

## БИОИНЖЕНЕРНЫЕ И ГЕНОМНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СОЗДАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Долгов Сергей Владимирович<sup>1,2</sup>, Муренец Лилия Юрьевна<sup>1</sup>, Сидорова Татьяна Николаевна<sup>1,2</sup>, Тимербаев Вадим Рафаилович<sup>1,2</sup>, Пушин Александр Сергеевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Филиал Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Пущино, Россия

<sup>2</sup> Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Ялта, Россия  
[dolgov@bibch.ru](mailto:dolgov@bibch.ru)

В последние годы вирус оспы сливы (PPV), вызывающий болезнь шарки сливы стал главной угрозой для выращивания косточковых культур. Этот вирус нанес огромный экономический ущерб и вызвал значительное снижение производственных площадей в странах Восточной Европы и Средиземноморья. Современные методы генной инженерии дают возможность значительно ускорить процессы создания высокопродуктивных сортов сливы с повышенной или полной устойчивостью к вирусам, недостижимые методами традиционной селекции. Применение современных биоинженерных приемов в селекции косточковых культур тормозится отсутствием отработанных методик, способных обеспечить достаточно высокую частоту регенерации побегов из соматических тканей.

В настоящем исследовании описано получение устойчивой к PPV сливы домашней сорта Стартовая (*P. domestica* L.) на основе РНК интерференции посредством опосредованной агробактериями трансформации листовых эксплантов *in vitro*. Благодаря органогенезу из листьев, разработанный протокол позволяет проводить модификацию генома сливы без потери фенотипического соответствия исходному сорту. В результате исследований получено семь независимых линий сливы, содержащих самокомплементарные фрагменты последовательности гена PPV-CP, разделенные интроном PDK картофеля. Согласно оценке с помощью RT-PCR, DAS-ELISA, вестерн-блоттинга, теста ImmunoStrip а также визуальных наблюдений, деревья GM сливы оставались незараженными в течение 9 лет. Стабильная экспрессия производной от PPV генной конструкции, кодирующей сплайсированные интронами шпилечные РНК, обеспечивала высокоэффективную защиту сливовых деревьев от перманентной вирусной инфекции. В то же время это наблюдение указывает на отсутствие системного распространения устойчивости от GM-тканей к инфицированному транспланту сливы даже после нескольких лет совместного роста.

Для получения устойчивых к вирусу шарки сливы (PPV) растений клонового подвоя 146-2 использовался метод РНК-интерференционного сайленсинга генов *eIF (iso)4G* и *eIF(iso)E* кодирующих факторы инициации трансляции, участвующие в жизненном цикле вируса шарки сливы. Для управления экспрессией шпильки был выбран сильный промотор гена рибулозо-1,5-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (RuBisCo) в укороченном варианте. В результате проведенных исследований получены 6 трансгенных линий для подвоя '146-2' с замалчиванием экспрессии гена *eIF(iso)4G* и 3 линии с замалчиванием гена *eIF(iso)4E*. Все растения, экспрессирующие шпилечную конструкцию к гену *eIF(iso)4G*, в первый год после заражения проявляли менее слабые симптомы, которые на второй год становились более яркими и типичными. Две из трех линий, экспрессирующие шпилечную конструкцию к гену *eIF(iso)4E*, в первый год после заражения продемонстрировали устойчивость (по сравнению с нетрансгенным контролем) к PPV, и были отобраны для удаления маркерных генов путем индуцибельной сайт-специфической рекомбинации и дальнейшей проверки их устойчивости к вирусу.

Принимая во внимание быстрое развитие методов редактирования генома растений, целевая мутация генов-хозяев, вовлеченных в репликацию, может быть многообещающим подходом для инженерии устойчивости к вирусам, исключая введение чужеродных последовательностей в геном косточковых культур.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-14-00118

GenBio2022: III Международная научно-практическая конференция

«Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений»

---

*Ключевые слова:* косточковые культуры, PPV, факторы инициации трансляции, РНК-интерференция, сайленсинг генов

---

## BIOENGINEERING AND GENOMIC TECHNOLOGIES IN CREATING PLANT RESISTANCE TO VIRAL INFECTION

**Dolgov Sergey<sup>1,2</sup>, Mourenets Lilia<sup>1</sup>, Sidorova Tatiana<sup>1,2</sup>, Timerbayev Vadim<sup>1,2</sup>, Pushin Alexander**

<sup>1</sup> Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry named after M. M. Shemyakin and Y. A. Ovchinnikov OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES, Pushchino, Russia

<sup>2</sup> Nikitsky Botanical Garden – National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Yalta, Russia  
dolgov@bibch.ru

In recent years, the plum pox virus (PPV) that causes plum shark disease has become a major threat to stone crop cultivation. This virus has caused enormous economic damage and caused a significant decrease in production areas in eastern Europe and the Mediterranean. Modern methods of genetic engineering make it possible to significantly accelerate the processes of creating highly productive plum varieties with increased or complete resistance to viruses, unattainable by traditional breeding methods. The use of modern bioengineering techniques in the selection of stone crops is hampered by the lack of proven techniques that can provide a sufficiently high frequency of regeneration of shoots from somatic tissues.

The present study describes the production of PPV-resistant plums of the home variety *Starter* (*P. domestica* L.) based on RNA interference through agrobacterium-mediated transformation of leaf explants *in vitro*. Thanks to the organogenesis of the leaves, the developed protocol allows the modification of the plum genome without losing the phenotypic correspondence to the original variety. The research resulted in seven independent plum lines containing self-complementary fragments of the PPV-CP gene sequence separated by the potato PDK intron, according to an assessment using RT-PCR, DAS-ELISA, Western blotting, ImmunoStrip test and visual observations, GM plum trees remained uninfected for 9 years. The stable expression of the PPV-derived gene construct encoding intron-spliced hairpin RNAs provided highly effective protection for plum trees against permanent viral infection. At the same time, this observation indicates that there is no systemic spread of resistance from GM tissues to an infected plum graft, even after several years of joint growth.

To obtain virus-resistant plum blossom (PPV) plants of clonal rootstock 146-2, the method of RNA interference silencing of the genes *eIF(iso)4G* and *eIF(iso)E* encoding factors for the initiation of translation involved in the life cycle of the plum shark virus was used. To control the expression of the hairpin, a strong promoter of the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) gene in a shortened version was selected. As a result of the studies, 6 transgenic lines were obtained for the rootstock '146-2' with silencing of *eIF(iso)4G* gene expression and 3 lines with silencing of the *eIF(iso)4E* gene. All plants expressing the hairpin structure to the *eIF(iso)4G* gene in the first year after infection showed less mild symptoms, which in the second year became more vivid and typical. Two of the three lines expressing the hairpin to the *eIF(iso)4E* gene demonstrated resistance (compared to non-transgenic control) to PPV in the first year after infection, and were selected to remove the marker genes by inducible site-specific recombination and further test their resistance to the virus.

Given the rapid development of plant genome editing techniques, the targeted mutation of host genes involved in replication, and the widespread distribution of PPVs in infected tissues may be a promising approach for engineering resistance to viruses that exclude the introduction of foreign sequences into genome of stone crops.

The work was supported by the grant of the Russian Science Foundation No.22-1-00118

*Keywords:* stone crops, PPV, translation initiation factors, RNA interference, gene silencing.