

Получение растений *Nicotiana benthamiana* «вирусных фабрик» с помощью метода VIGE на основе вируса TSWV

М.В. Дмитриева^{1*}, А.В. Полховский¹, Р.А. Комахин², И.В. Киров¹

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

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

* dmitrievamarina10@yandex.ru

Ключевые слова: биологический мутагенез; VIGE; TSWV; CRISPR-Cas9; DCL

Nicotiana benthamiana “virus factory” obtainment via TSWV-based VIGE

M.V. Dmitrieva^{1*}, A.V. Polkhovsky¹, R.A. Komakhin², I.V. Kirov¹

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

* dmitrievamarina10@yandex.ru

Key words: biological mutagenesis; VIGE; TSWV; CRISPR-Cas9; DCL

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, неподверженные классической агробактериальной трансформации, могут быть 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.

В данной работе мы адаптировали вирус-опосредованный мутагенез растений на основе вируса TSWV на примере гена фитоендесатуразы (*NbPDS*) и применили его для таргетного мутагенеза генов дайсер-подобного белка 2 (*NbDCL2*) и дайсер-подобного белка 4 (*NbDCL4*). 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 локусах *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 зеленых проростков к белым 3:1 и 15:1. Нами были получены растения *N. benthamiana* с нокаутом по генам *DCL2* (эффективность составила 2–48%) и *DCL4* (эффективность составила 3–16%). Кроме того, при регенерации отредактированных тканей нами были получены нокаутные растения-регенеранты по гену *NbDCL2* (эффективность составила 2–98%) и *NbDCL4* (эффективность составила 4–99%). Растения, содержащие мутации в генах *NbDCL2/4*, будут в дальнейшем использоваться для наработки вирусных частиц с целью заражения других видов растений.

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