5. Bhaskar, C. Genetic and Genomic Resources for Grain Cereals Improvement / Bhaskar C. Patra, Soham Ray, Umakanta Ngangkham, Trilochan Mohapatra. – 1: Rice, 2016. – P. 1–80.
6. Kehu, Li. Genotypic diversity and environmental stability of starch physicochemical properties in the USDA rice mini-core collection / Kehu Li, Jinsong Bao, Harold Corke, Mei Sun // Food Chemistry. – V. 221. – 2017. – P. 1186–1196.
7. С.М. Алексанян, Стратегия взаимодействия генбанков мира в условиях глобализации / Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Т. 164. – СПб.: ВИР, 2007. – С. 11–33.
8. Коротенко, Т.Л. Взаимосвязь биологических, биохимических и технологических признаков качества генплазмы коллекции риса / Т.Л. Коротенко, СС. Чижикова, Р.А. Пустовалов Р.А. / Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада, 2019. – № 133. – С. 174–181.
9. Туманьян, Н.Г. Классификация сортов риса генетической коллекции на основе агрегированного интегрального показателя качества зерна / Н.Г. Туманьян, Т.Б. Кумейко, Г.Л. Зеленский и др. // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – №114. – С. 1580–1591.
10. Харитонов Е.М. Экологические аспекты селекционно-генетических исследований по рису / Е.М. Харитонов, Ю.К. Гончарова / Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2017. – № 3 (66). – С. 47–55.

DOI 10.18699/GPB2020-41

Получение голозерных линий ячменя после направленной модификации гена *Nud* методом CRISPR/Cas

Короткова А.М.¹, Колосовская Е.В.¹, Герасимова С.В.¹, Кукоева Т.В.¹, Хлесткина Е.К.^{1,2}

¹ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия;

²ВИР, Санкт Петербург, Россия

*e-mail: korotkova@bionet.nsc.ru

Ген Nud ячменя кодирует транскрипционный фактор, ответственный за образование липидного слоя на поверхности зерна, который, при созревании, приводит к прилипанию цветковых чешуй к зерновке и формированию, таким образом, свойства пленчатости зерна. После проведения направленной модификации генома ячменя сорта Golden promise методом CRISPR/Cas по гену Nud был получен ряд мутантов поколения T0, семена которых были голозерными. В результате отбора в трех поколениях были выделены три голозерные линии растений с гомозиготными мутациями в гене Nud: две линии несут делеции (-1 п.н.) и (-3 п.н.), одна линия содержит однонуклеотидную инсерцию (+1 п.н.).

Ключевые слова: CRISPR/Cas, ячмень, Nud, геномное редактирование, пленчатость, голозерность.

Development of naked barley lines after targeted modification of the *Nud* gene using gRNA/CAS9 system

Korotkova A.M.¹, Kolosovskaya E.V.¹, Gerasimova S.V.¹, Kukoeva T.V.¹, Khlestkina E.K.^{1,2}

¹ICG SB RAS, Novosibirsk, Russia; ²VIR, St. Petersburg, Russia.

korotkova@bionet.nsc.ru

*The *Nud* gene in barley encodes the transcription factor responsible for the formation of the lipid layer on the surface of the grain, which leads to the adhesion of lemma and palea to the pericarp and the formation of hulled phenotype. After a targeted modification of the barley genome using RNA-guided endonuclease Cas9, a number of T0 primary regenerated plants with mutations in the *Nud* gene were obtained. As a result of selection in three generations, three naked barley lines with homozygous mutations in the *Nud* gene were developed: two lines carry deletions (-1 bp and -3 bp), one line contains a single nucleotide insertion (+1 bp).*

*Key words: CRISPR/Cas, barley, *Nud*, genome editing, hulled barley, naked barley.*

Методы геномного редактирования растений бурно развиваются в последние годы [1], однако работ по редактированию ячменя не много, что обусловлено сложностью редактирования геномов однодольных растений [2].

С помощью двух разных направляющих РНК (*Nud45* и *Nud50*) методом модификации генома с использованием РНК-направленной нуклеазы Cas9 были получены растения T0 с различными мутациями в гене *Nud* ячменя. В случае использования нРНК *Nud45* мутации в целевом гене сопровождались мутациями в нецелевых локусах: гене *HvWin1* и двух безымянных генах, расположенных на хромосомах 6Н и 7Н [3]. Модификация проводилась на сорте Golden promise. Всего в популяции первичных регенерантов T0 было получено 99 растений, среди которых встречались и гетерозиготы по мутациям в гене *Nud*, и дикий тип, и растения с биаллельной мутацией (два аллеля гена *Nud* содержат разные типы мутаций).

Для получения второго поколения T1 были отобраны интересные нас генотипы для перевода их в гомозиготное состояние, были посеяны семена 9 растений из каждой группы первичных регенерантов (*Nud45* и *Nud50*). В том числе была выделена линия, несущая исходный вариант гена *Nud*, качестве контрольной группы. Растения поколения T1 были проверены на наличие генов Cas9 направляющей РНК, среди растений, не несущих данные гены, выделены три нетрансгенные линии с мутациями в гене *Nud* (-3 п.н., -1 п.н., +1 п.н.) и без мутаций в нецелевых локусах. Две выделенные линии содержат мутации со сдвигом рамки считывания, и одна линия мутацию без сдвига рамки считывания. Все три линии растений несут в себе свойство голозерности – чешуи не прилипают к зерну и легко обмолачиваются. Голозерность является важным селекционным признаком, который

сложно получить с помощью обычных селекционных методов без ухудшения исходных характеристик сорта.

Растения отобранных линий были высажены в теплице в количестве 10–13 растений на линию. Из каждого растения была выделена геномная ДНК, при помощи секвенирования было подтверждено единообразие последовательностей гена *Nud* в каждой линии. Отсутствие трансгенности было подтверждено при помощи ПЦР-теста. Проведен сноповой анализ и сравнение с контролем. Результаты находятся в стадии обработки.

В результате работы получены три устойчивые нетрансгенные голозерные линии ячменя сорта Golden promise с разными мутациями в гене *Nud*.

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-14-00086).

Список литературы

1. Korotkova A.M. Current achievements in modifying crop genes using CRISPR/Cas system / A.M. Korotkova, S.V.Gerasimova, E.K. Khlestkina. // Vavilov journal of genetics and breeding –2019. – 23(1). – С. 29–37.
2. Gerasimova S.V. Genome editing system CRISPR/CAS9 and peculiarities of its application in monocots / S.V. Gerasimova, E.K. Khlestkina, A.V. Kochetov, V.K. Shumny // Russ. J. Plant Physiol – 2017. – Vol. 64, № 2. – С. 141–155.
3. Gerasimova S. Conversion of hulled into naked barley by Cas endonuclease-mediated knockout of the NUD gene / S. Gerasimova, C. Hertig, A. Korotkova, E. Kolosovskaya, I. Otto, S. Hiekel, A. Kochetov, E. Khlestkina, J. Kumlehn // BMC Plant Biology – 2020. – in press.

DOI 10.18699/GPB2020-42

Поиск и анализ гена-кандидата признака остистости мягкой пшеницы *Triticum Aestivum* L.

Куваева Д.Д.^{1,2}, студентка, Щербань А.Б.², д.б.н., с.н.с.

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия;

²Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

*e-mail: diana.kuvaeva@gmail.com

Проведен анализ первичной структуры генов-кандидатов, контролирующих проявление признака остистости в составе В1 локуса 5А хромосомы у остистых и безостых форм пшеницы. В результате было установлено, что ген *C2H2Znfp1* является наиболее вероятным кандидатом гена-ингибитора признака остистости мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. Комбинации специфических для рецессивного и доминантного аллелей этого гена праймеров показали точные результаты на выборке остистых и безостых форм.

Ключевые слова: пшеница, остистость, ген, локализация.