

Экспрессия химерного комплекса генов регуляторов роста пшеницы *GRF4-GIF1* значительно повышает эффективность трансформации и редактирования генов у культивируемых сортов ячменя

Е.М. Тимонова^{1,2*}, А.А. Киселева¹, А.А. Бережная¹, М.А. Нестеров¹, А.М. Короткова¹, А.В. Кочетов¹, Е.А. Салина^{1,2}

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Курчатовский геномный центр ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

* egorova@bionet.nsc.ru

Цель: На сегодняшний день опубликовано более 120 работ, описывающих редактирование генов ячменя с помощью технологии CRISPR/Cas9. Однако, несмотря на значительные успехи, модификация коммерческих сортов затруднена, поскольку такие признаки как способность к трансформации и регенерации в культуре *in vitro* является генотип-специфичными. Таким образом, сохраняется потребность в разработке быстрого, надежного и независимого от генотипа протокола для трансформации и регенерации ячменя, для непосредственного улучшения коммерческих сортов. В настоящее время доказано, что экспрессия некоторых генов, участвующих в регуляции дифференцировки и развитии клеток растения может значительно повышать частоту регенерации трансформированных клеток. Так, сверх экспрессия химерной конструкции генов морфогенетических регуляторов пшеницы *GRF4-GIF1* значительно повышала частоту регенерации фертильных трансгенных растений твердой пшеницы, тритикале, риса, овса, цитруса, земляники и других видов растений. Целью данной работы было оценить пригодность химерной конструкции генов *GRF4-GIF1* пшеницы для эффективной трансформации, регенерации и геномного редактирования немодельных сортов ячменя.

Материалы и методы: Для отработки протокола на хозяйственно ценных сортах ячменя Алей, Целинный 5, Г-23035 нами был выбран селекционно-значимый ген ячменя *Nud*, который контролирует признак голозерность/ пленчатость зерна, и для которого уже ранее было выполнено редактирование у модельного сорта Golden Promise. Однако редактирование гена *Nud* у немодельных сортов с использованием метода агротрансформации осуществить не удалось. Трансформация эксплантов была проведена методом биобаллистики золотыми частицами согласно методике Светашова и соавторов (2016) с изменениями. Для трансформации использовали бинарный ДНК вектор JD633 (Addgene Plasmid #160393), в который были клонированы последовательности нРНК *Nud45* или *Nud50*. Данный вектор несет в себе ген *Cas9*, селективный ген устойчивости к гиромоцину *Hip* и химеру генов *GRF4-GIF1*. В качестве контрольного был выбран вектор L2_41780, не несущий гены морфогенетические регуляторы. Все этапы культивирования *in vitro*, отбора и регенерации растений выполнялись, как описано ранее Marthe с соавторами (2015), с некоторыми изменениями.

Результаты: В данном исследовании, используя усовершенствованные протоколы биобаллистической трансформации, было проведено генетическое редактирование последовательности гена *Nud* у трех сортов отечественной селекции Алей, Целинный 5 и Г-23035 и с использованием двух векторов JD633 и L2_41780 получены две популяции из 27 и 52 растений T0 соответственно. В результате было обнаружено, что что стабильные трансформанты получены только в опыте с вектором JD633, содержащим морфогенетические регуляторы *GRF4-GIF1*. Так частота регенерации трансформированных растений в среднем составила 3,8% от числа всех культивируемых эксплантов (14 растений из 27 содержали вставку вектора). При этом в случае с вектором L2_41780 частота регенерации трансформированных растений составила 0% (0 растений из 52 содержали вставку вектора). По результатам секвенирования, среди 27 растений, полученных с использованием вектора JD633, выявлены шесть растений T0 ячменя сорта Алей, пять растений сорта Целинный 5 и четыре растения сорта Г-23035, имеющих различные моно- и биаллельные мутации в гене *Nud*.

Выводы: Таким образом нами проведена работа по оптимизации протокола генетической трансформации с целью редактирования генов возделываемых сортов ячменя, на основе системы CRISPR/Cas9. Выяснена сравнительная эффективность использования двух плазмидных векторов для геномного редактирования ячменя немодельных сортов. Показано, что присутствие генов морфогенетических регуляторов *GRF4-GIF1* оказало значительное положительное влияние на эффективность трансформации и редактирования. Разработанный протокол может быть использован для трансформации и редактирования других коммерческих сортов ячменя.

Финансирование: Работа выполняется в рамках реализации программы создания и развития центра геномных исследований мирового уровня «Курчатовский геномный центр», соглашение № 075-15-2025-516 от 30.05.2025.

Благодарности: Авторы благодарны Центру коллективного пользования клеточных технологий и геномного редактирования растений ИЦиГ СО РАН за предоставленное для выполнения работы оборудование.