

**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ КОДИРУЮЩИХ
ФАКТОРЫ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ eIF4E С ПОМОЩЬЮ РНК-
ИНТЕРФЕРЕНЦИИ И ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ КАК СПОСОБ
ДОСТИЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КАРТОФЕЛЯ К ВИРУСУ PVY**

**Мирошниченко Д. Н.^{1, 2}, Тимербаев В. Р.^{1, 2}, Киров И. В.², Клементьева А. А.¹,
Сидорова Т. Н.¹, Пушин А. С.^{1, 2}, Долгов С. В.^{1, 2}**

¹ Филиал ФГБНУ ГНЦ Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино

² ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной
биотехнологии, Москва
miroshnichenko@bibch.ru

Радикальное снижение вредоносности вирусных инфекций у с/х культур возможно только при создании устойчивой генетической резистентности растений. Из-за зависимости вирусов от трансляционного и транскрипционного аппаратов растения-хозяина, изменение функциональной активности генов, кодирующих их компоненты, может обеспечить генетическую устойчивость к вирусной инфекции. В нашей работе для получения растений картофеля устойчивых к вирусу PVY, одного из наиболее вредоносных вирусных патогенов, мы использовали два генно-инженерных подхода. Первый основан на использовании РНК-интерференционных шпилечных конструкций для замалчивания генов факторов инициации трансляции eIF4E1 и eIF4E2. Второй - на внесении нокаутных мутаций в последовательности этих генов с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Сравнительный анализ трансгенных растений картофеля показал, что устойчивость к заражению штаммами PVYNTN и PVYO определяется выбором промотора для экспрессии интерференционной кассеты. Ряд трансгенных линий, в которых RNAi шпилька находилась под промотором StLhca, демонстрировали почти полное отсутствие характерных признаков вирусной инфекции в течение трех-шести недель после заражения. Нозерн блот и RNAseq анализы подтвердили, что устойчивость является следствием накопления интерферирующих малых РНК, соответствующих последовательностям eIF4E1 и eIF4E2. Транскриптомный анализ показал, что нокаун генов eIF4E вызвал изменение дифференциальной экспрессии около 6 тыс. генов, что привело к ряду фенотипических изменений, в основном связанных с развитием генеративных органов, при этом клубнеобразование не пострадало. Аналогичные изменения были обнаружены у вирусоустойчивых растений, полученных в результате нокаута аллелей eIF4E1 и eIF4E2 с помощью CRISPR/Cas9. При этом одно- и двух-аллельные мутации в генах не приводили к устойчивости, тогда как наличие 3-4 нокаутных аллелей eIF4E обеспечивало ощутимую резистентность к заражению PVY. Устойчивость трансгенных и геномно отредактированных растений стабильно сохранялась в дальнейших генерациях, полученных из клубней.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-14-00118.

MODIFICATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF GENES ENCODING TRANSLATION INITIATION FACTORS EIF4E USING RNA INTERFERENCE AND GENOME EDITING AS A WAY TO ACHIEVE GENETIC RESISTANCE OF POTATO TO THE PVY VIRUS

Miroshnichenko D. ^{1,2}, Timerbaev V. ^{1,2}, Kirov I. ², Klementyeva A. ¹, Sidorova T. ¹, Pushin A. ^{1,2}, Dolgov S. ^{1,2}

*Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Pushchino
Federal State Budgetary Scientific Institution All-Russian Research Institute of Agricultural
Biotechnology, Moscow*

miroshnichenko@bibch.ru

A radical reduction in harmful viral infections of crops is possible only through strong genetic resistance of plants. Viruses reproduce via the translational and transcriptional apparatus of the host plant, so changing the functional activity of the genes encoding their components can provide genetic resistance. In our work, two gene engineering approaches have been used to obtain resistance to PVY, one of the most harmful viral pathogens of potato. The first approach involves the transfer of RNA interference hairpin constructs to suppress the genes encoding the translation initiation factors *eIF4E1* and *eIF4E2*. The second approach is the induction of knockout mutations in the sequence of the same genes using the CRISPR/Cas9 editing system.

It was found that resistance to infection by PVYNTN and PVYO strains is determined by the choice of a promoter to drive the RNA interference expression cassette. A number of transgenic lines expressing the RNAi hairpin under the *StLhca* promoter showed no viral symptoms for three to six weeks after infection. Northern blotting and RNAi analysis confirmed that resistance was associated with the accumulation of small interfering RNAs corresponding to the *eIF4E1* and *eIF4E2* sequences.

Transcriptomic analysis showed that *eIF4E* gene knock-down caused changes in the differential expression of more than 6,000 genes. This resulted in a number of phenotypic changes, mainly related to the development of generative organs, while tuber formation was not affected.

Similar changes were found in virus-resistant plants obtained by knocking out *eIF4E1* and *eIF4E2* alleles using CRISPR/Cas9. Single- and dual-allelic mutations did not confer resistance, whereas the presence of 3-4 knockout alleles of the *eIF4E* genes provided resistance to PVY infection. The resistance of transgenic and genome-edited plants was stably maintained in subsequent vegetative generations obtained from tubers.

The research was supported by the Russian Science Foundation, # 22-14-00118.