

Сайленсинг генов AKR2 в растениях *Nicotiana benthamiana*

И.В. Селифонов^{1*}, А.Г. Соловьев^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия

*selifonov2002@gmail.com

Цель: Жизненный цикл вирусов растений включает их межклеточный транспорт через плазмодесмы – регулируемые каналы, соединяющие клетки растения в единый симпласт. В процессе эволюции вирусы приобрели гены, продукты которых обеспечивают транспорт вирусного генома через плазмодесмы и носят название транспортных белков. Одним из хорошо изученных примеров генов транспортных белков вирусов растений является тройной блок генов (TGB) X-вируса картофеля (PVX), кодирующий белки TGB1, TGB2 и TGB3. Ранее путем скрининга с использованием дрожжевой двугибридной системы было выяснено, что белок TGB2 взаимодействует с продуктами трех близкородственных генов *N. tabacum*, гомологичных генам AKR2 *Arabidopsis thaliana*. В свою очередь, эти белки связываются с β -1,3-глюканазой – ферментом, потенциально задействованным в регуляции пропускной способности плазмодесм посредством гидролиза каллозы. Авторы выдвинули предположение, что белки AKR2 используются вирусом для облегчения его межклеточного транспорта. Цель данной работы заключается в валидации предложенного механизма путем вирус-индуцированного сайленсинга генов AKR2 в *Nicotiana benthamiana*.

Материалы и методы: Поиск с помощью blast в референсном геноме *N. benthamiana* выявил наличие у растения трех гомологов AKR2. Последовательности находок были выравнены, после чего в их выравнении был определен участок наибольшего сходства. Найденный фрагмент был амплифицирован и клонирован в вектор на основе вируса погрешковости табака (TRV). Полученная конструкция была введена в растения *N. benthamiana* методом агроинфильтрации. В растения контрольной группы была доставлена сходная конструкция, содержащая фрагмент гена GFP вместо участка AKR2. Через 12 дней после инфильтрации в образцах листьев шести растений (по три из каждой группы) были измерены уровни экспрессии исследуемых генов методом RT-qPCR с нормализацией на ген F-box-белка.

Результаты: Согласно результатам RT-qPCR в опытной группе относительная экспрессия исследуемых генов была снижена в среднем на 86% по сравнению с контрольной, это отличие было статистически достоверным. При наблюдении за изменениями в фенотипе растений в процессе развития инфекции было отмечено, что растения с сайленсингом генов AKR2 отличались некоторой задержкой роста и хлоротической пятнистостью верхних листьев. В дальнейшем растения со сниженным уровнем экспрессии AKR2 будут использованы для анализа эффективности межклеточного транспорта PVX и внутриклеточной локализации транспортных белков.

Выводы: Методом вирус-индуцированного сайленсинга генов были получены растения *N. benthamiana* со сниженным уровнем экспрессии генов AKR2. Эти растения будут впоследствии использованы в качестве модели для валидации механизма повышения пропускной способности плазмодесм вирусным транспортным белком TGB2.