

**В. А. Комарова**

Науч. рук.: **И. И. Концевая**, канд. биол. наук, доцент

## **РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9 ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ЛИГНИНА У ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ**

*В работе представлены результаты разработки системы CRISPR/Cas9 для направленного редактирования ключевых генов биосинтеза лигнина (CSE1, CCoAOMT1, CCR, CAD2, LCC2) у представителей родов *Populus* и *Fraxinus*. Проведен сравнительный анализ геномов 51 вида древесных растений, идентифицированы консервативные участки генов-мишеней. С использованием алгоритмов *in silico* (CRISPOR) разработаны 27 высокоспецифичных гидРНК с эффективностью 47–76 % и специфичностью > 95 %. Успешно осуществлено клонирование плазмидных векторов pHSE401 и pGH00.0126 в *E. coli* с последующей молекулярной верификацией. Оптимизированы протоколы выделения плазмидной ДНК (конечная концентрация 20–30 нг/мкл, коэффициент чистоты A260/280 = 1,8–2,2).*

Современные достижения в области геномного редактирования, в частности технология CRISPR/Cas9, открывают новые перспективы для направленной модификации геномов высших растений. Особый интерес представляет редактирование генов, кодирующих ферменты биосинтеза лигнина - сложного полимерного соединения, составляющего 15–35 % массы древесины.

Высокое содержание лигнина существенно затрудняет процессы целлюлозно-бумажного производства и биоконверсии растительной биомассы. Молекулярно-генетические исследования последних лет идентифицировали ключевые гены лигнинового метаболизма, включая CSE1 (кофеилшикиматэстеразу), CCoAOMT1 (кофеил-КоА-О-метилтрансферазу), CCR (циннамоил-КоА-редуктазу), CAD2 (циннамилалкогольдегидрогеназу) и LCC2 (лакказу).

Род *Populus* (тополь) представляет собой модельный объект для изучения молекулярных механизмов формирования древесины, что обусловлено наличием полностью секвенированного генома и отработанными методами генетической трансформации. Разработка универсальных инструментов для редактирования генов лигниногенеза у различных таксонов древесных растений имеет значительный потенциал для прикладного применения в лесной биотехнологии.

Конструирование гидРНК осуществляли с использованием алгоритмов онлайн-платформы CRISPOR, учитывая следующие параметры:

- 1 GC-состав (40–60 %).
- 2 Отсутствие офф-таргет эффектов (специфичность > 95 %).
- 3 Наличие консервативного РАМ-мотива (5'-NGG-3').
- 4 Клонирование плазмидных векторов проводили в штамме *E. coli* DH5 $\alpha$  с последующей ПЦР-верификацией и секвенированием.

Анализ геномных последовательностей выявил высокую степень консервативности исследуемых генов лигниногенеза среди различных таксонов древесных растений. Наибольший полиморфизм наблюдался в интронных регионах, в то время как кодирующие последовательности демонстрировали > 85% гомологии.

Для каждого гена-мишени разработано от 3 до 5 вариантов гидРНК, расположенных в первых экзонах кодирующих последовательностей (рисунок 1). Расчетная эффективность редактирования варьировала от 47 % до 76 %, при этом все конструкции демонстрировали высокую специфичность (> 95 %) по данным *in silico* анализа.

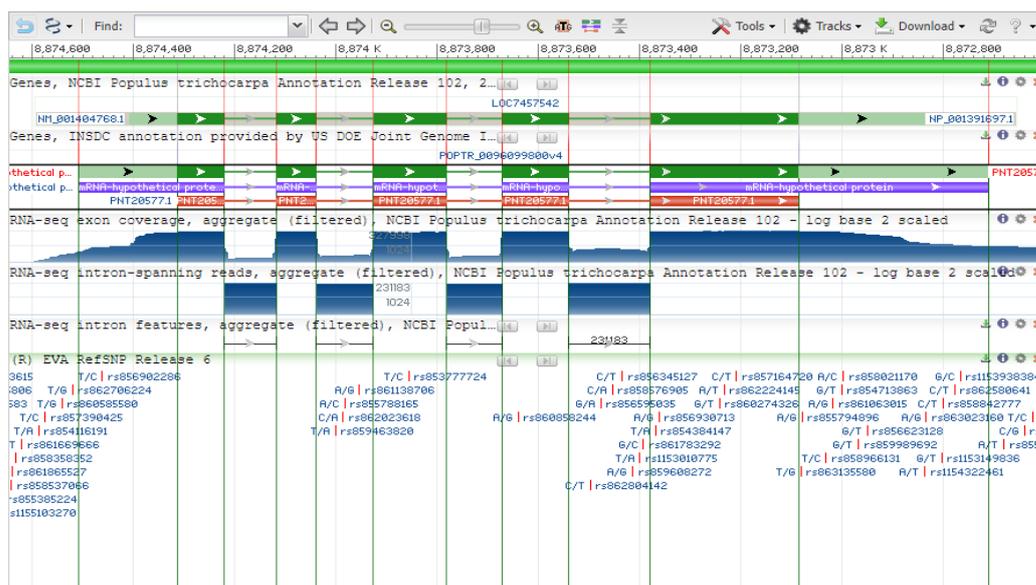


Рисунок 1 – Схема строения и локализация гена CCoAOMT1 (на примере *P. trichocarpa*)

На базе онлайн-инструмента CRISPOR были сконструированы последовательности гидРНК, соответствующие фрагментам первых экзонов, включенных в открытые рамки считывания исследуемых генов. Перечень разработанных гидРНК для генетического редактирования исследуемых видов лесных древесных растений с расчетными специфичностью и эффективностью представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Разработанные гидРНК для генетического редактирования исследуемых видов лесных древесных растений

Организм	Номер, цель	Последовательность	РАМ	Специфичность	Эффективность	Ген-мишень
1	2	3	4	5	6	7
<i>P. abies</i>	1-	CTCTGTTATGTGCAGGGGTT	GGG	100	76	CAD2
	2-	CTTGCTAACAAGATAAGCAT	CGG	96	63	CAD2
	3+	TACAATGATGTGAACCATGA	CGG	90	61	CAD2
	1+	TGGACGTATGGCTGACGTTG	TGG	100	59	LCC2
	2-	GAATAACGAATGTCTCGCCG	CGG	100	71	LCC2
	3-	AAACGCGTCTGAAACGTTGG	GGG	98	76	LCC2
	1+	GACTGCAGGTAACAACAACTG	GGG	99	62	CCR
	2+	AGGAACAGTTCGCAACCCTG	AGG	99	71	CCR
	3-	GACTGCAGGTAACAACAACTG	GGG	99	70	CCR
<i>P. alba</i>	1-	GCCGTGGGTTCATATATACCG	TGG	85	74	CSE1
	2+	CTGTTACAGGATATGCAGCT	CGG	96	56	CSE1
	3-	TGGCGTCTCGAAGTATGATT	GGG	99	47	CSE1
	1+	ATGCATGAAGGAGCTCAGGG	AGG	99	73	CCoAOMT
	2+	CACTGCTCTTGCTATCCCTG	AGG	93	69	CCoAOMT
	3-	CATGATGTTCCAAGGATGCT	TGG	97	58	CCoAOMT
<i>P. trichocarpa</i>	1+	GCAGGAAGGCACCAGGAAGT	TGG	99	49	CCoAOMT1
	2-	GTATATATGACCCACGGCGG	NGG	97	68	CCoAOMT1
	3-	AGTGGTGTAGGCGGGAAGAG	TGG	99	58	LCC2
<i>F. excelsior</i>	1+	CGTACAACCTTCACTATCACA	GGG	94	73	LCC2
	2+	GTGGTGGAAATGCAGATCCTG	AGG	98	71	LCC2
	3+	TTCACTATCACAGGGCAGAG	AGG	59	69	LCC2

Особый интерес представляют результаты по гену CCoAOMT1 *P. trichocarpa*, где одна из гидРНК (GTATATATGACCCACGGCGG) показала аномально высокую эффективность (68 %) при неканоническом РАМ-мотиве (NGG), что требует дополнительного экспериментального подтверждения.

Разработанная система CRISPR/Cas9 представляет собой эффективный инструмент для направленного редактирования генов биосинтеза лигнина у древесных растений. Полученные результаты создают основу для дальнейших исследований по:

- агробактериальной трансформации модельных видов;
- анализу фенотипических эффектов редактирования;
- оценке технологических свойств модифицированной древесины.

Перспективы работы включают разработку универсальных CRISPR-конструкций для различных таксонов древесных растений и создание линий с улучшенными технологическими характеристиками для целлюлозно-бумажной и биоэнергетической промышленности.

### Литература

1 An Y. et al. Efficient Genome Editing in Populus Using CRISPR/Cas12a // Front. Plant Sci. - 2020. - Vol. 11 – P. 593.

2 Bae, E.-K. et al. Efficient knockout of the phytoene desaturase gene in a hybrid poplar (*Populus alba* × *Populus glandulosa*) using the CRISPR/Cas9 system with a single gRNA / E.-K. Bae et al. // Transgenic Research. – 2021. – Vol. 30, № 6. – P. 837–849.

3 Liu Q., Luo L., Zheng L. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. Int. J. Mol. Sci. 2018. – Vol. 19. – P. 335.

4 Adhikari, P. CRISPR-Cas9 in agriculture: Approaches, applications, future perspectives, and associated challenges / P. Adhikari, M. Poudel // Malaysian Journal of Halal Research. – 2020. – Vol. 3.

5 Weng J.-K. et al. The origin and evolution of lignin biosynthesis. New Phytol. 2010. – № 187. – P. 273–285.

6 Vanholme, R. et al. Lignin biosynthesis and its integration into metabolism / R. Vanholme et al. // Current Opinion in Biotechnology. – 2019. – Vol. 56, – P. 230–239.

7 National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. – 2024. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. – Дата доступа: 10.02.2025.

8 CRISPOR [Электронный ресурс]. – 2024. – Режим доступа: <http://crispor.tefor.net>. – Дата доступа: 27.01.2024.

УДК 582.29(476)

**П. А. Корж**

*Науч. рук.: А. Г. Цуриков, д-р биол. наук, доцент*

### ЛИШАЙНИКИ ПОСЕЛКА ОЗЕРНЫЙ ЖИТКОВИЧСКОГО РАЙОНА

*Целью исследований являлось изучение видового разнообразия лишайников посёлка Озерный и его окрестностей. Было найдено 45 видов*