

УДК 575.113.1

ВЛИЯНИЕ РЕДАКТИРОВАННОЙ ПЛАСТИДНОЙ КРАХМАЛФОСФОРИЛАЗЫ PHO1A НА РАЗВИТИЕ И СТРЕССОВЫЙ ОТВЕТ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ**А.В. Нежданова, А.В. Щенникова***Институт Биоинженерии им. К.Г. Скрябина, ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*

Направленное редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas9 активно используется для получения растений с измененными признаками (Agora L., Narula A., 2017). Крахмалфосфорилаза PHO1a – один из ключевых ферментов метаболизма крахмала, участвующий в фосфороллизе и, одновременно, инициации биосинтеза крахмала (Slugina M.A. et al., 2019).

Целью работы стал функциональный анализ гена *PHO1a* путем получения и характеристики растений картофеля с измененной (с использованием CRISPR/Cas9) кодирующей последовательностью гена.

С помощью программ CRISPRdirect (Naito Y. et al., 2015) и CRISPR MultiTargeter (Prykhozhij S.V. et al., 2015) последовательность гена *PHO1a* была проанализирована, и был найден консервативный участок, пригодный для использования в качестве гидовой РНК (Ma X. et al., 2015). Была собрана CRISPR/Cas9-конструкция на основе бинарного вектора p201N_Cas9 (AddGene #59175; <https://www.addgene.org/>) и челночного вектора pUC gRNA Shuttle plasmid (AddGene #47024). Кассета gRNA для гена *PHO1a* находится под контролем промотора малых ядерных РНК *Medicago truncatula* pMTU6. Конструкция также содержала кассеты экспрессии гена белка Cas9 и селективного гена устойчивости растения к канамицину.

Штамм агробактерии, несущий плазмиду p201N-*PHO1a*-gRNA, был использован для трансформации стеблевых эксплантов (междоузлия) четырех сортов картофеля столового назначения с различным содержанием крахмала в клубнях (Мишка – 14.2–17.7 %; Люкс – 11–15 %; Жуковский ранний – 10–12 %; Терра – 15.5–16.5 %).

Регенерирующие из клеток каллуса побеги проходили отбор на среде MS без гормонов, содержащей канамицин (50 мг/л). Селекция побегов выявила 233 устойчивых к антибиотик у регенеранта, которые были дополнительно проанализированы с помощью ПЦР на присутствие трансгенов в геноме. В результате было получено 39 независимые линии (сорт Мишка – 6; сорт Люкс – 17; сорт Жуковский ранний – 5; сорт Терра – 11).

Аmplification и секвенирование участка редактирования обнаружило несинонимичную замену G₇₈₂→T в одном-двух аллелях из четырех возможных тетраплоидного генома картофеля. Было показано, что данная замена приводит к радикальному замещению G261V в белковой последовательности функционального домена GT35_Glycogen_Phosphorylase domain крахмалфосфорилазы PHO1a.

В сравнении с контролем (исходными образцами сортов) мутантные линии характеризовались усиленным образованием корней и побегов. В корнях и листьях сортов и выбранных линий было определено содержание крахмала при нормальных условиях роста (+21 °C), так и в ответ на холодовой стресс (3 дня при +4 °C) (рис. 1). Воздействие низких температур по-разному влияло на содержание крахмала у редактированных растений. Существенные различия в содержании крахмала в листьях наблюдались в случае линий сорта Люкс и отдельных линий остальных сортов, как при нормальных условиях, так и при воздействии низкой температуры. В корнях наблюдались более существенные различия с контролем у всех сортов, за некоторыми исключениями, что предполагает большее участие фермента PHO1a в метаболизме крахмала в корнях и клубнях по сравнению с листьями.

В тех же тканях была изучена экспрессия генов распада крахмала у сортов и редактированных растений (рис. 2, 3). Существенные различия в экспрессии генов наблюдались почти в половине полученных линий в сравнении с исходным сортом. Было замечено, что экспрессия и ее изменение в ответ на холод зависит от генотипа сорта. В корнях паттерн экспрессии генов значительно отличался от паттерна, наблюдаемого в листьях, что снова подчеркивает большую значимость PHO1a для развития корней по сравнению с листьями.

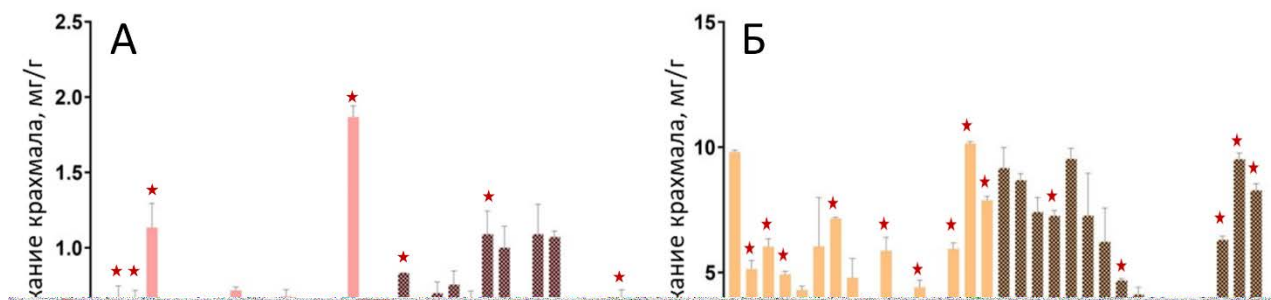


Рисунок 1. Содержание крахмала в листьях (А) и корнях (Б) редактированных линий (1, 2, 3) и сортов (К) картофеля, выращиваемых при контрольных условиях (+21 °С) и в ответ на холодовой стресс (+4 °С). Звездочкой отмечены образцы линий, содержание крахмала в которых существенно отличается от такового в соответствующем сорте

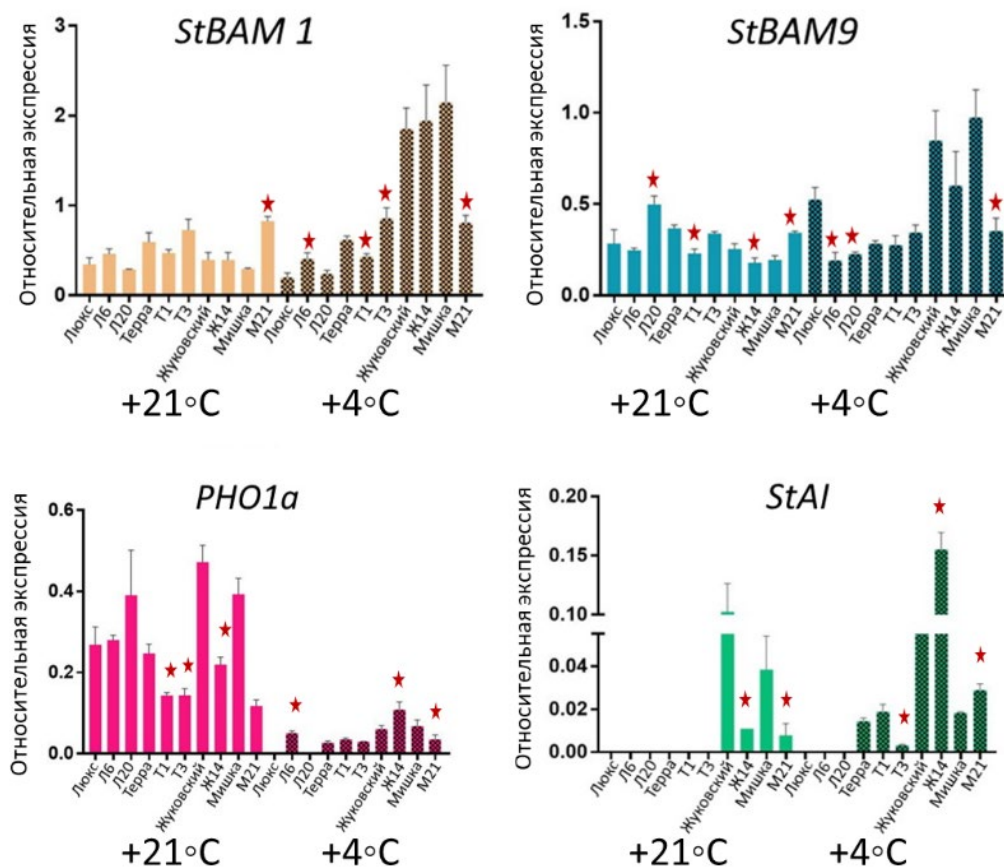


Рисунок 2. Экспрессия генов катаболизма крахмала в листьях редактированных линий и сортов картофеля, выращиваемых при контрольных условиях (+21 °С) и в ответ на холодовой стресс (+4 °С). Звездочкой отмечены образцы линий, уровень генной экспрессии в которых существенно отличается от такового в соответствующем сорте

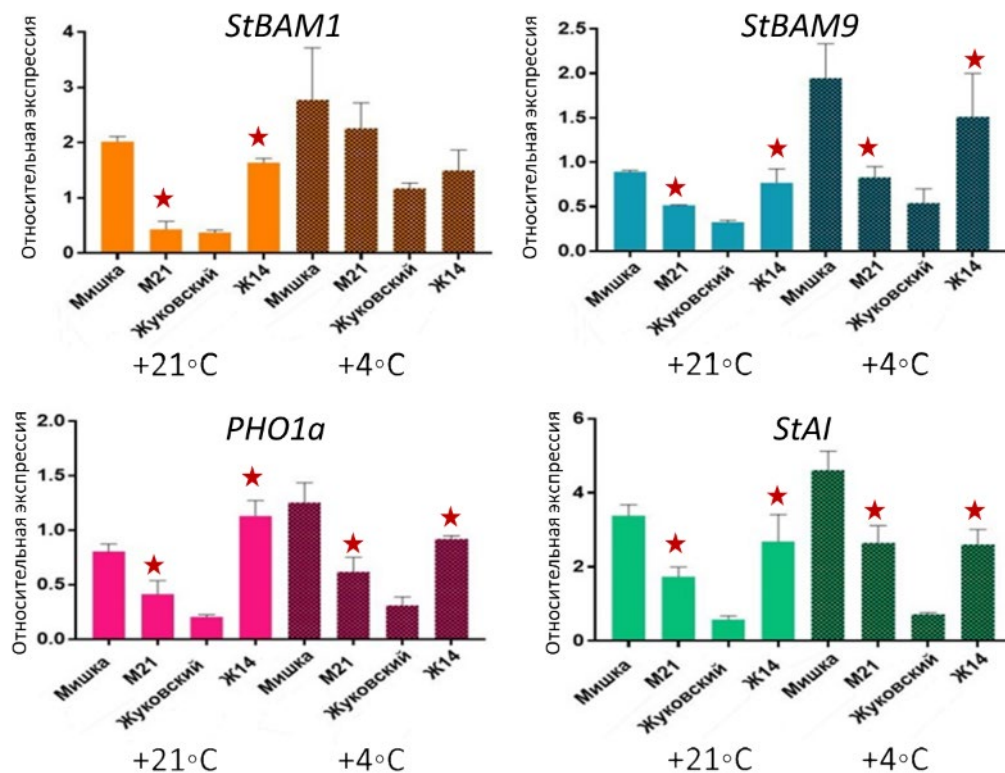


Рисунок 3. Экспрессия генов катаболизма крахмала в корнях редактированных линий и сортов картофеля, выращиваемых при контрольных условиях (+21 °С) и в ответ на холодовой стресс (+4 °С). Звездочкой отмечены образцы линий, уровень генной экспрессии в которых существенно отличается от такового в соответствующем сорте

Полученные данные позволяют предположить, что внесение замены G₇₈₂→T в последовательность гена *PHO1a*, соответствующей радикальному замещению G261V, сопровождается изменением содержания крахмала в тканях растений картофеля, а также уровня экспрессии генов *PHO1a*, *StBAM1* (β-амилаза), *StBAM9* (β-амилаза) и *StAI* (ингибитор амилаз). Такое действие мутации G261V может быть связано либо с изменением каталитической активности белка, либо его способность димеризоваться и / или связываться с субстратом.

Литература

- Arora L., Narula A. Gene editing and crop improvement using CRISPR/Cas9 system //Front Plant Sci. – 2017. – Vol. 8. – P.1932.
- Ma X. et al. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants //Molecular plant. – 2015. – Vol. 8 (8). – P. 1274–1284.
- Naito Y. et al. CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites //Bioinformatics. – 2015. – Vol. 31(7). – P. 1120–1123.
- Prykhozij S.V. et al. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences //PLoS One. – 2015. – Vol. 10(3). – P. e0119372.
- Slugina M.A., et al. The expression pattern of the *Pho1a* genes encoding plastidic starch phosphorylase correlates with the degradation of starch during fruit ripening in green-fruited and red-fruited tomato species //Functional Plant Biology. – 2019. – Vol. 46(12). – P. 1146–1157.