



Гены *Pina* и *Pinb* аллополиплоидной пшеницы как мишень для направленного мутагенеза с целью изменения текстуры зерна

Выполнил:
Магистрант кафедры
информационной биологии
Фомин И.Н.

Руководители:
Хлесткина Елена Константиновна
д.б.н., профессор РАН
г.н.с. сектора функциональной генетики злаков
Афонников Дмитрий Аркадьевич,
к.б.н., в.н.с. лаборатории эволюционной
биоинформатики и теоретической генетики ИЦиГ СО РАН

Твердозерность пшеницы – важный фактор



- Пшеница мягкая – одна из важнейших сельскохозяйственных культур
- Одна из ключевых характеристик пшеницы – степень твердозерности

- Твердозерные сорта больше ценятся, т.к. именно из них делают хлеб и макаронные изделия
- Но используемые на данный момент сорта твердозерной пшеницы по с/х характеристикам далеки от идеала



Твердозерность и гены

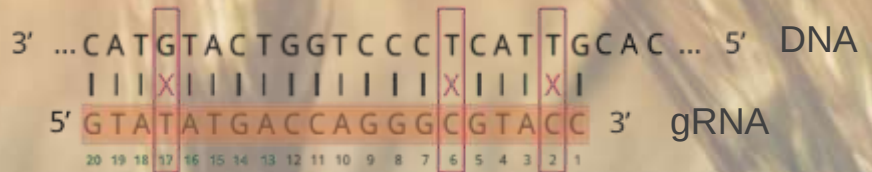
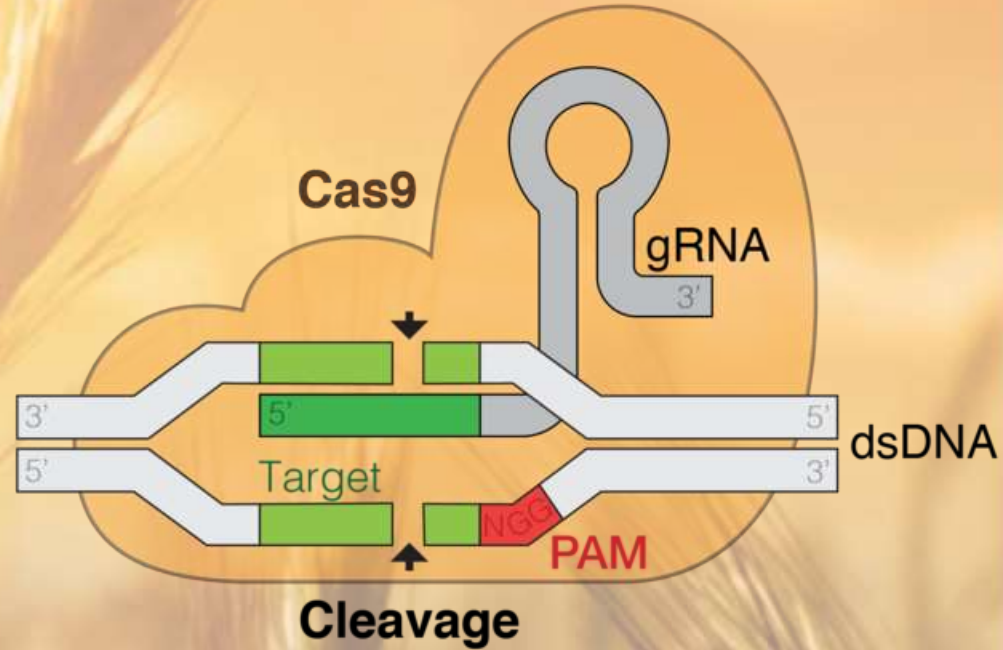
- В конце XX века были обнаружены гены (*Pina* и *Pinb*), отвечающие за текстуру эндосперма зерна.
- Мягкозерные сорта
Функциональные гены
 - ✓ *Pina*
 - ✓ *Pinb*
- Твердозерные сорта
Потеря функциональности
 - ✗ *Pina*
 - ✓ *Pinb*
 - ✓ *Pina*
 - ✗ *Pinb*
 - ✗ *Pina*
 - ✗ *Pinb*
- Было продемонстрировано, что сайленсинг генов *Pina* и *Pinb* посредством РНК-интерференции в мягкозерных сортах ведет к существенному увеличению твердости зерна.

Из мягкозерных – твердозерные

- Есть множество хороших мягкозерных сортов: продуктивные, устойчивые, но для выпечки хлеба они не подходят.
- Методами генной инженерии можно попытаться превратить мягкозерные сорта в твердозерные, сохранив при этом их остальные положительные характеристики.
- Появление системы CRISPR/Cas9 позволило успешно осуществлять генное редактирование даже на таких сложных объектах, как пшеница.

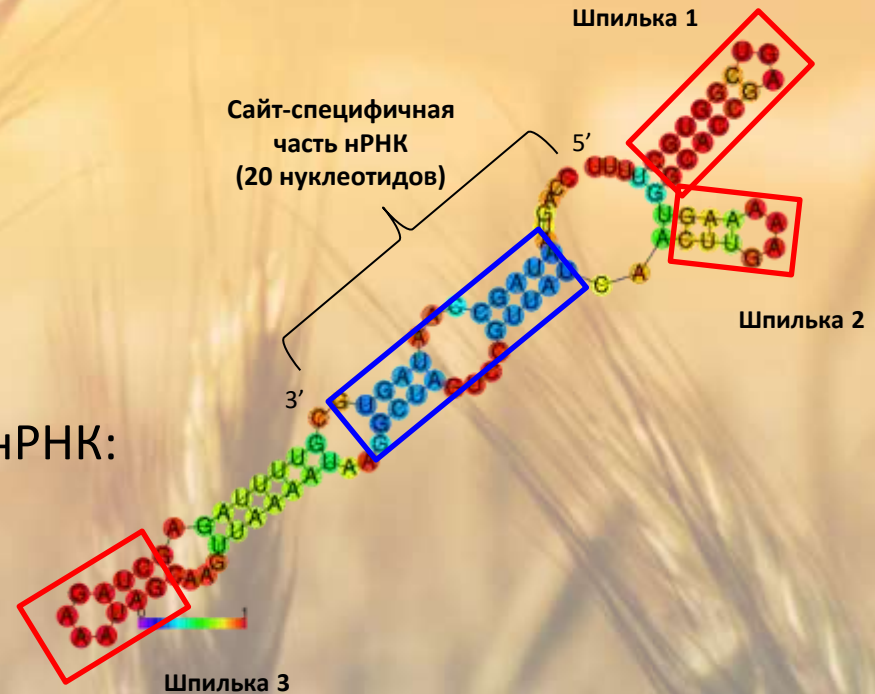
CRISPR/Cas9

- Ключевые моменты:
 - Cas9
 - нРНК (gRNA – guide RNA):
 - Сайт-специфичная часть
 - Каркасная часть
 - PAM
- Основная проблема:
 - Связывание нРНК с нецелевыми участками ДНК (off-target эффект)



Подбор нРНК для CRISPR/Cas9

- Основная задача:
 - Минимизация off-target эффектов
- Дополнительная задача:
 - Высокий уровень потенциальной активности нРНК (правильная 2D-структура)
- Существующие программы подбора нРНК:
 - Отсутствие свежей сборки генома пшеницы
 - Отсутствие валидации правильной вторичной структуры



Цели и задачи

- Подбор нРНК для генов *Pina* и *Pinb* перспективных мягкозерных сортов пшеницы для дальнейшего их редактирования с целью придания им более высокой степени твердозерности.
- Разработать вычислительный конвейер для подбора последовательностей нРНК для генов пшеницы с учетом наиболее полной версии генома.
- С помощью этого конвейера провести дизайн направляющих РНК для нокаута генов *Pina* и *Pinb* мягкозерных сортов пшеницы.
- Среди сибирских мягкозерных сортов пшеницы из коллекции ИЦИГ СО РАН провести выбор перспективных генотипов с учетом их пригодности к культивированию *in vitro* для дальнейшего редактирования генов *Pina* и *Pinb*.
- С целью проверки специфичности нРНК у отобранных перспективных сибирских сортов мягкой пшеницы провести секвенирование их генов *Pina* и *Pinb* и сравнить полученные последовательности с последовательностями этих генов из референсного генома пшеницы.

Материалы и методы. Биоинформатика

- Выравнивание последовательностей:
 - BLASTN, MEGA7
- Первоначальный подбор вариантов нРНК:
 - DESKGEN
- Валидация вторичной структуры нРНК:
 - RNAfold
- Среда программирования:
 - Python версии 3.6 с интегрированной средой разработки JetBrains PyCharm
- Дополнительные библиотеки для среды программирования:
 - Selenium WebDriver – библиотека для автоматизации действий веб-браузера
 - BeautifulSoup – парсер для синтаксического разбора файлов HTML/XML
 - Pandas – обработка данных и работа с таблицами
 - Модуль NCBIWWW из пакета Biopython и др.

Материалы и методы. Эксперимент

- Методы:
 - Выделение ДНК
 - ПЦР и Электрофоретический анализ ДНК в агарозном геле
 - Секвенирование
 - Работа с культурой тканей растений
- Растительный материал (сорта мягкозерной пшеницы):

– Пиротрикс 28	– Альбидум 3700	– ГДС 11
– Селенгинская	– Балаганка	– Тарская 2
– Аленькая	– Лютесценс 62	– Краса
– Голубка	– Иркутская 49	– Жница
– Красноярская 1103	– Родина	
– Омская 2078	– Победа	– Чайниз Спринг

Задача 1: Вычислительный конвейер для подбора нРНК



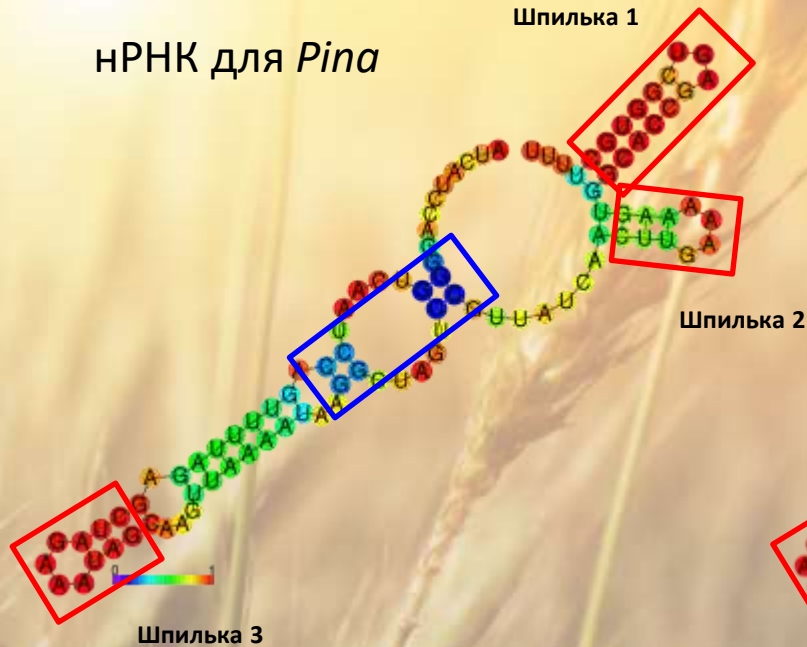
Результат работы конвейера

- Таблица, которая сохраняется в excel-файл
- Ключевые данные таблицы:
 - Последовательность нРНК
 - Количество всех потенциальных нецелевых сайтов связывания и суммарная величина параметра неспецифичной активности в этих сайтах
 - Количество потенциальных нецелевых сайтов, которые являются частью известных генов, список их идентификаторов (NCBI Accession Number) и суммарная величина параметра неспецифичной активности в этих сайтах
 - Степень активности нРНК, полученная из входных данных
 - Результат расчета вторичной структуры программой RNAfold в виде ссылки на страницу с результатом
- На основе этих данных подбираются оптимальные варианты нРНК

Задача 2: Выбор наиболее перспективных нРНК

	gRNA_Seq	PAM	OT_Num	OT_Rate_Sum	CDS_OT_Num	OT_Rate	CDS_AN_List	Act_Rate
<i>Pina</i>	ATCATCCAGGGGTCAATCCA	AGG	2	0,042	0	0	[]	55
<i>Pinb</i>	TTCGCGCAATACTCAGAAGT	TGG	0	0	0	0	[]	60

нРНК для *Pina*



нРНК для *Pinb*



Задача 3: Выбор сортов для трансформации

Каллусообразование



Критерий отбора:

- Размер каллусов более 5мм

Транзиция



Критерий отбора:

- Первичная дифференцировка клеток

Регенерация



Критерий отбора:

- Наличие корневой системы
- Наличие побегов

Результаты Эксперимента №1

- Каллусы всех сортов, дошедшие до финального этапа, показали хорошую способность к образованию корней.
- Доля побегов, напротив, была очень мала (исключение сорт «Краса»)
- Поэтому основным критерием отбора лидеров по результатам Эксперимента 1 была взята доля каллусов давших побеги
- Вторичным критерием было взято количество образцов, дошедших до этапа №3

№	Сорт	Этап №1 Кол-во образцо	Этап №2 Кол-во образцо	Этап №3 Кол-во образцо	Каллусы с Корнями кол-во	Каллусы с Корнями %	Каллусы с Побегами кол-во	Каллусы с Побегами %
3	Краса ✓	20	20	20	20	100,00%	11	55,00%
6	Альбидум 3700	20	18	6	5	83,33%	1	16,67%
7	Балаганка	20	18	13	13	100,00%	2	15,38%
17	Чайниз Спринг	20	20	7	7	100,00%	1	14,29%
1	Жница ✓	20	19	17	16	94,12%	2	11,76%
5	Аленькая	20	20	12	12	100,00%	1	8,33%
11	Иркутская49	20	15	14	14	100,00%	1	7,14%
14	Родина	20	20	14	14	100,00%	1	7,14%
16	Пиротрикс 28	20	20	14	14	100,00%	1	7,14%
15	Голубка	20	20	20	20	100,00%	0	0,00%
8	Красноярская 1103	20	20	18	18	100,00%	0	0,00%

Результаты Эксперимента №2

- Повторный эксперимент, проведенный по той же самой схеме, но с большим количеством образцов, подтвердил первоначальные данные

Сорт	Этап №1 Кол-во образцов	Этап №2 Кол-во образцов	Этап №3 Кол-во образцов	Каллусы с Корнями	Каллусы с Корнями, %	Каллусы с Побегами	Каллусы с Побегами, %
Краса ✓	69	50	24	24	100,00%	18	75,00%
Жница	72	47	22	22	100,00%	2	9,09%

- Сорт «Краса» обладает наиболее высокой способностью к культивированию *in vitro* и является перспективным для генной модификации с целью повышения степени твердозерности

Проверка специфичности нРНК для сорта Краса

- Выравнивание для гена *Pina* в программе MEGA7

[illegible]

- Выравнивание для гена *Pinb* в программе MEGA7

[illegible]

- Оба гена выбранного сорта Краса идентичны референсным последовательностям из генома пшеницы, на основе которых проводился подбор направляющих РНК
- Выбранные варианты нРНК можно использовать для трансформации сорта Краса

Выводы

- Создан вычислительный конвейер, который позволяет оценивать дополнительные характеристики потенциальных нРНК для генов пшеницы, включая идентификацию нецелевых мишеней, эффективность разрезания ДНК, вторичную структуру РНК. При этом используется свежая версия сборки генома пшеницы.
- Разработанный конвейер был использован для подбора направляющих РНК для генов *Pina* и *Pinb* мягкой пшеницы.
- На основе тестирования характеристик каллусообразования, транзиции и регенерации из 16 сортов сибирской коллекции ИЦиГ СО РАН был отобран сорт «Краса», проявивший наиболее высокую способность к культивированию *in vitro*, как наиболее перспективный для дальнейшей трансформации в задаче геномного редактирования генов *Pina* и *Pinb*.
- По итогам проведенного секвенирования генов *Pina* и *Pinb* у сорта «Краса» было установлено, что последовательности этих генов совпадают с последовательностями соответствующих генов из базы данных GenBank по всей длине, включая участки потенциального связывания нРНК, что свидетельствует о применимости отобранных нРНК к использованию для трансформации данного сорта с помощью системы CRISPR/Cas9.