

Улучшение качества зерна сорго посредством геномного редактирования и РНК-сайленсинга генов кафиринов

Л.А. Эльконин^{1*}, Г.А. Геращенко², Н.В. Борисенко¹, С.Х. Сарсенова¹, Н.Ю. Селиванов³, В.М. Панин¹

¹ Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия

² Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

³ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов, ФИЦ Саратовский научный центр Российской академии наук, Саратов, Россия

* elkoninl@gmail.com

Цель: Исследование проявления основных биологических и агрономически-ценных признаков в потомстве мутантов сорго, полученных в экспериментах по геномному редактированию нуклеотидных последовательностей, кодирующих α - и γ -кафирины, а также линий (поколения T_3 , T_6), полученных из потомства мутанта, несущего генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина.

Материалы и методы: Исследовали мутанты, полученные у сорта зернового сорго Аванс с помощью геномного редактирования и генетической трансформации с использованием вектора для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*. Использовали методы классической ПЦР и секвенирования по Сэнджеру. Перевариваемость белков зерна оценивали путем обработки муки пепсином в системе *in vitro* с последующим SDS-гель-электрофорезом в ПААГ. Содержание аминокислот определяли с помощью ВЭЖХ-анализа. Растения выращивали на опытном поле Селекционного комплекса ФАНЦ Юго-Востока.

Результаты: Трансгенные линии, полученные у сорта Аванс, содержащие конструкцию для РНК-сайленсинга гена γ -кафирина (*gKAF1*), отличались от исходного сорта меньшей высотой, укороченной цветоножкой, сниженной массой 1000 зерен и урожайностью зерна с метелки. Однако у многих растений наблюдалось повышение содержания белка в зерне (до 15.5%, по сравнению с 11.5% у исходного сорта) и лизина (на 64–121%). С учетом более высокого содержания белка и его более высокой перевариваемости (до 85–94%, по сравнению с 60–62% у исходного сорта), сбор перевариваемого протеина с 1 га у линий с конструкцией для РНК-сайленсинга был выше, чем у сорта Аванс на 15–61%. Анализ потомства мутантов, полученных в экспериментах по геномному редактированию, несущих мутации в сигнальной последовательности 22kDa α -кафирина, показал, что растения поколений T_2 и T_3 , также отличались от исходного сорта сниженной высотой растения. Однако длина цветоножки, масса 1000 зерен и урожай зерна с метелки не отличались от исходного сорта Аванс. Часть зерновок у некоторых растений имела модифицированный эндосперм: полностью мучнистый, либо с вкраплениями стекловидного эндосперма, либо с тонким стекловидным слоем. Уровень перевариваемости белков зерна в потомстве двух мутантов (2С-2.1.1 – № 13 и 2С-1.2.5а – № 14) варьировал от 77 до 84%, превышая исходный сорт ($p < 0.05$). Уровень перевариваемости белков из зерновок с модифицированным эндоспермом был выше, чем у зерновок с обычным стекловидным эндоспермом ($p < 0.05$). Обнаружено, что у обоих мутантов в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, кодирующей сигнальный полипептид α -кафирина, присутствует одна и та же мутация: Т→С, которая привела к замене кодирующего триплета СТС→ССС (Leu→Pro). Эта мутация располагается за пределами выбранной мишени, в направлении 3' от последовательности РАМ. Возможно, эта мутация возникала в результате ошибок нуклеазы CAS9, обусловленных наличием нескольких последовательностей РАМ, расположенных близко друг к другу. В потомстве других мутантов наблюдались нецелевые мутации: карлики, низкорослые индивидуумы, тонкостебельные растения с мелкими семенами, растения с бурыми пятнами на листьях, в которых происходил некроз листовой ткани, приводивший к стерильности метелок или гибели растений. В потомстве мутантов (поколение T_1), которые были получены с использованием вектора 3С, нацеленного на индукцию мутаций в сигнальной последовательности γ -кафирина, выявлены растения со значительно более высоким уровнем перевариваемости (до 89%). Зерновки этих растений имели модифицированный тип эндосперма и по своему фенотипу были аналогичны зерновкам мутантов сорта Аванс, несущих генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга гена *gKAF1*. Однако, в отличие от RNAi-мутантов, потомство растений, полученных с использованием вектора 3С для геномного редактирования, не имело значимых отличий от исходного сорта Аванс по морфологическим признакам. В поколении T_2 при выращивании в условиях опытного поля уровень перевариваемости составлял 74–78%; у большей части зерновок присутствовал тонкий слой стекловидного эндосперма.

Выводы: Обе технологии – RNAi и CRISPR/Cas9 – могут использоваться для создания сорго с улучшенной перевариваемостью белков зерна. Однако конструкция для RNAi гена *gKAF1* вызывает широкий спектр нецелевых эффектов, не наблюдающихся у мутантов, индуцированных вектором 3С.

Финансирование: Исследование поддержано проектом РНФ № 24-16-00063.