Список використаних джерел:

1. Sakhno, L. O. Plant biomass increase: recent advances in genetic engineering. *Biopolymers and Cell*, 2013, vol. 29, no. 6, pp. 443–453. doi: 10.7124/bc.000838

2. Sakhno, L. O., Lystvan, K. V., Кuchuк, M. V. Antioxidant activity of leaf of biotechnological rape (*Brassica napus* L.), resistant to herbicides based on glyphosate and glufosinate, *Visnyk Kharkivskoho natsionalnoho ahrarnoho universytetu, Seriia : Biolohiia*. 2015, Vol. 3. No 36. Pp. 62–70.

3. Sakhno, L.O., Komarnitsskii, I.K., Kuchuk, M. V. Inheritance of glyphosate and glufosinate resistance in T_1-T_2 generations of biotechnological canola (*Brassica napus* L.) plants, *Visnyk Ukrainskoho tovarystva henetykiv i selektsioneriv*. 2015. Vol. 13. No. 1. Pp. 3–10.

4. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.* Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory.

Кирієнко А.В.
аспірантка;

Симоненко Ю.В.
кандидат біологічних наук,
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії
Національної академії наук України

Парій М.Ф.
кандидат біологічних наук,
ТОВ «Всеукраїнський науковий інститут селекції»

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ГЕТЕРОЛОГІЧНИХ ГЕНІВ *BAR* ТА *CAS9* В ТРАНСГЕННИХ РОСЛИНАХ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ТА СПЕЛЬТИ

Генетичне редагування генів рослин підходом CRISPR-Cas9 дає можливість одержати біотехнологічні рослини із покращеними господарсько-цінними ознаками. Зокрема, для злакових роду *Triticum* ssp. важливу роль відіграє висота рослин та стійкість до гербіцидів імідазолінового ряду.

Гени *rht* визначають ступінь прояву ознаки висоти рослин, тому їх редагування дає можливість отримати лінії, що будуть гетерогенними за цією ознакою. В свою чергу мутації в гені ацетогідроксилсинтази *ahas* (*als*) надають рослинам стійкості до гербіцидів класу імідазолінонів. Варто зауважити, що ацетогідроксилсинтаза – ключовий фермент біосинтезу амінокислот з розгалуженими боковими ланцюгами, а саме – ізолейцину, валіну та лейцину.

Для дослідження використовували три генотипи озимої амфідиплоїдної спельти (*T. spelta* L.) сортів «Європа», «Альберта», «Зоря України», а також один зразок озимої амфідиплоїдної пшениці м'якої «Бунчук» (*T. aestivum* L.).

Генетичну трансформацію проводили як в умовах *in vitro* (поєднання підходів вакуумної інфільтрації та інокуляції із агробактеріями), так і *in planta* (в умовах закритого ґрунту), з використанням агробактерій *Agrobacterium tumefaciens* Conn. штаму EHA105. В роботі використовували два генетичних вектори, які націлені на редагування геному: один – для редагування генів *rht,* а інший – для *ahas.* Кожен вектор містив у собі ген ендонуклеази *cas9* та селективний ген *bar*, що надає стійкості до фосфінотрицину, а також короткі послідовності guide-РНК (20 та 17 нуклеотидів, відповідно), комплементарно націлені на гени інтересу (*rht* та *ahas*).

В результаті проведених досліджень після генетичної трансформації *in vitro* нами було отримано 23 рослини-трансформанти спельти сорту «Європа» (за ознакою редагування – карликовість), 11 рослин спельти «Європа» (за ознакою редагування – стійкість до імідазолінонів), а також після трансформації *in planta* – одну рослину-трансформант спельти «Зоря України» (за ознакою редагування – карликовість).

Із 23 рослин спельти «Європа» (ознака – карликовість) на селективному середовищі із 5 мг/л фосфінотрицину відібрали 9; з 11 рослин спельти «Європа» (ознака – стійкість до імідазолінонів) відібрали 5; а також одну рослину-трансформант спельти «Зоря України» (з ознакою – карликовість, *in planta*).

Із рослин-трансформантів виділяли геномну ДНК методом ЦТАБ [1] та проводили ПЛР аналіз із праймерами до генів *cas9* та *bar*.

Розділення в 1% агарозному гелі показало факт наявності ампліконів, що відповідають очікуваній довжинні генів *cas9* та *bar* – 4135 по та 411 по, відповідно.

Для того, аби підтвердити не лише інтеграцію цільових генів в рослинний геном, а й їх експресію, було проведено зворотну ПЛР. Для цього виділяли загальну РНК (набір для виділення та очищення рослинної РНК «GeneJet Plant RNA Purification Kit», «Thermo Scientific»,США) та проводили реакцію зворотньої транскрипції (ЗТ-ПЛР) (набір «RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» («Thermo Scientific», США). В результаті аналізу було показано, що 9 трансформантів спельти «Європа» (ознака – карликовість), 5 трансформантів спельти «Європа» (ознака – стійкість до імідазолінонів), та один трансформант спельти «Зоря України» мають експресію генів *cas9* та *bar*. Так, на електрофореграмах можна побачити, що ці гени представлені у вигляді широких якскравих ампліконів очікуваної довжини 4135 по (рис. 1–3) та 411 по (рис. 4–6), відповідно.

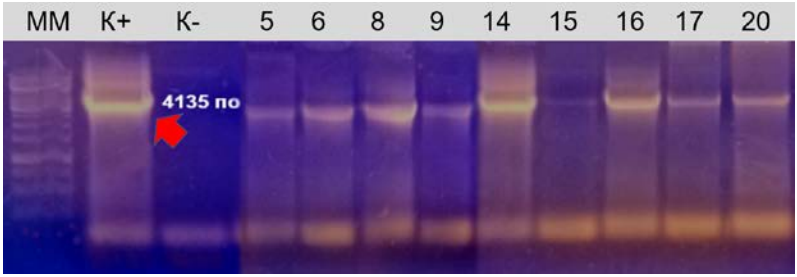

Рис. 1. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації із праймерами до гену cas9 після ЗТ-ПЛР для рослин-трансформантів спельти «Європа» (ознака – карликовість): 5, 6, 8, 9, 14, 15, 16, 17 та 20 – зразки рослин-регенерантів (~ 85 діб з моменту генетичної трансформації); К+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК; К – негативний контроль, стерильна вода (H_2O); ММ – молекулярний маркер довжини (1Kb «Thermo Scientific»)

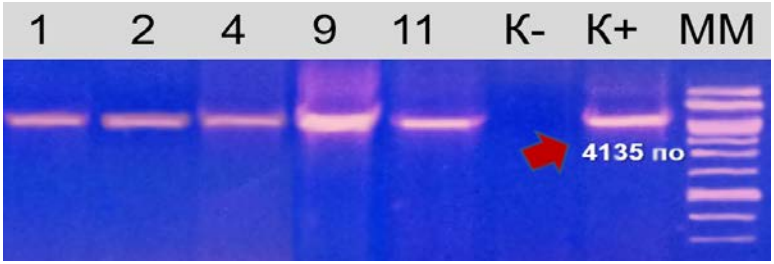

Рис. 2. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації із праймерами до гену *cas9* після ЗТ-ПЛР для рослин-трансформантів спельти «Європа» (ознака – стійкість імідазолінонів): 1, 2, 4, 9 та 11 – зразки рослин-регенерантів (~ 85 діб з моменту генетичної трансформації); К+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК; К – негативний контроль, стерильна вода (H_2O); ММ – молекулярний маркер довжини (1Kb, «Thermo Scientific»)

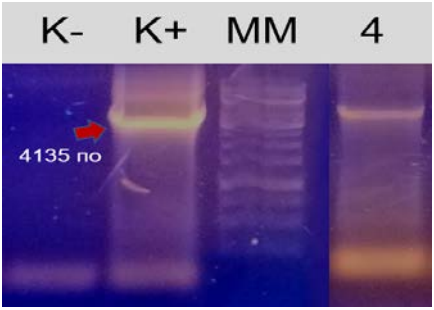

Рис. 3. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації сумарної рослинної ДНК для трансформанту спельти «Зоря України» (ознака – карликовість, *in planta*) із праймерами до *cas9*, після ЗТ-ПЛР: 4 – трансформант «Зоря України» (45 доба після проростання), К+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК, К- – негативний контроль, вода (H_2O), ММ – молекулярний маркер довжини (1Kb, «Thermo Scientific»)

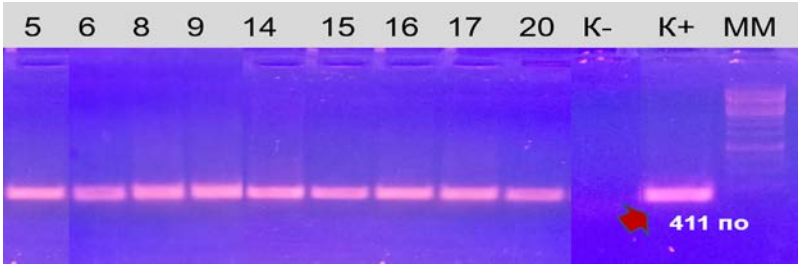

Рис. 4. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації із праймерами до гену *bar* після ЗТ-ПЛР для рослин-трансформантів спельти «Європа» (ознака – карликовість): 5, 6, 8, 9, 14, 15, 16, 17 та 20 – зразки рослин-регенерантів (~ 85 діб з моменту генетичної трансформації); К+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК; К – негативний контроль, стерильна вода (H_2O); ММ – молекулярний маркер довжини (1Kb, «Thermo Scientific»)

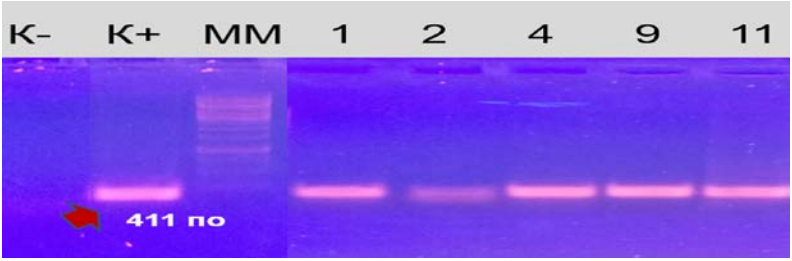

Рис. 5. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації із праймерами до гену *bar* після ЗТ-ПЛР для рослин-трансформантів спельти «Європа» (ознака – стійкість до імідазолінонів): 1, 2, 4, 9 та 11 – зразки рослин-регенерантів (~ 85 діб з моменту генетичної трансформації); К+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК; К – негативний контроль, стерильна вода (H_2O); ММ – молекулярний маркер довжини (1Kb, «Thermo Scientific»)

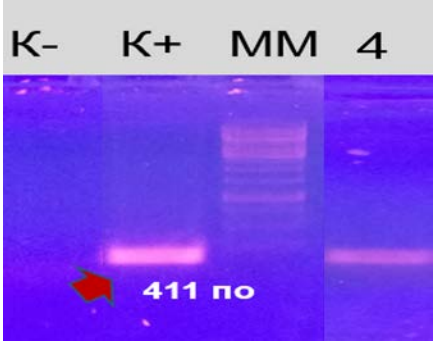

Рис. 6. Електрофореграма розділення продуктів ампліфікації сумарної рослинної ДНК трансформанту спельти «Зоря України» (ознака – карликовість) із праймерами до *bar* після ЗТ-ПЛР: 4 – трансформант «Зоря України» (45 доба після проростання), К+ – позитивний контроль, плазмідна ДНК, К- – негативний контроль, вода (H_2O), ММ – молекулярний маркер довжини (1Kb, «Thermo Scientific»)

Таким чином, нами вперше показано можливість здійснення *in planta* та *in vitro* генетичної трансформації із елементами редагування геному для сортів озимої амфідиплоїдної спельти (*Triticum spelta* L.) сортів «Зоря України» та «Європа». Подальші молекулярно-біологічні аналізи, зокрема сиквенування ділянок інтересу в генах *rht* та *ahas* дозволять нам дослідити факт внесення направлених мутацій у отримані нами лінії генетично трансформованих амфідиплоїдних пшениць.

Список використаних джерел:

1. Porebski S., Bailey L.G., Baum B.R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components // Plant Mol. Biol. Rep. 1997. Vol. 15. Iss. 1. P. 8–15. doi: 10.1007/BF02772108