Нами ранее были созданы вектора (p1C, p2C) для индукции мутаций в одном из генов генного семейства, кодирующего синтез 25kDa α -кафирина (*k1C5*), при этом в качестве мишени использовали нуклеотидную последовательность сигнального полипептида, ответственного за упаковку кафирина в белковые тельца клеток эндосперма, с тем расчетом, что индуцированная мутация нарушит данный процесс. Созданные вектора посредством агробактериальной трансформации были введены в геном сорго (сорт Аванс). В потомстве регенерированных растений (в поколении T₁) были выявлены мутанты с улучшенной перевариваемостью кафиринов в системе *in vitro*.

Анализ поколения T₂, выращенного в условиях опытного поля, показал, что у некоторых мутантов наблюдалось наследование более высокого уровня перевариваемости белков зерна. Так, в потомстве мутанта 2C-2.1.1 перевариваемость белков составляла 71%, а в потомстве мутанта 2C-1.2.5a – 84%, значительно превышая уровень перевариваемости у исходного сорта (58-60%; $p>0.05$). Растения из этих семей по основным селекционно-ценным признакам значимо не отличались от исходного сорта. Анализ текстуры эндосперма у некоторых растений из этих семей, а также у других мутантов из поколений T₂ и T₃ показал, что в метелках присутствовали как зерновки с нормально развитым стекловидным эндоспермом, характерным для исходного сорта, так и зерновки, у которых стекловидный слой отсутствовал и эндосперм был полностью мучнистым, либо был представлен тонким стекловидным слоем, либо вкраплениями стекловидного эндосперма. Перевариваемость белков из таких зерновок, как правило, была выше, чем у белков из зерновок со стекловидным эндоспермом, достигая, в некоторых случаях, 84-94%.

Как показало секвенирование кодирующей последовательности гена *k1C5*, у обоих мутантов (2C-1.2.5a и 2C-2.1.1) присутствовала одна и та же мутация: замена 23 нуклеотида F-цепи: T → C, что должно привести к замене кодирующего триплета CTC → CCC. Следствием этой мутации, по-видимому, стало замещение восьмой аминокислоты сигнального полипептида α -кафирина, а именно, лейцина, алифатической гидрофобной аминокислоты, на пролин – гетероциклическую менее гидрофобную аминокислоту, вызывающую изгиб α -спирали белка. Такая замена могла изменить структурные и функциональные свойства полипептида и, как следствие, характер депонирования α -кафирина в белковых тельцах и, тем самым, повлиять на их перевариваемость.

Вместе с тем, в ряде семей T₂, выявлены случаи нецелевого эффекта созданных генетических конструкций: выщепление низкорослых форм, мутантов с некрозом листьев и метелки, усилившемся в процессе онтогенеза, при этом соотношение нормальных растений и индивидуумов с некрозом соответствовало дигибриднему расщеплению 9:7 ($\chi^2=0.672$; $0.5<p<0.25$). В потомстве мутанта 2C-1.2.9 наблюдались растения с тонким стеблем (диаметр 5.9 ± 0.5 см, в сравнении с 8.4 ± 0.4 см у исходного сорта Аванс ($p<0.01$)), сниженной массой 1000 зерен и сниженным урожаем зерна с метелки.

Исследования проведены при поддержке гранта РНФ №24-16-00063.

Ключевые слова: CRISPR/Cas, кафирины, перевариваемость *in vitro*, эндосперм, нецелевые мутации, сорго.

Improvement of the nutritional value of sorghum grain using genome editing technology: analysis of the progeny of mutants with increased digestibility of kafirins

Elkonin L. A.¹, Gerashchenkov G. A.², Borisenko N. V.¹, Sarsenova S. K.¹, Panin V. M.¹

¹ Federal Centre of Agriculture Research of the South-East Region

² Institute of Biochemistry & Genetics UFRC RAS, Ufa

lelkonin@gmail.com

Site-directed mutagenesis using genetic constructs carrying the CRISPR/Cas system is an effective technology that is actively used to solve a variety of problems in plant genetics and breeding. One of these problems is improving the nutritional value of sorghum grain, a high-yielding, heat- and drought-tolerant cereal crop that is becoming increasingly important in the conditions of climate aridization. A significant disadvantage of sorghum is a low nutritional value of the grain, due, among other things, to the resistance of its storage proteins, kafirins, to proteolytic digestion.

We have previously created vectors (p1C, p2C) for inducing mutations in one of the genes of the gene family encoding the synthesis of the 25kDa α -kafirin (*k1C5*), using as a target the nucleotide sequence of the signal polypeptide responsible for packaging kafirins into protein bodies of endosperm cells, with the expectation that the induced mutation would disrupt this process. Using *Agrobacterium*-mediated genetic transformation we introduced these constructs into genome of the grain sorghum cultivar Avans. In the progeny of regenerated plants (in the T₁ generation), mutants with improved *in vitro* protein digestibility were identified.

Analysis of the T₂ generation grown in the experimental field conditions showed that some mutants inherited a higher level of grain protein digestibility. Thus, in the progeny of the 2C-2.1.1 mutant, protein digestibility was 71%, and in the progeny of the 2C-1.2.5a mutant it was 84%, significantly exceeding the level of protein digestibility of the original cultivar (58-60%; $p < 0.05$). Plants from these families did not differ significantly from the original cultivar in the main agronomically-valuable traits.

Analysis of the endosperm texture in some plants from the T₂ and T₃ of these mutants showed that there were kernels with different endosperm types: with normally developed vitreous endosperm which is peculiar to the original cultivar, with floury endosperm completely devoid of the vitreous layer, or kernels with a thin vitreous layer, or with inclusions of sectors of vitreous endosperm into the floury one. The digestibility of proteins from such kernels was generally higher than that of proteins from kernels with vitreous endosperm, reaching, in some cases, 84-94%.

Sequencing of the coding sequence of the *k1C5* gene showed that both mutants (2C-1.2.5a and 2C-2.1.1) had the same mutation: replacement of 23rd nucleotide in the F-chain: T $\rightarrow$ C, which should lead to the replacement of the coding triplet CTC $\rightarrow$ CCC. The consequence of this mutation, apparently, was the replacement of the eighth amino acid of the signal polypeptide of α -kafirin, namely, leucine, an aliphatic hydrophobic amino acid, with proline, a heterocyclic less hydrophobic amino acid that causes the bending of the protein α -helix. Such a replacement could change the structural and functional properties of the polypeptide and, as a consequence, the deposition of α -kafirin in the protein bodies and, thereby, affect their digestibility.

At the same time, in a number of T₂ families, cases of non-target effects of the created genetic constructs were observed: appearance of the mutants with reduced plant height, with necrosis of leaves and panicles, which increased during ontogenesis, segregation ratio of normal plants and individuals with necrosis fit to 9:7 digenic ratio ($\chi^2 = 0.672$; $0.5 < p < 0.25$). In the progeny of the mutant 2C-1.2.9, plants with a thin stem (diameter 5.9 ± 0.5 cm, compared with 8.4 ± 0.4 cm in the original variety Avans ($p < 0.01$)), reduced 1000 grains weight and reduced grain yield per panicle were observed.

The research was supported by the Russian Science Foundation, grant No. 24-16-00063.

Keywords: CRISPR/Cas, kafirins, *in vitro* digestibility, endosperm, off-target mutations, sorghum.