

ЗАМАЛЧИВАНИЕ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ *eIF(iso)4G* И *eIF(iso)4E* КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР К ВИРУСУ ОСПЫ СЛИВЫ НА ПРИМЕРЕ КЛОНОВОГО ПОДВОЯ 146-2

Муренец Лилия Юрьевна¹, Пушин Александр Сергеевич^{1,2}, Тимербаев Вадим Рафаилович^{1,2,3}, Хмельницкая Татьяна Игоревна¹, Грибков Эдуард Евгеньевич⁴, Андреев Никита Сергеевич⁴, Долгов Сергей Владимирович^{1,2,3}

¹Филиал ФГБУН Института Биоорганической химии РАН, Россия, г.Пушино

²ФГБНУ Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Сельскохозяйственной Биотехнологии РАН, Россия, Москва

³ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН», Россия, Республика Крым, г. Ялта

⁴НИ Томский Государственный Университет, Россия, г.Томск

dolgov@bibch.ru

Болезнь Шарки, вызываемая вирусом оспы сливы (PPV), представляет собой одно из наиболее вредоносных, карантинных вирусных заболеваний, которое поражает деревья персика, сливы, абрикоса, вишни и черешни, а также декоративные растения и подвои. Отсутствие природной резистентности к вирусу у косточковых стало решающим фактором для применения методов генетической трансформации для получения устойчивых форм. Гены *eIF(iso)4G* и *eIF(iso)4E* кодируют факторы инициации трансляции, которые использует в жизненном цикле вирус Шарки. В представленном исследовании изучалось влияние замалчивания этих генов с помощью метода РНК-интерференции на устойчивость растений подвоя 146-2 к вирусу Шарки. Для генетической трансформации растений созданы два вектора, с самокомплементарными последовательностями фрагмента генов *eIF(iso)4G* и *eIF(iso)4E* под контролем сильного промотора гена рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксылазы/оксигеназы (RuBisCo). Успешная генетическая трансформация была проведена штаммом СВЕ21 *A. tumefaciens*. В качестве источника эксплантата использовали целые листья побегов, культивируемых *in vitro*. В экспериментах получено 8 независимых трансгенных линий подвоя 146-2. Их статус подтвержден ПЦР и Саузерн-блоттингом. Полученные растения были акклиматизированы в условиях теплицы. Замалчивание генов *eIF(iso)4G* и *eIF(iso)4E* в этих линиях подтверждено методом количественного ПЦР. Растения всех трансгенных линий подвоя были инфицированы вирусом Шарки методом окулировки зараженными почками. Устойчивость полученных растений оценивалась методом иммуноферментного анализа. Результаты ИФА показали, что замалчивание гена *eIF(iso)4G* не приводило к повышению устойчивости, в то время как замалчивание гена фактора *eIF(iso)4E* приводило к повышению устойчивости к вирусу Шарки, а растения одной линии в течение двух лет после инфицирования не проявляли признаков инфицирования.

Ключевые слова: вирус оспы сливы, клоновый подвой, косточковые, генетическая трансформация, РНК-интерференция, фактор инициации трансляции

**SILENCING THE GENES OF TRANSLATION INITIATION FACTORS *eIF(iso)4G*
AND *eIF(iso)4E* AS A METHOD FOR INCREASING THE RESISTANCE OF STONE
FRUIT CROPS TO PLUM POX VIRUS ON THE EXAMPLE OF CLONAL ROOTSTOCK
146-2**

**Mourenets Lilia Yuryevna¹, Pushin Alexander Sergeevich^{1,2}, Timerbaev Vadim
Rafailovich^{1,2,3}, Khmel'nitskaya Tatyana Igorevna¹, Gribkov Eduard Evgenievich⁴, Andreev
Nikita Sergeevich⁴, Dolgov Sergey Vladimirovich^{1,2,3}**

¹ *The Branch of the Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the
Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

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

³ *Nikita Botanical Gardens – National Scientific Centre, Russian Academy of Sciences,
Yalta, Russia,*

⁴ *The National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia
dolgov@bibch.ru*

Sharka disease, caused by the plum poxvirus (PPV), is one of the most harmful, quarantine viral diseases that affects stone fruit crops. The absence of natural resistance to the virus in stone fruits has become a decisive factor for the use of genetic transformation methods to obtain stable forms. The *eIF(iso)4G* and *eIF(iso)4E* genes encode translation initiation factors that are used in the life cycle of the Sharky virus. In the presented study, the effect of silencing these genes using the RNA interference method on the resistance of rootstock 146-2 plants to the Sharky virus was studied. Two vectors have been created for the genetic transformation of plants, with self-complementary sequences of the *eIF(iso)4G* and *eIF(iso)4E* gene fragments under the control of a strong promoter of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) gene. A successful genetic transformation was carried out by the CBE21 strain of *A. tumefaciens*. Whole leaves of shoots cultivated in vitro were used as a source of explants. 8 independent transgenic lines of rootstock 146-2 were obtained in experiments. Their status was confirmed by PCR and Southern Blotting. The obtained plants were acclimatized in a greenhouse. The silencing of the *eIF(iso)4G* and *eIF(iso)4E* genes in these lines was confirmed by quantitative PCR. Plants of all transgenic rootstock lines were infected with Sharky virus by the method of oculation with infected buds. The stability of the obtained plants was evaluated by enzyme immunoassay. The ELISA results showed that silencing the *eIF(iso)4G* gene did not lead to increased resistance, while silencing the *eIF(iso)4E* factor gene led to increased resistance to the Sharky virus, and the one line's plants showed no signs of infection for two years after infecting.

Keywords: Plum pox virus, clonal rootstock, stone fruits, genetic transformation, RNA interference, translation initiation factor.