

Опыт редактирования растений семейства Solanaceae: трудности и решения

О.Л. Ражина^{1,2}, А.С. Коновалова¹, В.В. Никаноркина¹, А.С. Трофимов¹, В.Д. Карлов¹, М.В. Лебедева¹, Р.А. Комахин¹, В.В. Таранов^{1*}, А.В. Бабаков¹

¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

* v.taranov1@gmail.com

Целью работы было внести направленные изменения в несколько генов картофеля и табака влияющих на формирование хозяйственно ценных признаков. *Solanum tuberosum* – важная сельскохозяйственная культура. Сложный тетраплоидный геном и сложные скрещивания сильно затрудняют селекцию картофеля. Современные инструменты для геномного редактирования, такие как CRISPR/Cas9, позволяют повысить эффективность селекционного процесса. Однако эффективность редактирования должна быть очень высокой, чтобы затронуть все аллели полиплоидного генома.

Nicotiana tabacum, или культурный табак – аллотетраплоид, образовавшийся в результате гибридизации *N. sylvestris* и *N. tomentosiformis*, что иногда также приводит к необходимости редактирования четырех аллелей для достижения фенотипического эффекта. Для табака разработаны простые и эффективные протоколы трансформации и регенерации, что делает его удобным модельным объектом биологии растений, в частности, в работах по разработке и оптимизации методов редактирования геномов растений.

Материалы и методы: Редактирование генома растений картофеля и табака осуществляли с помощью технологии CRISPR/Cas. В качестве способа доставки инструментов редактирования использовали агробактериальную трансформацию.

Результаты: Мы успешно применили систему редактирования генома CRISPR/Cas9 для инактивации нескольких генов, которые влияют на хозяйственно ценные признаки картофеля: *StLFY*, *StDMR6-1* и *StVLNV*. *StLFY* в картофеле является ключевым регулятором перехода к цветению. Нокаут по *StLFY* привел к фенотипическим изменениям как соцветий, так и столонов, повлияв на клубнеобразование. Полученные линии с нокаутом гена *StLFY* линии могут быть использованы в качестве модели для изучения регуляции клубнеобразования. Вторая часть работы включала в себя мультиплексное редактирование генома картофеля с целью одновременного нокаутирования генов *StDMR6-1* и *StVLNV*. Ген *StDMR6-1* является геном восприимчивости к инфекции *Phytophthora infestans*, поскольку, кодируемый им белок *DMR6* участвует в подавлении иммунного ответа растений, основанного на действии салициловой кислоты. Ген *StVLNV* кодирует вакуолярную инвертазу, с экспрессией которой связано холодное осахаривание клубней при их ранении. В результате высокотемпературной обработки этих клубней получают продукты темного цвета с высоким содержанием акриламида, нейротоксина и канцерогена. Эффективность редактирования гена *StVLNV* в нашей работе оказалась существенно выше чем для *StDMR6-1*. Показано, что нокаут *StVLNV* приводит к существенному снижению накопления редуцирующих сахаров при хранении.

При редактировании генома табака в качестве мишени использовался ген *eIF4E*, являющийся геном восприимчивости к вирусу картофеля Y и ген *PDS*, кодирующий фермент фитоен десатуразу, нокаут которого имеет яркий фенотипический эффект, часто используется для отработки и оптимизации методов редактирования генома различных растений. Эффективность редактирования гена *PDS* была существенно выше, чем для *eIF4E* независимо от используемой наводящей РНК.

Выводы: Считается, что эффективность редактирования сильно зависит от sgRNA, но наш опыт показывает, что ген-мишень также играет важную роль.

Финансирование: Исследование поддержано Комплексной исследовательской программой «Развитие селекции и семеноводства картофеля».