


doi 10.18699/vjgb-25-122

Исследование потомства мутантов сорго, полученных с использованием генетической конструкции CRISPR/Cas9, направленной на индукцию мутаций в гене α -кафирина *k1C5*

Л.А. Эльконин , Г.А. Геращенко , Н.В. Борисенко , С.Х. Сарсенова , В.М. Панин 

¹ Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов, Россия

² Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

 elkonin@gmail.com

Аннотация. Сайт-направленный мутагенез посредством генетических конструкций, несущих систему CRISPR/Cas, считается эффективной технологией, активно применяемой для решения самых разных задач генетики и селекции у многих возделываемых культур. Зерновое сорго – уникальная по своей засухоустойчивости и жаростойкости злаковая культура, служащая источником кормов и пищевого зерна в аридных регионах земного шара, приобретающая все большее значение в условиях глобального потепления климата. Одной из основных задач селекции сорго является улучшение сравнительно низкой питательной ценности зерна, обусловленной в том числе устойчивостью его запасных белков – кафиринов – к протеолитическому расщеплению. Нами ранее путем использования технологии CRISPR/Cas у зернового сорго сорта Аванс были получены мутанты с улучшенной перевариваемостью кафиринов в системе *in vitro*. При этом в качестве мишени был выбран один из членов генного семейства, кодирующего 22 кДа α -кафирин, а именно ген *k1C5*. Цель данного исследования – изучение потомства полученных нами ранее растений, несущих мутации в гене *k1C5*, отличающихся улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, а именно: анализ наследования высокой перевариваемости, проявления основных селекционно ценных признаков, а также выявление структуры нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α -кафирина у ряда растений из поколения T_0 и их потомства T_1 . Обнаружено, что у четырех из шести изученных растений T_0 , а также у их потомства присутствует одна и та же мутация: замена Т→С в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, кодирующей сигнальный полипептид, которая привела к замене кодирующего триплета СТС→ССС (Leu→Pro). Эта мутация располагается за пределами выбранной мишени, в направлении 3' от последовательности РАМ. Высказывается предположение, что данная мутация могла возникнуть в результате ошибок нуклеазы Cas9, обусловленных наличием нескольких последовательностей РАМ, расположенных близко друг к другу. Установлено, что потомство двух из трех изученных мутантов (семьи T_2 и T_3), выращенное в условиях опытного поля, отличалось от исходного сорта сниженной высотой растения (на 12.4–15.5 %). Длина цветоножки, масса 1000 зерен и масса зерна с метелки не отличались от исходного сорта, за исключением потомства мутанта 2С-1.2.5b, у которого урожай зерна с метелки был снижен. В отличие от исходного сорта, у растений из поколений T_2 и T_3 присутствовали зерновки с модифицированным типом эндосперма (полностью мучнистым, либо с вкраплениями стекловидного эндосперма, либо с тонким стекловидным слоем). Уровень перевариваемости белков зерна в потомстве мутантов 2С-2.1.1 № 13 и 2С-1.2.5a № 14 варьировал от 77 до 84 %, значимо превышая показатель исходного сорта ($63.4 \pm 2.3 \%$, $p < 0.05$). Уровень перевариваемости белков из зерновок с модифицированным эндоспермом был выше, чем у зерновок с обычным стекловидным эндоспермом ($84–93 \%$, $p < 0.05$). Обсуждаются причины варьирования текстуры эндосперма у потомства полученных мутантов и ее связь с высокой перевариваемостью кафиринов.

Ключевые слова: *Sorghum bicolor*; CRISPR/Cas; альфа-кафирин; перевариваемость *in vitro*; эндосперм

Для цитирования: Эльконин Л.А., Геращенко Г.А., Борисенко Н.В., Сарсенова С.Х., Панин В.М. Исследование потомства мутантов сорго, полученных с использованием генетической конструкции CRISPR/Cas9, направленной на индукцию мутаций в гене α -кафирина *k1C5*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2025;29(8):1161-1168. doi 10.18699/vjgb-25-122

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 24-16-00063.

Study of the progeny of sorghum mutants obtained using the CRISPR/Cas9 genetic construct directed at inducing mutations in the α -kafirin *k1C5* gene

L.A. Elkonin , G.A. Gerashchenkov , N.V. Borisenko , S.Kh. Sarsenova , V.M. Panin 

¹ Federal Centre of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

 elkonin@gmail.com

Abstract. Site-directed mutagenesis using genetic constructs carrying the CRISPR/Cas system is an effective technology that is actively used to solve a variety of problems in plant genetics and breeding. One of these problems is to improve the nutritional value of grain sorghum, a high-yielding heat- and drought-tolerant cereal crop that is becoming increasingly important in the conditions of climate aridization. The main reason for the relatively low nutritional value of sorghum grain is the resistance of its storage proteins, kafirins, to proteolytic digestion. We have previously obtained mutants with improved kafirin *in vitro* digestibility using the CRISPR/Cas technology in grain sorghum variety Avance. The nucleotide sequence of one of the genes (*k1C5*) of the gene family encoding the signal polypeptide of 22 kDa α -kafirin was used as a target. The aim of this study was to investigate the manifestation of the main agronomically-important traits in the progeny of these mutants and inheritance of high *in vitro* protein digestibility, and also sequencing nucleotide sequences encoding the 22 kDa α -kafirin signal polypeptide in a number of plants from the T_0 generation and their T_1 progeny. It was revealed that four of the six studied T_0 plants, as well as their progeny, had the same mutation: a T→C substitution in the 23rd position of the nucleotide sequence of the *k1C5* gene encoding the signal polypeptide, which led to a substitution of the coding triplet CTC→CCC (Leu→Pro). This mutation is located off-target, 3' from the PAM sequence. It is suggested that this mutation may have arisen as a result of Cas9 nuclease errors caused by the presence of multiple PAM sequences located close to each other. It was found that the progeny of two of the three studied mutants (T_2 and T_3 families), grown in the experimental field conditions, differed from the original variety by a reduced plant height (by 12.4–15.5 %). The peduncle length, 1,000-grain mass, and grain mass per panicle did not differ from the original variety, with the exception of the progeny of the 2C-1.2.5b mutant, which had a reduced grain yield per panicle. Unlike the original variety, plants from the T_2 and T_3 generations had kernels with a modified type of endosperm (completely floury, or floury with inclusions of vitreous endosperm, or with a thin vitreous layer). The level of grain protein digestibility in the progeny of mutants 2C-2.1.1 #13 and 2C-1.2.5a #14 varied from 77 to 84 %, significantly exceeding the original variety (63.4 ± 2.3 %, $p < 0.05$). The level of protein digestibility from kernels with modified endosperm was higher than that of kernels with normal vitreous endosperm (84–93 %, $p < 0.05$). The reasons for the variation in endosperm texture in the progeny of the mutants and its relationship with the high digestibility of kafirins are discussed.

Key words: *Sorghum bicolor*; CRISPR/Cas; α -kafirins; *in vitro* protein digestibility; endosperm

For citation: Elkonin L.A., Gerashchenkov G.A., Borisenko N.V., Sarsenova S.Kh., Panin V.M. Study of the progeny of sorghum mutants obtained using the CRISPR/Cas9 genetic construct directed at inducing mutations in the α -kafirin *k1C5* gene. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed*. 2025;29(8):1161-1168. doi 10.18699/vjgb-25-122

Введение

Внесение изменений в нуклеотидные последовательности генов посредством технологии геномного редактирования CRISPR/Cas – эффективный инструмент генетики и селекции растений (Zhu et al., 2020; Gao, 2021; Saini et al., 2023). За последние годы эта технология стала интенсивно использоваться у многих видов возделываемых растений, включая сорго – уникальную по своей засухоустойчивости и жаростойкости злаковую культуру, служащую источником кормов и пищевого зерна в аридных регионах земного шара. Хотя сорго считается трудно трансформируемым видом злаков, к настоящему времени появилось немало работ по редактированию его генома с помощью технологии CRISPR/Cas, обобщенных в ряде обзоров (Balakrishna et al., 2020; Parikh et al., 2021; Wong A.C.S. et al., 2022).

Одним из наиболее актуальных направлений селекции сорго является улучшение перевариваемости запасных белков зерна. Зерно сорго содержит значительное количество белка (в среднем 10–12 %, а в некоторых линиях до 16–18 %), представленного разными классами кафиринов (α , β , γ , δ), относящихся к спирторастворимым белкам – проламинам, которые составляют до 70–80 % от общего содержания белка, и некафириновых белков (альбуминов, глобулинов, глютенинов), состав которых слабо изучен (Bean et al., 2018). Разные классы кафиринов различаются по молекулярной массе, аминокислотному составу и кодируются разными генами. Важная особенность кафиринов – устойчивость к протеолитическому расщеплению, в результате чего уровень перевариваемости белков зерна в системе *in vitro* у подавляющего большинства сортов и гибридов не превышает 40–60 % (Wong J.H. et al., 2010; Elkonin et al., 2013; Duressa et al., 2018). Такая

устойчивость кафиринов к протеолитическому расщеплению снижает не только их усвояемость животными и человеком, но и перевариваемость крахмала, содержание которого в зерне составляет в среднем 70–72 %, поскольку непереваренные кафирины препятствуют полному амилолитическому расщеплению крахмальных гранул (Zhang, Hamaker, 1998; Ezeogu et al., 2005; Wong J.H. et al., 2009).

Устойчивость кафиринов к расщеплению протеазами имеет многофакторную природу (Belton et al., 2006; Duressa et al., 2018). К числу таких факторов относятся: химическая структура кафиринов, которые богаты серосодержащими аминокислотами (особенно γ - и β -кафирины), способными к формированию внутри- и межмолекулярных сшивок и препятствующими, как считается, протеолитическому расщеплению кафиринов; взаимодействие кафиринов с полифенолами, ингибирующими активность протеаз. Важным фактором является пространственная организация разных кафиринов в белковых тельцах клеток эндосперма. На ранних стадиях развития эндосперма происходит синтез γ - и β -кафиринов, которые депонируются в белковых тельцах, развивающихся в эндоплазматическом ретикулуме. Альфа-кафирин, синтезирующийся на более поздних этапах эндоспермогенеза, располагается внутри белковых телец, отодвигая γ -кафирин к периферии, который образует «кожух», трудноперевариваемый протеазами (De Mesa-Stonestreet et al., 2010; Duressa et al., 2018).

В результате исследования мутантов с нарушенным синтезом кафиринов, полученных с помощью РНК-интерференции (Elkonin et al., 2021), было установлено, что частичное блокирование синтеза кафиринов значительно улучшает перевариваемость белков зерна и способствует синтезу других белков, с более высокой питательной цен-

ностью. В этой связи направленная индукция мутаций в генах, кодирующих синтез кафиринов, может способствовать получению новых линий сорго с улучшенной перевариваемостью белков зерна, которые, в отличие от линий, несущих генетическую конструкцию для РНК-сайленсинга, будут лишены трансгенов.

За последние годы опубликовано несколько работ, в которых сообщалось об успешном редактировании генов α -, β - и γ -кафиринов (Li A. et al., 2018; Massel et al., 2022, 2023; Elkonin et al., 2023; Li X. et al., 2024). В большинстве этих работ в качестве мишеней были использованы нуклеотидные последовательности, кодирующие сигнальные полипептиды, ответственные за депонирование α - и γ -кафиринов в белковых тельцах клеток эндосперма (Li A. et al., 2018; Elkonin et al., 2023; Li X. et al., 2024). Эти мутанты имели улучшенную перевариваемость белков зерна, в отличие от мутантов с мутациями в структуре гена β -кафирина (Massel et al., 2023).

Целью настоящего исследования было изучение потомства полученных нами ранее растений, несущих мутации в гене *k1C5*, отличающихся улучшенной перевариваемостью белков зерна в системе *in vitro*, а именно: анализ наследования высокой перевариваемости, проявления основных селекционно ценных признаков, а также выявление структуры нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α -кафирина.

Материалы и методы

Материал и условия выращивания. В работе исследовали потомство растений T_1 с высокой перевариваемостью белков эндосперма из потомства мутантов T_0 2C-2.1.1: № 11 (86.6 % перевариваемости), № 13 (86.7 %); T_0 2C-1.2.5a: № 11 (92.4 %), № 14 (77.3 %); T_0 2C-1.2.5b: № 14 (91.8 %). Эти мутанты были получены в экспериментах по геномному редактированию у зернового сорго сорта Аванс с использованием созданного нами ранее бинарного вектора p2C, содержащего ген эндонуклеазы *Cas9* и гидРНК, направленную на индукцию мутаций в нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α -кафирина (Elkonin et al., 2023). Отобранные растения T_1 с высокой перевариваемостью не содержали генетической конструкции CRISPR/Cas (Elkonin et al., 2023). Исследуемые потомства (поколения T_2 , T_3) выращивали на опытном участке Селекционного комплекса Федерального аграрного научного центра Юго-Востока (г. Саратов) в 4-метровых рядах с междурядьями 70 см, с густотой стояния 6 растений на 1 м. Метелки всех растений тщательно изолировали пергаментными изоляторами до начала цветения. Анализировали следующие признаки: высоту растения, длину цветоножки, массу 1000 зерен, урожай зерна с метелки, тип эндосперма, перевариваемость белков зерна в системе *in vitro*. В каждой семье определяли среднее значение признака для 10–20 растений.

Перевариваемость белков зерна в системе *in vitro*. Для изучения перевариваемости белков зерна использовали метод обработки пепсином цельнозерновой муки (Aboubacar et al., 2001; Wong J.H. et al., 2009). При этом 60 мг навеску муки инкубировали в 1 мл 0.15 % раствора пепсина (Sigma-Aldrich, P7000; 250 ед./мг) в 0.1 М

калий-фосфатном буфере (рН 2.0) при 37 °С на шейкере (70 об/мин).

Для количественной оценки перевариваемости применяли метод, основанный на сканировании электрофоретических спектров белков, полученных в SDS-PAGE (Aboubacar et al., 2001; Nunes et al., 2004; Wong J.H. et al., 2009; Elkonin et al., 2013). Для этой цели образцы муки после переваривания пепсином, а также контрольные образцы, инкубированные в калий-фосфатном буфере без добавления пепсина, центрифугировали при 13 000 об/мин. Осадок инкубировали в экстракционном буфере (0.0125M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, рН 10.0) в редуцирующих условиях (1 % SDS, 2 % 2-меркаптоэтанол) при комнатной температуре в течение 2 ч, после чего кипятили (100 °С) в течение 5 мин. Образцы центрифугировали при 13 000 об/мин и разделяли с помощью SDS-PAGE в 12.5 % (w/v) полиакриламидном геле в соответствии с модифицированным методом Лэммли (Laemmli, 1970). В каждую дорожку вносили по 15 мкл экстракта. Разделение контролировали с использованием маркеров молекулярной массы белка, 10–200 кДа (Servicebio, G2058, Ухань, Хубэй, Китай). Гели окрашивали кумасси R-250. После электрофореза гели сканировали с помощью системы ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США), а количество белка оценивали с помощью программного обеспечения Image Lab 6.1 (Bio-Rad). Показатели перевариваемости рассчитывали как процентное отношение объема белка в переваренном образце к объему белка в контрольном образце. В качестве стандарта высокой перевариваемости *in vitro* использовали ранее полученный мутант Аванс-1/18 с генетической конструкцией для РНК-сайленсинга гена *gKAF1* (Elkonin et al., 2021). Эксперименты были выполнены в двух повторениях.

Текстуру эндосперма определяли на поперечных сколах зрелых зерновок, которые делали с помощью острого скальпеля. Выделяли следующие типы эндосперма: обычный с толстым стекловидным слоем и модифицированный, к которому относили мучнистый, мучнистый с вкраплениями стекловидного эндосперма и мучнистый с тонким ободком стекловидного слоя. С каждого растения анализировали по 40 зерновок.

Секвенирование нуклеотидной последовательности гена *k1C5*. Для выявления мутаций ПЦР-ампликоны гена *k1C5* (праймеры F: 5'-TTGCCAGGGCTAGTTGACTG-3' и R: 5'-AGGCTTTGATCCACATGAGCA-3') клонировали в вектор pAL2-T («Евроген», Россия). Секвенирование по Сэнгеру было проведено ООО «Синтол» на генетическом анализаторе ABI 3130 (секвенирующий праймер: 5'-TTGCCAGGGCTAGTTGACTG-3'). Мутации в секвенированных ампликонах выявляли с помощью компьютерных программ Chromas (<https://www.techneleysium.com.au>) и SnapGene Viewer 5.2.4 (<https://www.snapgene.com>).

Методы биологической статистики. Для оценки различий исследуемых образцов по перевариваемости белков в системе *in vitro* проводили дисперсионный анализ с использованием пакета программ АГРОС, версия 2.09 (С.П. Мартынов, ИОГен РАН), и теста множественных сравнений Дункана. Различия по проявлению морфометрических признаков между семьями мутантов и исходным сортом оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

Секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α -кафирина

Секвенирование нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид 22 кДа α -кафирина одного из членов генного семейства *k1C* (*k1C5*), у двух растений из потомства мутанта T_0 2C-2.1.1, № 2 и 11

(поколение T_1), отличающихся улучшенной перевариваемостью белков эндосперма (86 и 87 % соответственно), показало, что они имеют одну и ту же мутацию: замену 23-го нуклеотида, считая от 5'-конца нуклеотидной последовательности сигнального полипептида (в F-цепи: T→C, в R-цепи: A→G) (рис. 1, б, в). Секвенирование аналогичной последовательности у исходного мутанта выявило наличие такой же мутации и у родительского растения T_0 (см. рис. 1, а). Согласно *in silico* анализу, эта мутация ведет

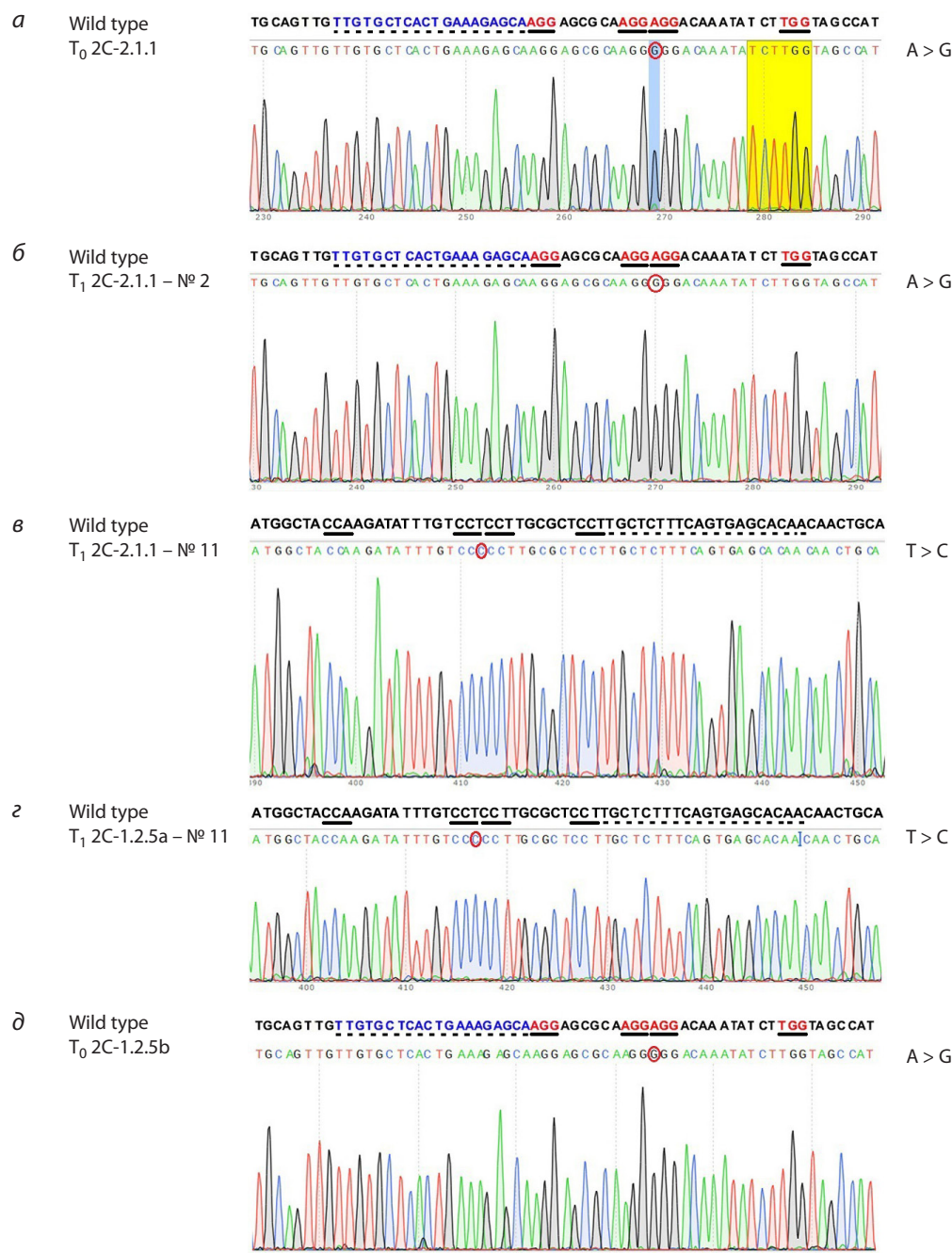


Рис. 1. Результаты секвенирования нуклеотидных последовательностей, кодирующих сигнальные полипептиды 22 кДа α -кафирина, у растений T_0 2C-2.1.1 (а) и его потомства T_1 2C-2.1.1 № 2 (б) и T_1 2C-2.1.1 № 11 (в), T_1 2C-1.2.5a № 11 (з), T_0 2C-1.2.5b (д).

а, б, д – R-цепь; в, з – F-цепь. Последовательности РАМ подчеркнуты сплошной линией; последовательность мишени – штриховой. Нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальный полипептид 22 кДа α -кафирина, взята с сайта <https://phytozome.jgi.doe.gov>: Sobic.005G193100, Chr05: 67654898–67655764.

к замене кодирующего триплета СТС→ССС, что должно привести к мутации восьмой аминокислоты сигнального полипептида α -кафирина, а именно замещению лейцина, алифатической неполярной гидрофобной аминокислоты, на пролин – гетероциклическую, менее гидрофобную аминокислоту, вызывающую изгиб α -спирали белка. Такая замена могла изменить структурные и функциональные свойства полипептида и, как следствие, характер депонирования α -кафирина в белковых тельцах и тем самым повлиять на их перевариваемость.

Секвенирование аналогичного ампликона у одного из растений T_1 из потомства другого мутанта T_0 2С-1.2.5а – № 11, отличающегося улучшенной перевариваемостью белков (92 %), также показало наличие мутации Т→С в том же сайте нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид (см. рис. 1, з). Эта же мутация была выявлена нами в результате секвенирования ДНК другого растения T_0 2С-1.2.5b (см. рис. 1, д), регенерированного из того же каллуса, что и 2С-1.2.5а. Ранее эта же мутация была обнаружена нами у растения T_0 2С-1.2.9, тогда как у двух других растений T_0 (1С-2.1.1 и 2С-1.2.4) мутация отсутствовала (Elkonin et al., 2023).

Таким образом, у четырех из шести изученных растений T_0 присутствует одна и та же мутация: замена Т→С в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, и эта мутация наследуется в поколении T_1 .

Проявление селекционно ценных признаков

Анализ проявления основных селекционно ценных признаков у потомства мутантов с улучшенной перевариваемостью белков эндосперма, полученных нами ранее (Elkonin et al., 2023), показал, что в поколении T_2 у двух из них, 2С-1.2.5а и 2С-1.2.5b (семьи 203/23 и 200/23), высота растения была значимо снижена по сравнению с исходным сортом Аванс – на 12.4–15.5 % соответственно (табл. 1). Сниженная высота растений у мутанта 2С-1.2.5а наследовалась и в поколении T_3 (на 5.5 %, семья 208/23). Длина цветоножки (выдвинутость подметельчатого междоузлия) не различалась у потомства мутантов и исходного сорта Аванс. Масса 1000 зерен и масса зерна с метелки у всех семей также не отличались от исходного сорта, за исключением потомства мутанта 2С-2.1.1 (семья T_2 195/23), выделявшегося более крупными и тяжелыми зерновками, и потомства мутанта 2С-1.2.5b (семья T_2 200/23), у которого была снижена масса зерна с метелки. У растений всех изученных семей большинство зерновок имели эндосперм обычного стекловидного типа, характерного для исходного сорта Аванс. Однако почти во всех семьях присутствовали растения, у которых наблюдались зерновки с мучнистым эндоспермом либо с размытым или тонким стекловидным слоем (рис. 2), т. е. с типами эндосперма, характерными для мутантов с нарушенным синтезом кафиринов (Elkonin et al., 2021). Доля таких зерновок у

Таблица 1. Проявление селекционно ценных признаков в потомстве мутантов сорго, полученных с помощью генетической конструкции CRISPR/Cas, направленной на индукцию мутаций в гене 22 кДа α -кафирина (*k1C5*)

Мутант T_0	Потомство					
	Поколение, семья	Высота, см	Длина цветоножки, см	Тип эндосперма ¹	M_{1000} , г	Масса зерна с метелки, г
Аванс	191/23	133.1 ± 2.0	13.2 ± 1.4	Стекловидный (100 %)	32.8 ± 1.4	32.6 ± 3.1
2С-2.1.1	T_2 : 195/23	132.7 ± 3.0	14.1 ± 1.2	Стекловидный; модифицированный (до 4 %)	37.4 ± 0.6*	31.3 ± 2.7
	T_3 : 197/23	126.5 ± 2.9	13.9 ± 1.0	Стекловидный; модифицированный (до 24–43 %)	34.6 ± 1.5	27.3 ± 3.2
2С-1.2.5а	T_2 : 203/23	116.6 ± 1.2**	15.4 ± 0.6	Стекловидный; модифицированный (до 6–10 %)	31.3 ± 1.3	27.0 ± 2.1
	T_3 : 208/23	125.8 ± 2.3*	14.3 ± 0.7	Стекловидный; модифицированный (до 19–71 %)	34.9 ± 1.7	27.7 ± 2.9
2С-1.2.5b	T_2 : 200/23	112.5 ± 4.6**	12.8 ± 1.0	Стекловидный; модифицированный (до 5–9 %)	30.9 ± 1.4	26.6 ± 1.3*

* ** Отличается от исходного сорта Аванс при $p < 0.05$ и $p < 0.01$ соответственно. ¹ Представлена доля зерновок со стекловидным или модифицированным типом эндосперма (мучнистым или с размытым или тонким стекловидным слоем) у разных растений из семьи.



Рис. 2. Поперечные срезы зерновок мутанта 2С-1.2.5а (растения из семьи 208/13):

а – обычный стекловидный эндосперм; б – мучнистый эндосперм; в – эндосперм с размытым стекловидным слоем. Шкала 1 мм.

некоторых растений из семей 197/23 (поколение T₃ мутанта 2C-2.1.1) и 208/23 (T₃ мутанта 2C-1.2.5a) достигала 35–40 % (см. табл. 1). Нередко такие зерновки имели меньший размер по сравнению с зерновками с обычным стекловидным эндоспермом.

Анализ перевариваемости белков зерна у потомства мутантов 2C-2.1.1 № 13 и 2C-1.2.5a № 14 (оба из T₁) показал, что повышенные значения этого признака, по сравнению с исходным сортом Аванс, проявлялись у растений из поколений T₂ и T₃ (рис. 3). Так, в потомстве мутанта 2C-2.1.1 № 13 (табл. 2, семьи T₂ 195/23 и T₃ 197/23), а также мутанта 2C-1.2.5a № 14 (семья T₃ 208/23) уро-

вень перевариваемости достигал 77–84 %, превышая показатель исходного сорта на 10–20 % (*p* < 0.05). При этом значимо более высокий уровень перевариваемости наблюдался у зерновок с обычным стекловидным типом эндосперма, характерным для исходного сорта. В то же время уровень перевариваемости белков из зерновок с мучнистым или размытым стекловидным эндоспермом был значительно выше, чем у зерновок с обычным стекловидным эндоспермом, достигая 84–93 % у отдельных растений T₃ и значительно превышая уровень перевариваемости исходного сорта (*p* < 0.05), у которого такие зерновки отсутствовали.

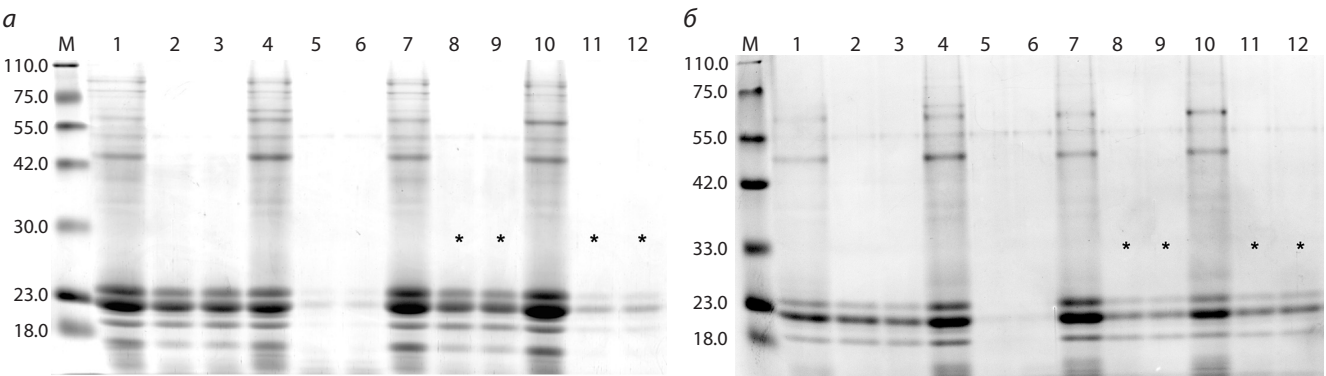


Рис. 3. Электрофоретические спектры белков муки из зерновок растений сорго из разных поколений мутанта 2C-2.1.1, полученного путем сайт-направленного мутагенеза гена *k1C5*.

a – растение № 197-9/23 из поколения T₃ (дорожки 7–12) (эксперимент 03.09-2, см. табл. S1 Приложения¹); *б* – растение № 195-3/23 из поколения T₂ (дорожки 7–12) (эксперимент 13.08-1, см. табл. S1). На обеих пластинах: 1–3 – исходный сорт Аванс; 4–6 – мутант с РНК-сайленсингом гена *gKAF1* (Elkonin et al., 2021) (стандарт высокого уровня перевариваемости белков *in vitro*); 7–9 – зерновки с обычным стекловидным эндоспермом; 10–12 – зерновки с мучнистым эндоспермом; 1, 4, 7, 10 – контрольные образцы (без обработки пепсином); 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12 – образцы после обработки пепсином (по две повторности для каждого образца); М – маркеры молекулярной массы (Servicebio, G2058). Спектры образцов, отличающиеся значимо более высокой перевариваемостью по сравнению с сортом Аванс (см. табл. 2, табл. S1), отмечены звездочками.

Таблица 2. Перевариваемость в системе *in vitro* белков муки из зерновок с различными типами эндосперма у некоторых растений из потомства мутантов сорго, полученных с помощью направленного мутагенеза гена *k1C5*

Мутант	Растение, поколение	Перевариваемость белков (%) у зерновок с разным типом эндосперма	
		Обычный стекловидный	Мучнистый или размытый стекловидный
Аванс		63.4 ± 2.3	–
2C-1.2.5a, T ₁ № 14, отбор в T ₂ растения, выросшего из зерновки с размытым стекловидным эндоспермом	208-2/23, T ₃	72.8*	79.5*
	208-11/23, T ₃	84.3*	84.1*
	208-6/23, T ₃	71.7 ns	84.8*
2C-1.2.5a, T ₁ № 11	203-4/23, T ₂	65.2 ns	–
2C-2.1.1, T ₁ № 13	195-3/23, T ₂	73.9*	76.1*
	195-4/23, T ₂	71.3*	79.7*
	195-8/23, T ₂	62.3 ns	73.9*
2C-2.1.1, T ₁ № 13, отбор в T ₂ растения, выросшего из зерновки с размытым стекловидным эндоспермом	197-9/23, T ₃	68.6*	92.9*
	197-6/23, T ₃	64.7 ns	81.0*
	197-11/23, T ₃	77.1*	78.3*

Примечание. * Отличается от исходного сорта Аванс при *p* < 0.05 в соответствии с F-критерием (см. табл. S1); ns – нет значимых отличий от сорта Аванс при анализе соответствующего SDS-PAGE.

¹ Табл. S1 Приложения см. по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx44.pdf>

Обсуждение

Технология CRISPR/Cas считается одним из наиболее эффективных инструментов для индукции мутаций в строго определенных локусах генома растений. Однако в некоторых случаях в точности редактирования нуклеотидных последовательностей генов при использовании системы CRISPR/Cas9 могут наблюдаться сбои (Sturme et al., 2022; Guo et al., 2023; Movahedi et al., 2023).

В наших экспериментах у четырех из шести изученных растений T_0 присутствует одна и та же мутация: замена $T \rightarrow C$ в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*. Мутация располагается за пределами выбранной мишени, в направлении 3' от последовательности PAM (protospacer-adjacent motif), и, соответственно, является нецелевой. Тщательный анализ нуклеотидной последовательности данной области гена *k1C5* показал наличие нескольких сайтов PAM, расположенных близко друг к другу: два 5'-AGG и один 5'-TGG (см. рис. 1). Не исключено, что из-за такой близости нуклеаза Cas9 могла допускать ошибки и вносить разрывы между двумя сайтами PAM: AGG ↓ AGG. Следовательно, одной из причин возникновения нецелевых мутаций, как показывают наши данные, может быть значительное число близко расположенных PAM-сайтов. Подобные примеры нецелевой активности Cas9, при которой мутация возникает в целевом гене, но вне выбранной мишени, были обнаружены ранее при редактировании гена *Phytoene desaturase (PDS)* у двух сортов маниока (*Manihot esculenta* Crantz) (Odipio et al., 2017). Примечательно, что в другой работе на сорго по редактированию нуклеотидной последовательности, кодирующей сигнальный полипептид гена γ -кафирина, с помощью генетической конструкции CRISPR/Cas9 мутации возникали не в каноническом сайте, между 3-м и 4-м нуклеотидами в направлении 5' от PAM, а после 15-го нуклеотида мишени и за ее пределами в направлении 5' от PAM-сайта, но внутри целевого гена (Li X. et al., 2024). Эти факты ставят вопрос о точности геномного редактирования при использовании нуклеазы Cas9 у сорго.

Другим важным моментом, заслуживающим обсуждения, является снижение уровня перевариваемости кафиринов у потомства полученных нами мутантов. Ранее мы обнаружили значительное повышение уровня перевариваемости белков зерна у ряда мутантов в поколении T_1 : до 80–87 % у мутанта 2C-2.1.1, до 86 и 92 % у мутантов 2C-1.2.5b и 2C-1.2.5a соответственно (Elkonin et al., 2023). В поколении T_3 уровень перевариваемости снизился до 68–74 % у мутанта 2C-2.1.1 и 72–84 % у мутанта 2C-1.2.5a, значимо превосходя, однако, аналогичный показатель у исходного сорта Аванс (см. табл. 2, табл. S1). У растений из потомства мутанта 2C-1.2.5b значимые отличия от сорта Аванс отсутствовали.

Возможной причиной такого снижения перевариваемости могут быть разные условия выращивания растений: поколение T_1 выращивали в климатической камере в условиях регулярного полива и повышенной влажности воздуха, тогда как растения T_3 – на делянке опытного поля. Известно, что в условиях стресса засухи перевариваемость белков зерна сорго значительно снижается (Imra et al., 2019). Кроме того, нельзя исключать возможное

компенсаторное повышение экспрессии других генов, контролирующих синтез кафиринов, которое приводило к восстановлению их содержания и снижению уровня перевариваемости белков зерна. Такое компенсаторное повышение содержания γ -кафирина было обнаружено ранее у мутантов сорго с нарушенным синтезом β -кафирина; оно восстанавливало общий баланс кафиринов в зерне и не приводило к улучшению показателя перевариваемости (Massel et al., 2023).

Особый интерес вызывает варьирование текстуры эндосперма у мутантов из разных поколений. У растений T_0 наблюдалось формирование зерновок с нарушенным развитием стекловидного эндосперма (Gerashchenkov et al., 2021). Такие зерновки характерны для мутантов сорго с частично подавленным синтезом кафиринов и высокой перевариваемостью белков (Duressa et al., 2018; Elkonin et al., 2021). В T_1 у растений формировались зерновки с нормально развитым стекловидным эндоспермом и высокой перевариваемостью белков, что представляло собой необычное явление, учитывая тесную корреляцию у сорго высокой перевариваемости и мучнистого эндосперма (Duressa et al., 2018). В поколениях T_2 и T_3 у растений из ряда семей вновь наблюдались зерновки с модифицированным типом эндосперма (мучнистым или с тонким стекловидным слоем по периферии зерновок), отличавшиеся значительно более высоким уровнем перевариваемости (см. табл. 2). В результате отбора таких зерновок нами были получены семьи T_3 208/23 и 197/23, растения которых содержали зерновки с нормальным стекловидным эндоспермом с более высокой, нежели у исходного сорта, уровнем перевариваемости белков. Такие вариации текстуры эндосперма, возможно, являются следствием влияния условий внешней среды на экспрессию индуцированной мутации, либо на модификацию типа эндосперма влияет другая мутация, которую мы пока не выявили. Более определенное заключение можно будет сделать в дальнейшем в результате дополнительных исследований.

Заключение

В результате исследования потомства мутантов сорго, полученных с использованием генетической конструкции CRISPR/Cas9, направленной на индукцию мутаций в гене *k1C5*, кодирующем синтез α -кафирина, нами выявлены две семьи T_3 – 208/23 и 197/23, растения которых содержали зерновки с нормальным стекловидным эндоспермом и с более высоким, нежели у исходного сорта, уровнем перевариваемости белков зерна (до 72–84 % в сравнении с 62–64 % у исходного сорта Аванс). Растения из этих семей не имеют значимых отличий по проявлению селекционно ценных признаков от исходного сорта, за исключением сниженной высоты (на 5–15 %), и не содержат генетической конструкции CRISPR/Cas. У четырех из шести изученных растений T_0 присутствует одна и та же мутация: замена $T \rightarrow C$ в 23-й позиции нуклеотидной последовательности гена *k1C5*, и эта мутация наследуется в поколении T_1 . Данная мутация располагается за пределами выбранной мишени, в направлении 3' от последовательности PAM, и может быть обусловлена неце-

левой активностью нуклеазы Cas9, при которой мутация возникает в целевом гене, но вне выбранной мишени вследствие наличия нескольких сайтов РАМ, расположенных близко друг к другу.

Список литературы / References

- Aboubacar A., Axtell J.D., Huang C.P., Hamaker B.R. A rapid protein digestibility assay for identifying highly digestible sorghum lines. *Cereal Chem.* 2001;78:160-165. doi 10.1094/CCHEM.2001.78.2.160
- Balakrishna D., Singode A., Narasimham D., Venkatesh Bhat B. Current status and future prospects of genetic transformation and gene editing in sorghum. In: Tonapi V.A., Talwar H.S., Are A.K. (Eds) *Sorghum in the 21st Century: Food – Fodder – Feed – Fuel for a Rapidly Changing World*. Singapore: Springer, 2020;511-535. doi 10.1007/978-981-15-8249-3_21
- Bean S.R., Ioerger B.P., Wilson J.D., Tilley M., Rhodes D., Herald T.J. Structure and chemistry of sorghum grain. In: Rooney W. (Ed.) *Achieving Sustainable Cultivation of Sorghum*. Vol. 2. 2018. doi 10.19103/as.2017.0015.21
- Belton P.S., Delgadillo I., Halford N.G., Shewry P.R. Kafir structure and functionality. *J Cereal Sci.* 2006;44:272-286. doi 10.1016/j.jcs.2006.05.004
- De Mesa-Stonestreet N.J., Alavi S., Bean S.R. Sorghum proteins: the concentration, isolation, modification, and food applications of kafirins. *J Food Sci.* 2010;75:90-104. doi 10.1111/j.1750-3841.2010.01623.x
- Duressa D., Weerasoriya D., Bean S.R., Tilley M., Tesso T. Genetic basis of protein digestibility in grain sorghum. *Crop Sci.* 2018;58(6): 2183-2199. doi 10.2135/cropsci2018.01.0038
- Elkonin L.A., Italianskaya J.V., Fadeeva I.Yu., Bychkova V.V., Kozhemyakin V.V. In vitro protein digestibility in grain sorghum: effect of genotype and interaction with starch digestibility. *Euphytica.* 2013; 193:327-337. doi 10.1007/s10681-013-0920-4
- Elkonin L.A., Panin V.M., Kenzhegulov O.A., Sarsenova S.Kh. RNAi-mutants of *Sorghum bicolor* (L.) Moench with improved digestibility of seed storage proteins. In: Jimenez-Lopez J.C. (Ed.) *Grain and Seed Proteins Functionality*. London: Intech Open Ltd, 2021. doi 10.5772/intechopen.96204
- Elkonin L.A., Gerashchenkov G.A., Borisenko N.V., Sarsenova S.Kh., Panin V.M. Development of sorghum mutants with improved *in vitro* protein digestibility by CRISPR/Cas9 editing of kafirin genes. *The Crop J.* 2023;11:1411-1418. doi 10.1016/j.cj.2023.02.005
- Ezeogu L.I., Duodu K.G., Taylor J.R.N. Effects of endosperm texture and cooking conditions on the *in vitro* starch digestibility of sorghum and maize flours. *J Cereal Sci.* 2005;42:33-44. doi 10.1016/j.jcs.2005.02.002
- Gao C. Genome engineering for crop improvement and future agriculture. *Cell.* 2021;184:1621-1635. doi 10.1016/j.cell.2021.01.005
- Gerashchenkov G.A., Elkonin L.A., Gerashchenkov K.G., Rozhnova N.A., Hiekel S., Kumblehn J., Chemeris A.V. Binary vector construction for site-directed mutagenesis of kafirin genes in sorghum. *Amer J Plant Sci.* 2021;12:1276-1287. doi 10.4236/ajps.2021.128089
- Guo C., Ma X., Gao F., Guo Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2023;11:1143157. doi 10.3389/fbioe.2023.1143157
- Impa S.M., Perumal R., Bean S.R., Sunoj V.S.J., Jagadish S.V.K. Water deficit and heat stress induced alterations in grain physico-chemical characteristics and micronutrient composition in field grown grain sorghum. *J Cereal Sci.* 2019;86:124-131. doi 10.1016/j.jcs.2019.01.013
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680-685.
- Li A., Jia S., Yobi A., Ge Z., Sato S., Zhang C., Angelovici R., Clemente T.E., Holding D.R. Editing of an alpha-kafirin gene family increases digestibility and protein quality in sorghum. *Plant Physiol.* 2018;177:1425-1438. doi 10.1104/pp.18.00200
- Li X., Liu W., Wang G., Sai-Ming Sun S., Yuan L., Wang J. Improving digestibility of sorghum proteins by CRISPR/Cas9-based genome editing. *Food Energy Secur.* 2024;13:e506. doi 10.1002/fes3.506
- Massel K., Lam Y., Hintzsche J., Lester N., Botella J.R., Godwin I.D. Endogenous U6 promoters improve CRISPR/Cas9 editing efficiencies in *Sorghum bicolor* and show potential for applications in other cereals. *Plant Cell Rep.* 2022;41:489-492. doi 10.1007/s00299-021-02816-z
- Massel K., Hintzsche J., Restall J. CRISPR-knockout of β -kafirin in sorghum does not recapitulate the grain quality of natural mutants. *Planta.* 2023;257:8. doi 10.1007/s00425-022-04038-3
- Movahedi A., Aghaei-Dargiri S., Li H., Zhuge Q., Sun W. CRISPR variants for gene editing in plants: biosafety risks and future directions. *Int J Mol Sci.* 2023;24:16241. doi 10.3390/ijms242216241
- Nunes A., Correia I., Barros A., Delgadillo I. Sequential *in vitro* pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *J Agric Food Chem.* 2004;52:2052-2058. doi 10.1021/jf0348830
- Odipto J., Alicai T., Ingelbrecht I., Nusinow D.A., Bart R., Taylor N.J. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing of *Phytoene desaturase* in Cassava. *Front Plant Sci.* 2017;8:1780. doi 10.3389/fpls.2017.01780
- Parikh A., Brant E.J., Baloglu M.C. CRISPR/Cas-mediated genome editing in sorghum – recent progress, challenges and prospects. *In Vitro Cell Dev Biol – Plant.* 2021;57:720-730. doi 10.1007/s11627-021-10215-y
- Saini H., Thakur R., Gill R., Tyagi K., Goswami M. CRISPR/Cas9-gene editing approaches in plant breeding. *GM Crops & Food.* 2023;14: 1-17. doi 10.1080/21645698.2023.2256930
- Sturme M.H.J., van der Berg J.P., Bouwman L.M.S., De Schrijver A., de Maagd R.A., Kleter G.A., Battaglia-de Wilde E. Occurrence and nature of off-target modifications by CRISPR-Cas genome editing in plants. *ACS Agric Sci Technol.* 2022;2:192-201. doi 10.1021/acscagritech.1c00270
- Wong A.C.S., Lam Y., Hintzsche J., Restall J., Godwin I.D. Genome editing towards sorghum improvement. In: Zhao K., Mishra R., Joshi R.K. (Eds) *Genome Editing Technologies for Crop Improvement*. Singapore: Springer Nature, 2022;295-321. doi 10.1007/978-981-19-0600-8_14
- Wong J.H., Lau T., Cai N., Singh J., Pedersen J.F., Vensel W.H., Hurkman W.J., Wilson J.D., Lemaux P.G., Buchanan B.B. Digestibility of protein and starch from sorghum (*Sorghum bicolor*) is linked to biochemical and structural features of grain endosperm. *J Cereal Sci.* 2009;49:73-82. doi 10.1016/j.jcs.2008.07.013
- Wong J.H., Marx D.B., Jeff D., Wilson J.D., Buchanan B.B., Lemaux P.G., Pedersen J.F. Principal component analysis and biochemical characterization of protein and starch reveal primary targets for improving sorghum grain. *Plant Science.* 2010;179:598-611. doi 10.1016/j.plantsci.2010.08.020
- Zhang G., Hamaker B.R. Low α -amylase starch digestibility of cooked sorghum flours and the effect of protein. *Cereal Chem.* 1998;75: 710-713. doi 10.1094/CCHEM.1998.75.5.710
- Zhu H., Li C., Gao C. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21:661-677. doi 10.1038/s41580-020-00288-9

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.12.2024. После доработки 15.07.2025. Принята к публикации 28.07.2025.