

Изучение функций гена *MtWOX2* у *Medicago truncatula*

А.М. Артемюк*, В.Е. Творогова, Е.Ю. Красноперова, Л.А. Лутова
Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
* nastyart2004@gmail.com

Цель: WOX (WUSCHEL-related homeobox) – семейство гомеодомен-содержащих транскрипционных факторов растений, регулирующих пролиферацию и дифференцировку клеток в различных тканях. Ген *WOX2 Arabidopsis thaliana*, экспрессируясь в яйцеклетке, а также в апикальном домене зародыша, регулирует деление клеток в ходе эмбриогенеза. *Medicago truncatula* (люцерна усечённая) – растение семейства бобовые, модельный объект для изучения соматического эмбриогенеза. Настоящая работа посвящена изучению функций ортолога *WOX2* у люцерны – гена *MtWOX2*. Основной задачей работы на настоящее время является получение линии с потерей функции этого гена с помощью систем редактирования генома.

Материалы и методы: Для получения растений *M. truncatula* с потерей функции гена *MtWOX2* использовали агробактериальную трансформацию листовых эксплантов линии люцерны R108 конструкцией для нокаута гена *MtWOX2* на основе вектора pHSE401. Для создания линии использовали полученные семена растений-регенерантов поколения T0. Растения последующих поколений генотипировали на присутствие аллелей *MtWOX2* с мутацией. Часть растений, содержащих мутантную аллель, затем высаживались в почву для получения семян.

Для создания конструкции для индуцируемого вырезания трансгенной последовательности с использованием Cre/LoxP системы использовалась система многоуровневого клонирования MoClo технологии Golden Gate. Анализ на наличие мутантных аллелей проводили с использованием секвенирования фрагмента гена *MtWOX2* по Сэнгеру и веб-инструмента ICE CRISPR Analysis Tool (Synthego).

Результаты: Среди растений поколения T0 были идентифицированы носители мутантных аллелей *MtWOX2*. От некоторых из них были получены и генотипированы потомки. В результате удалось получить две линии, несущие в гетерозиготном состоянии различные аллели *MtWOX2* с мутацией, приводящей к его нокауту.

Для проверки возможности комплементации потери функции *MtWOX2* и индуцируемого «выключения» работы этого гена мы планируем использовать Cre/LoxP систему и создаем кассету, фланкированную сайтами LoxP, которая будет содержать ген *MtWOX2* под собственным промотором, а также ген рекомбиназы Cre под контролем промотора, индуцируемого при повышенной температуре.

Выводы: Получены две линии люцерны, несущие мутации в гене *MtWOX2* в гетерозиготном состоянии. Для дальнейшего исследования функций *MtWOX2* разрабатывается система комплементации и индуцируемого выключения этого гена.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ № 25-26-00218 «Адаптация регуляторов развития растений для биотехнологии с помощью методов геномного редактирования».