

ИЗУЧЕНИЕ ПРОНИКАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ НАНОЧАСТИЦ, КОНЬЮГИРОВАННЫХ С CY3+(CAS9GFP+NLS), В ПЫЛЬЦУ ЛУКА РЕПЧАТОГО

М. Мардини, С.Г. Монахос, К.Н. Вишняков, Н.А. Кудрявцева, Л.И. Хрусталева

Российский Государственный Аграрный Университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Россия

Пыльца – это естественная система передачи генетического материала. Метод опыления растений генетически отредактированной пылью привлекает внимание исследователей, так как является коротким путем к получению семян с измененным целевым геном. Магнитофекция пыльцевого зерна наночастицами является одним из наиболее современных и многообещающих методов генной инженерии. Термин "pollen magnetofection" появился первый раз в журнале Nature Plants (Zhao *et al.*, 2017). Авторы этой статьи сообщили, что под воздействием магнитного поля, магнитные наночастицы (МНЧ) могут случайным образом проходить в пыльцу хлопка через апертуру. Однако, несмотря на большое количество цитирований статьи Zhao с соавторами (125 на момент написания тезисов), до сих пор не удалось повторить этот эксперимент. Vejlupkova *et al.* (2020) проверили эффективность метода магнитофекции наночастицами в пыльцевых зёрнах кукурузы и ржи, и после 16 попыток не было обнаружено ни одного случая успешной трансформации. Авторы предполагают, что метод магнитофекция может быть проблематичным именно с данными видами, и они сообщают о необходимости проверки этого метода на других культурах и особенно однодольных.

В качестве растительного материала мы использовали пыльцевые зерна лука репчатого (*Allium cepa*) сорт Мячковский 300. Используемые наночастицы были в виде металл-органических каркасных структур (MOF) размером ± 100 нм. Частицы были приготовлены методом Ringaci *et al.* (2021). Для мониторинга проходимости разработанных наночастиц в пыльцевые зерна и доставки в ядро функциональных элементов системы CRISPR/Cas9 была создана система слежения с использованием флуорофора Cy3, ковалентно соединенного с МНЧ, и комплекса из функционального Cas9 и GFP (Green Fluorescent Protein), слитого с сиквенсом ядерной локализации (NLS), что обеспечит транспорт CRISPR/Cas9 в ядро. Магнитофекцию пыльцевых зерен проводили соответственно протоколу (Zhao *et al.*, 2017) с несколькими изменениями (Мардини и др., 2020). Гистологические и цитологические препараты прорастающей пыли анализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Zeiss AxioImager M2 и программы ZEN 3.4 Blue edition. МНЧ были детектированы в 10 % пыльцевых трубок.

В нашем проекте ген CENH3 является целевым объектом для редактирования. В 2010 году Ravi & Chan (2010) опубликовали сенсационные результаты – легкий метод получения гаплоидных семян *in vivo* у *Arabidopsis thaliana*, управляя единственным белком CENH3 (центромерный специфичный гистон H3). Авторы показали, что CenH3 – /– *Arabidopsis* нулевой мутант в сочетании с модифицированной версией CENH3 под названием «tailswap-CENH3» может индуцировать выход гаплоидов с очень высокой частотой (25–45 %). Для поиска гомологии с геном CENH3 в геноме *A. cepa* (Finkers *et al.*, 2021) мы использовали сиквенс мРНК AceCENH3 *A. cepa* (NCBI accession: AB600275; Nagaki *et al.*, 2012). BLAST анализ показал, что ген CENH3 *A. cepa* имеет размер 22556 bp и состоит из 7 экзонов и 6 интронов. Для определения мутаций, приводящих к потере функции гистона CENH3 *A. cepa* проводили SIFT анализ (Sim *et al.*, 2012). Эти данные будут использованы в дальнейшем для разработки sgRNA с целью получения CENH3-опосредованных гаплоидных форм лука репчатого. Получение гаплоидов с последующим их удвоением является важным инструментом ускоренной селекции растений. Линии удвоенных гаплоидов являются фенотипически стабильными и используются для создания F1 гибридов.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075–15–2020–905 от «16» ноября 2020 г. о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

Литература

- Finkers, R., van Kaauwen, M.P., Ament, K., Burger-Meijer, K., Egging, R.J., Huits, H... & Scholten, O. (2021). Insights from the first genome assembly of Onion (*Allium cepa*). bioRxiv.
- Nagaki, K., Yamamoto, M., Yamaji, N., Mukai, Y., & Murata, M. (2012). Chromosome dynamics visualized with an anti-centromeric histone H3 antibody in *Allium*. PLoS One, 7(12), e51315.
- Ravi, M., & Chan, S.W. (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. Nature, 464(7288), 615–618.
- Ringaci, A., Yaremenko, A.V., Shevchenko, K.G., Zvereva, S.D., & Nikitin, M.P. (2021). Metal-organic frameworks for simultaneous gene and small molecule delivery in vitro and in vivo. Chemical Engineering Journal, 418, 129386.
- Sim, N.L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G., & Ng, P.C. (2012). SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. Nucleic acids research, 40(W1), W452–W457.
- Vejlupkova Z. et al. (2020). No evidence for transient transformation via pollen magnetofection in several monocot species. Nature plants, 6(11), 1323–1324.
- Zhao, Xiang, et al. "Pollen magnetofection for genetic modification with magnetic nanoparticles as gene carriers." Nature plants 3.12 (2017): 956–964.
- Мардини М.И др. (2020). Анализ проникающей способности наночастиц в пыльцевые зерна лука репчатого. Тезисы докладов XX Всероссийская конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», Москва, 2020, сс. 43–44.