

**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 Л. Ю.^{1, 3}, Пушин А. С.^{1, 2}, Тимербаев В. Р.^{1, 2, 3}, Хмельницкая Т. И.¹,
Грибков Э. Е.⁴, Андреев Н. С.⁴, Долгов С. В.^{1, 2, 3}**

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

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

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

⁴ НИ Томский Государственный Университет, Россия, г.Томск
lilla@mail.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 используются в жизненном цикле вируса Шарки. Влияние замалчивания этих генов с помощью метода РНК-интерференции на устойчивость растений подвоя 146-2 к вирусу представлено в данной работе. 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-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы (RuBisCo). Успешная генетическая трансформация была проведена штаммом CBE21 *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 растения одной линии с замалчиванием гена фактора *eIF(iso)4E* проявили устойчивость к вирусу Шарки в течение двух лет после инфицирования.

Ключевые слова: вирус оспы сливы, клонированный 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 L. Yu.^{1, 3}, Pushin A. S.^{1, 2}, Timerbaev V. R.^{1, 2, 3}, Khmel'nitskaya T. I.¹,
 Gribkov E. E.⁴, Andreev N. S.⁴, Dolgov S. V.^{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*
lilla@mail.ru

Sharka disease, caused by the plum pox virus (PPV), is one of the most harmful, quarantine viral diseases that affects peach, plum, apricot, cherry and cherry trees, as well as ornamental plants and rootstocks. 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. The effect of silencing these genes using the RNA interference method on the resistance of rootstock 146-2 plants to the virus is presented in this paper. Two vectors have been created for the genetic transformation of plants, with selfcomplementary 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 Sharka 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 plants of the same lineage with silencing of the *eIF(iso)4E* factor gene showed resistance to the Sharka virus for two years after infection.

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