

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ЛИГНИНА У ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ CRISPR-CAS9

Шадрина В.В. (Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени
С.М. Кирова)

Научный руководитель – д.б.н., профессор Потокина Е.К.

(Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова)

Аннотация. Высокое содержание лигнина в древесине хвойных пород является одним из основных факторов, препятствующих переработке древесной биомассы. Селекция древесных пород с пониженным содержанием лигнина является актуальной для целлюлозно-бумажной и перерабатывающей промышленности во всем мире. Данное исследование направлено на разработку методики получения форм ели (*Picea abies*) с пониженным содержанием лигнина на основе технологий генного редактирования CRISPR/Cas9.

Лигнин представляет собой ароматический биополимер – компонент вторичных клеточных стенок растений, который является основным веществом, препятствующим химической варке целлюлозы и переработке растительной биомассы в биотопливо. Для промышленного производства целлюлозы чаще всего используют щепу хвойных пород с мягкой древесиной, в которых содержание лигнина достигает до 38%. На территории центральной и северной Европы ель европейская (*Picea abies*) является самой востребованной породой для производства целлюлозы. Уже сейчас ведутся исследования, которые в будущем позволят снизить содержание лигнина в древесине еще на этапе начала его синтеза. На данный момент уже известны многие гены, кодирующие ферменты биосинтеза лигнина. С помощью методов генной инженерии, и в частности, генного редактирования уже получены некоторые древесные растения со сниженной активностью этих генов.

Ранее, у видов тополя (*Populus sp.*) с помощью антисмысловых мРНК были внесены изменения в гены биосинтеза лигнина CCR, 4CL, COMT, CAD, что привело к снижению содержания лигнина в древесине, однако параллельно были снижены и другие жизненно необходимые для растения биохимические параметры. Аналогичные исследования проводились и с хвойными растениями, однако успех в получении у них древесины с пониженным содержанием лигнина до сих пор не был достигнут из-за преобладания G-лигнина (кониферилового спирта) и сложности получения регенерантов хвойных растений в культуре *in vitro*. Помимо этого, предполагаемые гены-мишени, экспрессию которых удавалось понизить, находились в начале биосинтеза фенилпропаноидного пути, что влияло и на синтез других вторичных метаболитов, играющих значимую роль в развитии и реакции растений на биотические и абиотические стрессы.

С целью снижения содержания лигнина у сеянцев ели мы инициировали эксперимент по редактированию гена CAD, кодирующего дегидрогеназу циннамилового спирта методом CRISPR/Cas9. Этот фермент катализирует конечный этап биосинтеза лигнина с образованием трех монолигнолов - кумарилового, кониферилового и синапилового спиртов, изменяя содержание лигнина в древесине, но не влияя на общую жизнеспособность растения. Именно в этом гене у другого хвойного – сосны ладанной (*Pinus taeda*) была обнаружена естественная мутация (cad-n1), при наличии которой в древесине содержание G-лигнина было снижено на 9%. Кроме того, в гетерозиготном состоянии эта мутация связана с увеличением высоты и плотности древесины, в результате чего ее носители выращиваются на большинстве коммерческих плантаций Северной Америки. Наш эксперимент направлен на имитацию этой природной мутации, выявленной у сосны, в гомологичном гене другого хвойного – ели.

На первом этапе работы последовательности генов-паралогов CAD2, CAD7 и CAD8, депонированные в базе данных NCBI для *Picea abies* были проанализированы в программе UGENE v.39.0 и с помощью программного обеспечения PrimerQuest были сконструированы

праймеры для амплификации 5 экзона. Продукты ПЦР были клонированы с использованием вектора (pAL2-T), колонии со вставкой методом бело-голубой селекции, выделенные из них плазмиды секвенированы по Сэнгеру с использованием генетического анализатора Applied Biosystem. В результате были получены целевые последовательности для редактирования, которые в данный момент используются для создания гидовых РНК.

Важную роль в редактировании генов хвойных пород играет не столько создание редактирующих конструкций, сколько получение эмбрионального каллуса. Для образования жизнеспособных регенерантов *Picea abies* нами был проведен эксперимент, в ходе которого каждые 4 недели осуществлялся сбор верхушечных почек побегов ели и введение их в культуру *in vitro*. Первоначально для введения эксплантов была взята среда MLV, которая в дальнейшем модифицировалась с учетом реакции растительных тканей на концентрацию фитогормонов ауксина и цитокинина, а также на соотношение солей в среде. В результате была успешно получена коллекция эмбриональных каллусов ели.

Результаты проведенного исследования представляют собой первый шаг к получению хвойных деревьев с пониженным содержанием лигнина посредством редактирования гена кодирующего дегидрогеназу циннамилового спирта (CAD) на примере ели *Picea abies*. Получение растений со сниженной экспрессией данного гена позволит упростить и повысить эффективность получения целлюлозы, переработки растительного биосырья в биотопливо и снизит техногенную нагрузку на окружающую среду.

Шадрина В.В. (автор)

Подпись

Потокина Е.К. (научный руководитель)

Подпись