Федеральная научно - техническая программа развития генетических технологий на 2019 - 2027 годы

Исследования, проводимые ИОГен РАН в рамках реализации Федерального проекта "Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов поприоритетным исследовательским направлениям" национального проекта "Наука и университеты"

по Соглашениям с Министерством образования и науки РФ

Исследовательская программа:

Исследование потенциала геномного редактирования в контексте современных методов селекции растений, основанных на достижениях функциональной геномики и машинного обучения.

Соглашение № 075-15-2021-1064 от «28» сентября 2021 г. (2021-2023)

[(Сведения о ходе выполнения проекта)](http://www.eimb.ru/ru1/institute/plans/14-607-21-0014_1-5.htm)

**Первый этап**

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении гранта в форме субсидии от «28» сентября 2021 г. № 075-15-2021-1064 с Минобрнауки России в рамках федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019 – 2027 годы в рамках федерального проекта «Развитие масштабных научных и научно-технологических проектов по приоритетным исследовательским направлениям» национального проекта «Наука и университеты» выполнялись следующие работы:

1. Создано ЦКП «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений»

На базе ИОГен РАН создан ЦКП «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений», осуществляющий исследования и оказывающий услуги в области редактирования геномов основных сельскохозяйственных объектов. В ходе выполнения работ были получены заданные результаты и разработаны следующие документы:

* Приказ о создании ЦКП «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений» от 01 октября № 93.
* Приложение 1 к Приказу от 01.10.2021 №93 Структура ЦКП «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений»
* Приложение 2 к Приказу от 01.10.2021 №93 Положение о ЦКП «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений»
* Приложение 3 к Приказу от 01.10.2021 №93 Программа развития ЦКП «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений»
* Приказ от 27.10.2021 № 111 об организации деятельности и вводе в эксплуатацию Центра коллективного пользования научным оборудованием ИОГен РАН «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений»
* Акт ввода ЦКП «Центр редактирования генома сельскохозяйственных растений» в эксплуатацию б/н от 27.10.2021 г.

На сайте ЦКП https://ckp-rf.ru/ckp/3078805/) приведены сведения о созданном ЦКП

1. Разработан гибридный метод реконструкции сплайсформ по данным секвенирования 2 и 3 поколений

Выполнены работы по разработке гибридного метода реконструкции сплайсформ по данным секвенирования 2 и 3 поколений. Предложен алгоритм реконструкции изоформ. Показано, что метод основан на использовании достоверных сайтов сплайсинга, полученных при помощи коротких точных чтений 2 поколения секвенирования, которые объединяются в изоформы при помощи длинных последовательностей полученный с использованием неточных чтений платформы Oxford Nanopore, которые представляют полноразмерные последовательности кДНК.

В ходе выполнения работ разработан документ «Описание гибридного метода реконструкции сплайс-форм по данным секвенирования 2 и 3 поколений, включающего схему алгоритма по ЕСПД».

1. Сформирована выборка растений для выбора гена, специфически активного в женской зародышевой линии, регуляторный элемент которого может быть универсально используем для конструкций для редактирования у разных видов растений: позднецветущие растения и растения закрытого грунта.

В ходе выполнения работы проведен сбор образцов в фиксаторы, необходимые для дальнейшего анализа транскриптомов вегетативных (лист) и репродуктивных (пыльник, семяпочка) органов различных видов, а также установления эмбриологическими методами стадий развития репродуктивных органов, использованных для анализа транскриптома. Собранный материал поздноцветущих видов и растений закрытого грунта охватывает представителей всех выделенных на основании молекулярно-филогенетических данных крупных групп покрытосеменных (базальная града покрытосеменных, магнолииды, базальная града высших двудольных, суперрозиды, суперастериды, однодольные). Охвачен также один из видов голосеменных растений, привлечение, которого необходимо в качестве внешней группы. Показано, что выполненные с акцентом на позднецветущие растения и растения закрытого грунта работы позволили провести формирование выборки растений, необходимой для выбора гена, специфически активного в женской зародышевой линии, регуляторный элемент которого может быть универсально используем для конструкций для редактирования у разных видов растений. На примере 15 образцов проведено выделение РНК и оценка качества выделенных образцов РНК методом капиллярного электрофореза. Анализ качества образцов показал их пригодность для проведения обратной транскрипции по протоколу, включающему poly-A селекцию.

Разработан документ «Описание собранного материала».

1. Выполнен выбор мишеней и создание генетических конструкций для редактирования генома сельскохозяйственных растений

На основании полученных данных сформирован список генов-мишеней сельскохозяйственных растений и выбраны плазмидные векторы для их редактирования. В частности выполнен выбор мишеней и создание генетических конструкций для редактирования генома сельскохозяйственных растений и поиск потенциальных мишеней для генетического редактирования сахарной свеклы с использованием данных генотипирования. Были идентифицированы фрагменты кодирующих последовательностей генов FAD2 гороха, ALS гороха, сои и нута, NAC1 и EDR1 мягкой пшеницы. С помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования были выявлены все полиморфизмы этих генов в изученных регионах. В результате анализа последовательностей удалось идентифицировать консервативные участки в первых экзонах, для которых были синтезированы направляющие РНК, по две на каждый ген. Были созданы генетические конструкции для редактирования, кодирующие последовательности подобранных направляющих РНК. Использование полученных конструкций позволит на следующих этапах работы позволит создать растения с редактированным геномом по всем аллелям выбранных генов.

1. Выполнен анализ пластидного генома у сортов и сортообразцов гречихи различного времени селекции

В ходе выполнения работы для 41-го образца гречихи различного времени селекции, получены последовательности пластидных геномов, проведен анализ взаимосвязей между сортами. Показано, что большинство наблюдаемых различий не коррелирует с временем селекции. Различающиеся позиции локализуются в некодирующих участках генома либо являются синонимичными. Единственная несинонимичная замена не ассоциирована с различиями в эффективности фотосинтеза, так как свойственна лишь небольшому количеству образцов разного времени селекции.

Разработан документ «Последовательности пластомов, список SNP».

1. Сформирована представительная выборка сортов/линий льна и проведена разработка подходов для получения большого выхода длинных прочтений на платформе Oxford Nanopore Technologies для создания пангенома льна.

В ходе работы на основе анализа данных литературы и оценки генетической близости сортов/линий льна с использованием данных секвенирования геномов сформирована выборка сортов/линий льна, охватывающая генетическое разнообразие этой культуры, для последующего пангеномного анализа. Разработан протокол секвенирования генома льна на платформе третьего поколения, позволяющий получать большой выход длинных прочтений, что необходимо для высококачественных сборок геномов и создания пангенома льна.

1. Проведена оценка уровней метилирования цитозинов в геноме льна

Получены данные секвенирования генома льна на платформе Oxford Nanopore Technologies и выполнена оценка уровней метилирования цитозинов, что важно для установления роли этой эпигенетической модификации ДНК в регуляции экспрессии генов и более эффективного проведения редактирования генома этой культуры.

В ходе работ по созданию выборки сортов/линий льна для пангеномного анализа, разработан протокол секвенирования генома льна, выполнено секвенирование генома льна на платформе ONT и получены данные об уровнях метилирования цитозинов.

1. поиск потенциальных мишеней для генетического редактирования сахарной свеклы с использованием данных генотипирования;

Выбраны потенциальные гены-мишени BvMLO1 и BvMLO15, BvOST2, BvSRFP1, BvDIS1 для редактирования генома сахарной свеклы С помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования были выявлен полиморфизм этих генов в изученных регионах. В результате анализа последовательностей удалось идентифицировать консервативные участки в первых экзонах, для которых были синтезированы направляющие РНК, по две на каждый ген. Были созданы генетические конструкции для редактирования, кодирующие последовательности подобранных направляющих РНК. Использование полученных конструкций позволит на следующих этапах работы позволит создать растения с редактированным геномом.

.

1. Разработаны подходы для автоматического фенотипирования растений сахарной свёклы по фотографиям

В результате проведенных исследований разработаны алгоритмические и программные решения для автоматического фенотипирования. Разработан алгоритм для автоматического фенотипирования семян сахарной свёклы по фотографиям, получены первые тестовые исследования по определению выполненных и невыполненных семян. В ходе выполнения работ разработан документ «Описание метода автоматического фенотипирования растений сахарной свеклы по фотографиям, включающее схему алгоритма по ЕСПД».

1. Разработана концепции учебного курса по культурным растениям, сочетающего современные данные по сравнительной и эволюционной морфологии, биогеографии, биологии развития, генетике и селекции важнейших культурных растений

Данный учебный курс включает информацию по широкому кругу вопросов, связанных с культурными растениями и разрабатываемых в рамках фундаментальных и прикладных направлений современной науки о растениях. Курс сочетает современные данные по сравнительной и эволюционной морфологии, биогеографии, биологии развития, генетике и селекции важнейших культурных растений.

В курсе сделан акцент на современные данные о разнообразии и эволюции этой группы растений, что позволяет поместить важнейшие группы культурных растений в эволюционный контекст и лучше понять их морфологические и биологические особенности, имевшие ключевое значение в ходе доместикации и селекции.

Курс рассчитан на слушателей, прошедших базовый курс ботаники в ВУЗе. В течение 2022 и 2023 годов предполагается ежегодное обучение до 30 слушателей по данной программе.

1. Разработана концепция учебного курса по обработке данных высокопроизводительного анализа генома при использовании в генетических технологиях

Курс включает в себя информацию по широкому кругу вопросов, связных с использованием методов высокопроизводительного анализа генома при использовании в генетических технологиях. Курс направлен на подготовку и переподготовку специалистов в области генетических технологий. Позволяет получить современные теоретические знания по современным методам обработки данных высокопроизводительного секвенирования, а также базовые практические навыки обработки данных. Учебный курс сочетает в себе как подготовку по теоретическим основам методов, так и практические занятия по обработке данных.

1. Разработана концепция учебного курса по высокопроизводительному анализу генома при использовании в генетических технологиях.

Учебный курс в основном сфокусирован на методах NGS. Обучающиеся получат теоретические знания о физико-химических основах этих методах, их возможностях и областях применения, а также практический опыт подготовки образцов ДНК и РНК для секвенирования на платформах 2 и 3 поколения и обработки полученных данных.

Учебный курс включает информацию по принципам и областям применения методов высокопроизводительного анализа генома, сопутствующим экспериментальным протоколам и протоколам контроля качества и обработки полученных данных для решения широкого круга задач генетики и биомедицины. Курс рассчитан на лиц, прошедших базовый курс молекулярной биологии и математических методов в биологии в ВУЗе.