

ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ПРОМОТОРЕ ГЕНОВ *PPD-1*, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ, НА СУТОЧНЫЙ ПАТТЕРН ЭКСПРЕССИИ ЭТИХ ГЕНОВ И НА ВРЕМЯ КОЛОШЕНИЯ У *T. AESTIVUM* L.

Бережная А. А.^{*1}, Киселева А. А.^{1, 2}, Салина Е. А.^{1, 2}

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

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

BerezhnayaAA@bionet.nsc.ru

Время созревания культурных растений является одним из основных факторов, определяющих приспособленность к окружающей среде, что, в свою очередь, влияет на урожайность. Переход к генеративной фазе развития в значительной степени регулируется чувствительностью к фотопериоду. У пшеницы чувствительность к фотопериоду контролируется генами *PPD-1*. Известно, что аллели *PPD-1*, не относящиеся к дикому типу, имеют измененный паттерн экспрессии, что приводит к усилению транскрипции в течение дня и, как следствие, к более раннему колошению. В промоторе генов расположен ряд сайтов связывания с факторами транскрипции (CHE, BOX1, PCCNS, CCA-1, VOZ-2, LHY), которые регулируют экспрессию. Мы использовали CRISPR/Cas9 для получения коллекции растений с мутациями в промоторной области генов *PPD-1*, коллекцию мутантных растений мы использовали для выяснения функции сайтов связывания факторов транскрипции, обнаруженных в промоторе *PPD-1*.

Из 1470 эмбрионов, подвергшихся библистической обработке, было получено 193 регенеранта. Скрининг мутаций проводился методом ПЦР со специфическими праймерами к промоторным участкам ген *Ppvd-B1* и *Ppd-D1*. Точная оценка полученных мутаций была проведена с помощью секвенирования по Сэнгеру и NGS. Наличие трансгена определяли путем амплификации фрагментов sgRNA и гена BAR. Из 142 проанализированных растений 54 (38%) несли мутации по крайней мере в одном гене-мишени *P* (*pd-B1* и/или *Ppd-D1*). Большинство полученных мутаций в промоторе были делециями; длина делеций варьировала от единичных замен до сотен нуклеотидов. Мутантные генотипы были получены в гетерозиготном, би- и гомозиготном состоянии. Большинство мутантов T0 были гетерозиготными, 18 растений T0 с мутациями не содержали трансгенов. Экспрессия генов *Ppd-B1* и *Ppd-D1* была изучена в растениях T0 и T1 с помощью ПЦР в реальном времени. Было показано, что циркадный ритм экспрессии генов дикого типа нарушается у мутантов как с делециями, так и с делециями. У контрольных растений дикого типа гены *PPD-1* активны в течение дня и неактивны ночью, тогда как у растений с мутациями эти гены постоянно активны в течение дня.

Поклоение T1 высаживали в теплице в условиях длительного светового дня и оценивали фенотип (появление первого узла и время появления всходов). Растения T1 с делециями сайтов CHE, BOX1, PCCNS, CCA-1, VOZ-2 (200 п.н.) в промоторе гена *Ppd-D1* выколашивались на 3-5 дней раньше по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Короткие делеции в промоторных областях генов *PPD-1*, которые затрагивали только один сайт связывания, также были ассоциированы с более ранним выколашиванием. Так, нами не было обнаружено значимых различий во времени колошения между растениями с делециями 276 п.н. и 42 п.н. в гене *Ppd-D1*. Короткая делеция 42 п.н. затронула только сайт BOX1, PCCNS, в то время как делеция 276 п.н. затронула сайты CHE, BOX1, PCCNS, CCA-1 и VOZ-2. У потомства T1 не было существенной разницы во времени созревания между двумя аллелями и гетерозиготными растениями. Эти данные указывают на то, что гены *PPD-1* могут находиться под регуляторным контролем, опосредованным множеством транскрипционных факторов.

Данное исследование было поддержано грантом РФФИ No21-76-30003.

Ключевые слова: геномное редактирование, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cas9, фотопериод, время колошение, экспрессия генов

CAS9-INDUCED MUTATIONS IN THE PROMOTER OF PPD-1 GENES AFFECT THE DAILY PATTERN OF EXPRESSION OF THESE GENES AND THE HEADING TIME IN T. AESTIVUM L.

Berezhnaya A. A. ^{*1}, Kiseleva A. A.^{1, 2}, Salina E. A.^{1, 2}

¹*The Federal State Budgetary Institution of Science Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICG SB RAS), Novosibirsk, Russia*

²*Kurchatov Genomic Center, Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia*
BerezhnayaAA@bionet.nsc.ru

The heading time of cultivated plants is one of the main factors determining their adaptability to the environment, which, in turn, affects crop yields. The transition to the reproductive phase is largely regulated by photoperiod sensitivity. In wheat, the photoperiod sensitivity is controlled by the *PPD-1* genes. Non-wild-type alleles of *PPD-1* are known to have an altered expression, leading to elevated transcription throughout the day and accelerated heading. It was assumed that a range of transcription factor binding sites (CHE, BOXIIPCCHS, CCA-1, VOZ-2, LHY) located within the *PPD-1* promoter regulate the gene expression. At the Kurchatov Genomic Center of ICG SB RAS we used the CRISPR/Cas9 genome editing to obtain a collection of plants with mutations in the promoter region of the *PPD-1* genes. The mutant plant collection was utilized to uncover the function of the transcription factor binding sites found within the *PPD-1* promoter.

Of the 1470 embryos that underwent biolistic bombardment, 193 regenerants were obtained. Mutation screening was performed by PCR with specific primers to the promoter regions of *tPhped-B1* and *Ppd-D1* genes. Precise evaluation of the obtained mutations was carried out using Sanger and NGS sequencing. The presence of the transgene was determined by amplifying fragments of sgRNA and BAR gene. Of the 142 plants analyzed, 54 (38%) carried mutations at least in one target gene (*Ppd-B1* and/or *Ppd-D1*). Most mutations in the promoter were deletions; the length varied from single nucleotide deletions to hundreds of nucleotides. Mutant genotypes were obtained in a heterozygous, bi-, and homozygous state. The majority of the T0 mutants were heterozygous. A total of 18 T0 plants with mutations were transgene-free.

The expression of the *Ppd-B1* and *Ppd-D1* genes was studied in T0 and T1 plants using real-time PCR. It was shown that the circadian rhythm of expression of wild-type genes is disrupted in mutants with both deletions and insertions. In wild-type control plants, the *PPD-1* genes are active during the day and inactive at night, whereas in the edited plants, these genes are constantly active throughout the day.

The T1 generation of edited wheat was planted in a glasshouse in long daylight conditions, and the phenotype was evaluated (the first node and the time of heading). There were T1 plants harboring longer deletions, which eliminated CHE, BOXIIPCCHS, CCA-1, VOZ-2 binding sites. These large deletions (approximately 200 nucleotides) in the promoter of the *thPepd-D1* gene led to an acceleration in heading time for 3–5 days ($p < 0.001$). Short deletions in the promoter regions *PPoDf-1* genes, which affected only one binding site, were also associated with an earlier heading. For instance, one of the T0 plants harbored biallelic mutations in the *Ppd-D1* gene with 276-bp and 42-bp deletions. The shorter deletion only affected the BOXIIPCCHS site, while the longer deletion covers CHE, BOXIIPCCHS, CCA-1, and VOZ-2 sites. In the T1 progeny there was no significant difference in heading time between the two alleles and heterozygous plants. These findings indicate that *thPePD-1* genes may be under regulatory control mediated by multiple transcription factors.

Funding: The reported study was funded by the RSF (Russian Science Foundation) project No21-76-30003.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, *PPD-1*, photoperiod, heading time, gene expression, wheat