

Вирусная доставка белков для редактирования растений *Brassica napus* L.

А.С. Ивахненко^{1*}, М. Мардини¹, В.В. Уткина¹, И.В. Киров^{1,2}

¹Московский физико-технический институт (Национально-исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

* ivakhnenko.as@phystech.edu

Цель: Оптимизация условий вирус-опосредованного редактирования генома *Brassica napus* L. с использованием вектора TRV для доставки TnpB редакторов.

Материалы и методы: Для временной экспрессии белков TnpB редакторов использовали рекомбинантный вектор TRV, состоящий из двух РНК – RNA1 и RNA2. Были разработаны направляющие РНК (gRNA), нацеленные на консервативные участки гена *PDS* у *Brassica napus*. Полученные конструкции были трансформированы в *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101) и были использованы для заражения растений рапса методом агроинфильтрации. Влияние возраста растений (6 и 12 дней после всходов) и концентрации бактериальной суспензии ($OD_{600} = 0,8; 1,0$) на эффективность вирусного заражения оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Визуальный анализ проводили по наличию фенотипических изменений, характерных для инактивации *PDS*. Для оценки эффективности редактирования образцы растений отбирали на разных этапах эксперимента.

Результаты: Для оценки эффективности системы вирусной доставки белков-редакторов были подобраны гидовые РНК для редактирования гена *PDS* (phytoene desaturase), широко используемого в качестве визуального маркера благодаря характерному фенотипу обесцвечивания тканей. Направляющие РНК разрабатывались с учетом особенностей сайта мишени и совместимости с различными TnpB геномными редакторами. Исследование влияния возраста растений на эффективность TRV-заражения показало, что инфицирование 6-дневных семян приводит к низкому уровню вирусной нагрузки, тогда как у 12-дневных растений наблюдалось более активное распространение вируса. Согласно результатам ОТ-ПЦР, при изучении влияния плотности агробактериальной суспензии на успешность инфицирования было установлено, что $OD_{600} = 1,0$ является наиболее оптимальной. При $OD_{600} = 0,8$ инфекция распространялась менее эффективно. Полученный фенотип инфицированных растений указывает на появление признаков, характерных для мутаций в гене *PDS*. Эффективность геномного редактирования была оценена на соматических клетках рапса.

Выводы: Предварительные результаты показывают, что эффективность вирус-опосредованного редактирования генома *B. napus* зависит от возраста растений и условий агроинфильтрации. Трудности и преимущества вирусной доставки геномных редакторов для редактирования генома рапса будут обсуждаться.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке программы «Приоритет 2030» (МФТИ, Физтех).