

Вирус-опосредованное геномное редактирование *Nicotiana benthamiana* для создания растений-продуцентов

М.В. Дмитриева^{1,2*}, А.В. Полховский^{1,2}, И.В. Киров^{1,2}

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия

* dmitrievamarina10@yandex.ru

Цель: Адаптировать метод вирус-опосредованного геномного редактирования (VIGE) на основе вируса TSWV и использовать его для получения растений *Nicotiana benthamiana* с нокаутами по генам *DCL2* и *DCL4*.

Материалы и методы: Клонирование sgRNA в вектор проводилось при использовании метода GoldenGate, для доставки конструкций в растения применялась агробактериальная трансформация. Растения выращивались при температуре 22 °C и световом периоде 16ч/8ч. Детекция мутагенеза проводилась при секвенировании по Сэнгеру и/или при использовании T7 эндонуклеазы. Распространение и передача вируса детектировалась ОТ-ПЦР. Каллусообразование и регенерация растений проводилась на среде MS (Murashige-Skoog) без добавления антибиотиков.

Результаты: Вирус-опосредованное редактирование генов (VIGE) становится еще одним направлением мутагенеза, который позволяет получить растения с точными мутациями, не используя трансгенез («DNA-free»). Также преимуществом VIGE является то, что многие важные сельскохозяйственные растения не подвержены классической агробактериальной трансформации, но подвержены заражению вирусами. Для облегчения процесса их заражения необходимы специальные растения-посредники с ослабленным противовирусным ответом – «вирусные фабрики», в которых будет проводится наработка вирусных частиц для последующего заражения сельскохозяйственных культур. Ранее вирус пятнистого увядания томатов (TSWV) использовался для бестрансгенной доставки системы CRISPR-Cas9 в растительные клетки и мутагенеза в целевых генах. Вирусное системное инфицирование соматических тканей растений с последующим культивированием *in vitro* позволяет регенерировать отредактированные растения и получить готовый к использованию безвирусный материал для селекции растений.

В данной работе мы адаптировали вирус-опосредованный мутагенез растений на основе вируса TSWV на примере гена фитоендесатуразы (*PDS*) и применили его для таргетного мутагенеза генов дайсер-подобного белка 2 (*DCL2*) и дайсер-подобного белка 4 (*DCL4*) *N. benthamiana*. Мы проанализировали связь между эффективностью редактирования и прогрессированием симптомов вируса, а также тепловой обработки (37 °C), холодового стресса (18 °C), сайленсинга *NbRDR6*. Для получения растений с мутациями в целевых генах мы использовали *in vitro* регенерацию из системно инфицированных листьев *N. benthamiana*. Секвенирование показало, что более 95% растений-регенерантов несли мутации в 1–4 генах *PDS*. Для проверки наследования было получено потомство (M_1) с растений, несущих мутации в 2–3 генах *PDS* (M_0). Потомство этих растений дало расщепление по фенотипу 3 (зеленые растения) : 1 (белые растения) и 15 (зеленые растения) : 1 (белые растения).

Выводы: Метод VIGE показал эффективность редактирования соматических клеток до 60% для гена *PDS* *N. benthamiana*. Были получены растения *N. benthamiana* с нокаутом по генам *DCL2* (эффективность составила 2–48%) и *DCL4* (эффективность составила 3–16%), которые будут в дальнейшем использоваться для наработки вирусных частиц с целью заражения других видов растений.

Финансирование: Исследование поддержано в рамках программы «Приоритет 2030» (МФТИ, Физтех).