

САЙЛЕНСИНГ ГЕНОВ *SteIF4E* ПОВЫШАЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ КАРТОФЕЛЯ La Strada К ВИРУСУ Y КАРТОФЕЛЯ, ПЛЕЙОТРОПНО ВЛИЯЯ НА РОСТ И ПРОДУКТИВНОСТЬ РАСТЕНИЙ

© 2024 г. Д. Н. Мирошниченко^{1, 2, *}, А. А. Окунева³, Т. Н. Сидорова¹, В. Р. Тимербаев^{1, 2},
В. В. Алексева¹, А. С. Пушин^{1, 2}, С. В. Долгов^{1, 2}

¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Московская область, Пушино, 142290 Россия

²Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

³ООО «Дока – Генные технологии», с. Рогачево, Московская область, 141880 Россия

*e-mail: miroshnichenko@bibch.ru

Поступила в редакцию 23.10.2024 г.

После доработки 06.11.2024 г.

Принята к публикации 14.11.2024 г.

Создание растений картофеля с устойчивостью к Y-вирусу (potato virus Y, PVY) позволит успешно решить проблемы потери урожая этой важной овощной и технической сельскохозяйственной культуры. В процессе репликации и системного распространения PVY использует трансляционный аппарат картофеля, взаимодействуя с клеточным фактором инициации трансляции eIF4E. Понижив экспрессию генов, кодирующих eIF4E растений, можно ограничить репликацию вируса в клетках растений-хозяев и его дальнейшее распространение. В работе описано получение растений картофеля сорта La Strada с ингибированием экспрессии генов *SteIF4E1* и *SteIF4E2* за счет применения технологии РНК-интерференции. В результате переноса безмаркерной экспрессионной кассеты, состоящей из фрагментов генов картофеля (промотор и терминатор *StLhca3*, два инвертированных повтора *SteIF4E1*, разделенных интроном *Strbcs1*), получены трансгенные линии с высокой степенью подавления экспрессии целевых генов. Снижение уровня мРНК *SteIF4E1* и *SteIF4E2* приводило к снижению скорости роста и общей продуктивности растений картофеля и в то же время к стабильной резистентности к заражению PVY. Использование безмаркерной стратегии при проведении генетической трансформации обеспечило получение вирусостойчивых линий картофеля без встраивания в их геном чужеродных репортерных генов, что крайне важно с точки зрения экологической безопасности и общественного признания генетически модифицированных сельскохозяйственных культур.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum* L., вирус Y картофеля, резистентность, РНК-интерференция, *eIF4E*, генномодифицированные растения

DOI: 10.56304/S0234275824060103

Вирусные заболевания по-прежнему наносят значительный ущерб сельскому хозяйству, в том числе картофелеводству. Между тем картофель – четвертая по важности продовольственная культура в мире. Его урожайность в 2021 г. составила 376 млн т

и мировое производство клубней картофеля постоянно растет (<http://www.fao.org/faostat/en/#data>). Вегетативное размножение этой культуры способствует накоплению вирусов, а глобализация современного сельского хозяйства приводит к их широкому распространению. Вирус Y картофеля (PVY), относящийся к семейству Potyviridae, встречается во всем мире и является одним из важнейших патогенов, поражающих картофель [1]. PVY переносится непersistентным образом более чем 40 видами тлей, а также через зараженные клубни картофеля [2]. Известно много штаммов PVY, которые приводят к потере до 50% урожая и, как следствие, к огромному экономическому ущербу [3]. Борьба с PVY на полях крайне затруднена. Наиболее надежным способом противодействия вирус-

¹ **Список окращений:** eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) – эукариотический фактор инициации трансляции 4E; hpRNA (hairpin RNA) – шпилечные РНК; PVY (potato virus Y) – вирус Y картофеля; PVY^O (ordinary strain) – обычный штамм; *Strbcs1* (*Solanum tuberosum* gene for ribulose-(1,5)-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) – ген малой субъединицы рибулозо-(1,5)-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы картофеля; *StLhca3* (*Solanum tuberosum* aporprotein II of the light-harvesting complex of photosystem I) – ген белка светособирающего комплекса фотосистемы I картофеля; МС – среда Мурасиге и Скуга.

ной инфекции считается создание сортов картофеля, обладающих устойчивостью к этому вирусу.

Показано, что для инициации трансляции и репликации вирусов семейства *Potyviridae*, геном которых представлен (+)-цепью РНК, необходимо взаимодействие вирусного белка VPg с клеточным фактором инициации трансляции 4E (eIF4E) растения-хозяина [4]. Вирусы обычно не кодируют канонические факторы трансляции, но разработали широкий спектр стратегий для рекрутирования факторов трансляции своих хозяев — для синтеза вирусных РНК в ущерб эндогенным мРНК, а также для дальнейшего локального и системного распространения по растению. Естественная устойчивость растений к потивирусам чаще всего обусловлена наличием мутаций в генах, кодирующих факторы инициации трансляции, что приводит к нарушению взаимодействия eIF4E–VPg [4]. Между тем у современных коммерческих сортов картофеля природная устойчивость к PVY, ассоциированная с изменением генов, кодирующих изоформы eIF4E, не выявлена. В настоящий момент известно крайне мало естественных источников устойчивости к PVY — в основном это дикие представители рода *Solanum* [5]. Учитывая, что гибридизация и отбор растений в результате межвидовых скрещиваний сталкиваются с рядом проблем (несовместимость, стерильность потомства, сцепленность с нежелательными признаками, гетерозиготность и др.), привести рецессивную устойчивость в коммерческие сорта достаточно сложно.

В отличие от традиционной селекции, введение нового гена, отвечающего за определенный признак, с помощью методов генетической трансформации требует намного меньше времени, а эффект достигается без изменения основных характеристик коммерческого сорта картофеля. Так, за счет избыточной экспрессии природных аллельных вариантов генов *eIF4E*, известных как *pvr12*, *Eva1* и *pot-1*, клонированных из перца, дикого картофеля (*Solanum chacoense*) и томата соответственно, был повышен иммунитет ряда сортоотипов картофеля к различным штаммам [5, 6]. Функциональные гены *eIF4E*, модифицированные с помощью химического или сайт-направленного мутагеза, были перенесены с помощью генетической трансформации в геном картофеля, что позволило получить комплементарные растения, проявляющие дифференциальную устойчивость к потивирусам [7, 8]. Однако простая вставка мутантного гена не обеспечивает полноценную устойчивость, так как немутированные нативные гены *eIF4E* по-прежнему остаются функционально активными и продолжают продуцировать “нормальные” факторы инициации трансляции.

Известно, что сайленсинг генов *eIF4* с помощью РНК-интерференции напрямую ведет к потере восприимчивости табака [9], томата [10], ды-

ни [11], абрикоса [12], сои [13], пшеницы [14] и вишни [15] к вирусной инфекции. Ранее нами показано, что нокдаун нативных генов *eIF4E* позволяет повысить устойчивость растений картофеля сорта Piro1 к заражению высокопатогенным штаммом PVY^{NTN}, вызывающим некроз клубней картофеля [16]. В то же время Н. Duan с соавт. [5] не удалось получить резистентные к PVY трансгенные растения картофеля сорта Russet Burbank, несмотря на накопление в клетках малых интерферирующих РНК, специфичных к генам *eIF4E*. Кроме того, есть противоречивые данные по поводу плейотропного эффекта нокдауна генов *eIF4E*. У некоторых видов растений снижение функциональной активности одного или нескольких факторов инициации трансляции оказывает негативное влияние на рост и развитие растений, а также на работу генеративной системы и урожайность [10, 17–19]. В других исследованиях такой эффект не наблюдали, по-видимому, из-за компенсаторного повышения функциональной активности других факторов инициации семейства eIF4E, которые остались не затронутыми РНК-интерференцией, в клетках растений [12–16].

В геноме представителей семейства Пасленовые, включая картофель, перец и томат, есть два паралога гена *eIF4E*: *eIF4E1* и *eIF4E2*, — гомология между которыми составляет 70–80%. Белок, кодируемый изоформой *eIF(iso)4E*, лишь на 50% сходен по аминокислотной последовательности с продуктами генов *eIF4E1/eIF4E2* [20]. На основании этих данных мы создали и описали безмаркерную экспрессионную кассету, включающую исключительно фрагменты генов картофеля [16]. Это инвертированные повторы длиной 474 п.н. гена *SteIF4E1*, разделенные интроном гена *Strbcs1* — малой субъединицы рибулозо-(1,5)-бисфосфаткарбоксилазы/оксигеназы картофеля. В качестве регуляторных последовательностей использовали промотор и терминатор гена *StLhca3* — белка светособирающего комплекса фотосистемы I картофеля. Этот промотор обеспечивает высокую и стабильную экспрессию в фотосинтезирующих тканях картофеля, в первую очередь в листьях [21] — главным поражаемом вирусными патогенами органе растения. Вследствие высокой гомологии генов *SteIF4E1* и *SteIF4E2* перенос генетической конструкции hpRNA-SteIF4E, содержащей значительную часть экзонов 1, 2 и 3 гена *SteIF4E1*, позволил добиться существенного снижения экспрессии обоих генов *SteIF4E* в картофеле сорта Piro1. В результате одна из полученных интрагенных линий стала устойчивой к заражению высокопатогенным штаммом PVY^{NTN}.

Представленная работа является продолжением наших исследований, направленных на получение коммерческих сортов картофеля, устойчивых к заражению PVY. Чтобы снизить обеспокоенность

по поводу генетически модифицированных культур, содержащих чужеродные последовательно-сти других организмов, в работе использовали интрагенную стратегию. Интрагенез – одно из направлений генной инженерии растений, в котором новую функциональную последовательность, состоящую только из генетических элементов, происходящих из гена(ов) или локусов того же вида, вводят обычными методами генетической трансформации [22]. Неотъемлемая часть этой стратегии – отсутствие каких-либо последовательностей, кодирующих маркерные гены, в особенности гены устойчивости к антибиотикам. Картофель обладает высокой способностью к регенерации множества адвентивных растений из стеблевых сегментов *in vitro*. Основываясь на этом, мы предварительно разработали протоколы получения безмаркерных растений ряда сортов картофеля, в том числе сорта La Strada [23]. Этот сорт обладает хорошими потребительскими и агрономическими характеристиками (<https://www.dokagene.ru/semena-kartofelya/la-strada/>), но недостаточно устойчив к PVY, в частности к общераспространенному штамму PVY⁰.

Цель исследования – с помощью безмаркерной генетической трансформации получить растения картофеля La Strada со вставкой экспрессионной кассеты для интерференционного сайленсинга генов *eIF4E1* и *eIF4E2* и проанализировать устойчивость трансгенных растений к заражению PVY⁰, а также показатели их роста, развития и продуктивности.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Растительный материал и условия выращивания

В работе использовали коммерческий сорт картофеля La Strada, предоставленный компанией “Дока – Генные Технологии” (Россия). Растения выращивали *in vitro* в пластиковых культуральных сосудах на питательной среде Мурасиге–Скуга (МС; Duchefa, Нидерланды) без фитогормонов, содержащей 30 г/л сахарозы и 7 г/л агара (рН 5.8), при $21 \pm 2^\circ\text{C}$ и 16-часовом фотопериоде в условиях искусственного освещения (40 мкмоль квантов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$)). Для генетической трансформации и регенерации растений в качестве эксплантов использовали сегменты междоузлий длиной 0.5–1 см 3–4-недельных растений *in vitro*. Среда для индукции адвентивной регенерации побегов состояла из минеральных солей и витаминов МС, дополненных 30 г/л сахарозы, 100 мг/л миоинозитола, 7 г/л агара (рН 5.8–5.9), 3 мг/л зеатин-рибозид (Sigma-Aldrich, США), 2 мг/л индолилуксусной кислоты (Sigma-Aldrich) и 1 мг/л гиббереллиновой кислоты (Sigma-Aldrich).

Агробактериальная трансформация растений картофеля без применения селективного отбора

Для генетической трансформации использовали штамм *Agrobacterium tumefaciens* AGL0, несущий вектор pWS-E1-Lhca3 для интерференционного сайленсинга генов *SteIF4E* [16]. Т-ДНК вектора содержала экспрессионную кассету hpRNA-SteIF4E, структура которой представляет собой инвертированные повторы фрагмента гена *SteIF4E1*, разделенные интроном гена *Strbcs1*, под контролем промотора и терминатора гена *StLhca3*, и не содержит селективные гены. Культуру агробактерий растили при 28°C в течение 16 ч в жидкой среде LB (Duchefa), содержащей 100 мг/л канамицина сульфата, после чего разбавляли жидкой средой МС до конечной оптической плотности 0.2 при длине волны 600 нм (OD_{600}). Свежесрезанные экспланты инокулировали агробактериями в течение 25–30 мин, подсушивали на фильтровальной бумаге и культивировали 3 сут в темноте при $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ на чашках Петри (9 см в диаметре), содержащих 25 мл среды для индукции регенерации. После этого экспланты переносили на свежую индукционную среду, дополненную 250 мг/л цефотаксима (“Биосинтез”, Россия). Регенерацию побегов проводили на свету (40 мкмоль квантов/($\text{м}^2 \cdot \text{с}$), 16-часовой фотопериод) при $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$ с субкультивированием каждые 2 недели. Отбор трансформированных растений проводили в соответствии с разработанным нами ранее ПЦР-протоколом [16, 22]. Образовавшиеся на эксплантах растения-регенеранты (1.5–3.0 см длиной) срезали и высаживали не более 10 регенерантов в один культуральный сосуд, содержащий 90 мл безгормональной среды МС с добавлением 250 мг/л цефотаксима для элиминации агробактерий и подрачивания растений.

ПЦР-анализ

После достижения растениями-регенерантами высоты 5–8 см из двух верхних листьев выделяли суммарную геномную ДНК с использованием набора для выделения ДНК из растительной ткани diaGene (“Диа-М”, Россия) согласно рекомендациям производителя. Наличие в геномной ДНК вставки Т-ДНК, содержащей последовательность hpRNA-SteIF4E, подтверждали методом ПЦР с использованием праймеров и условий, описанных нами ранее [16], и набора Encyclo Plus PCR kit (“Евроген”, Россия).

Количественная ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Тотальную РНК из листьев картофеля выделяли с помощью Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue kit (Bio-Rad, США). Первую цепь кДНК синтезировали из 2 мкг общей РНК с использованием обратной транскриптазы MMLV и олиго(dT)-прай-

мера (“Евроген”). Анализ экспрессии генов проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием смеси 5× qPCRmix-HS SYBR+LowROX (“Евроген”) на термоциклере QuantStudio™ 5 Cyler (Thermo Fisher Scientific, США), как описано ранее [16]. Нормализацию уровня накопления транскриптов генов *SteIF4E1* и *SteIF4E2* выполняли относительно уровня экспрессии гена *ef1α* картофеля. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD), рассчитанные на основании трех независимых биологических экспериментов с тремя аналитическими повторами.

Анализ ростовых характеристик и продуктивности растений

Десятидневные укорененные *in vitro* растения картофеля адаптировали к условиям зимней теплицы. После периода адаптации растения высаживали в 3-литровые горшки, наполненные смесью торфяного грунта (“Агробалт”, Россия) и перлита (“Завод минеральных удобрений”, Россия) в соотношении 10 : 1. Каждые 7 сут проводили подкормку неорганическим удобрением Акварин, NPK 16 : 16 : 16 (“Буйский химический завод”, Россия). В стадии начала бутонизации измеряли длину листа (длина черешка от точки его прикрепления к стеблю до верхушки главной доли листа), ширину трех основных долей листа и высоту растений. Через 90 сут после высадки растений в теплицу клубни выкапывали и анализировали их число, массу и общую урожайность с растения.

Заражение растений вирусом и анализ устойчивости

Заражение проводили штаммом PVY^O, выделенным из растений, растущих на полях ООО “Дока — Генные технологии” в Московской области (Россия). Для искусственной инокуляции 2.5 г листьев ранее инфицированных растений картофеля растирали в 10 мл фосфатного буфера (pH 7.4). В утренние часы инокулят (150 мкл) наносили на два листа среднего яруса (стадия 6–8 настоящих листьев) и растирали. Процедуру повторяли через 1 сут. Инокулировали 8 растений каждой линии. Через 20 сут после заражения анализировали аккумуляцию вируса в листьях растений.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Процедура ИФА подробно описана нами ранее [16]. Двойной сэндвич-вариант ИФА на основе антител к белку оболочки PVY выполняли с использованием набора LOEWE Biochemica GmbH (Sauerlach, Германия). Результаты детектировали на микропланшетном фотометре iMark Microplate (Bio-Rad) при длине волны 415 нм.

Статистический анализ

Экспериментальные данные анализировали с помощью программного обеспечения Statistica 10 (©StatSoft Inc.) с использованием дисперсионного анализа ANOVA с последующим применением теста Тьюки для выявления значимых различий между контролем и трансгенными линиями с пороговым значением $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия безмаркерной генетической трансформации исключает возможность использования каких-либо селективных соединений во время проведения эксперимента. По этой причине необходимо провести молекулярную оценку сотен регенерированных растений для выявления нескольких стабильных трансгенных событий. Ранее нами показано, что для сорта La Strada характерен средний срок образования адвентивных регенерантов при культивировании стеблевых эксплантов на регенерационных средах [23]. Именно поэтому во время неселективной генетической трансформации основная часть трансгенных побегов образуется в промежутке от 40 до 60 сут после агробактериальной инокуляции [23]. Основываясь на этих данных, мы удаляли все регенеранты, образовавшиеся на эксплантах в течение первых 40 сут после совместного культивирования с агробактериями. С целью уменьшить число *in vitro* манипуляций, связанных с культивированием большого числа растений, на 60 сутки мы одновременно отделили все растения-регенеранты, образовавшиеся на стеблевых эксплантах, и перенесли их на среду для размножения (рис. 1). Дальнейшую регенерацию растений из эксплантов не проводили — чтобы избежать потенциального дублирования трансгенных событий, а также сократить число образцов для молекулярно-генетического анализа. Всего получили 368 полноценных побегов в результате инокулирования 51 экспланта. Регенеранты выращивали группами по 9–10 шт. в пластиковых контейнерах до тех пор, когда становилось возможным собирать листовую ткань для выделения ДНК с сохранением жизнеспособности растений. Два верхних листа каждого растения-регенеранта изолировали в асептических условиях и смешивали в один образец для выделения суммарной ДНК растений, выращенных в одном культуральном сосуде (рис. 1). В результате ПЦР-анализа 38 образцов ДНК с использованием праймеров, специфичных к последовательности hpRNA-SteIF4E, обнаружен целевой фрагмент в двух единичных образцах ДНК (рис. 1).

С целью выявить отдельные трансгенные линии каждое растение, культивируемое в двух ПЦР+-сосудах, отсаживали и растили индивидуально для повторного выделения ДНК. Второй раунд ПЦР-

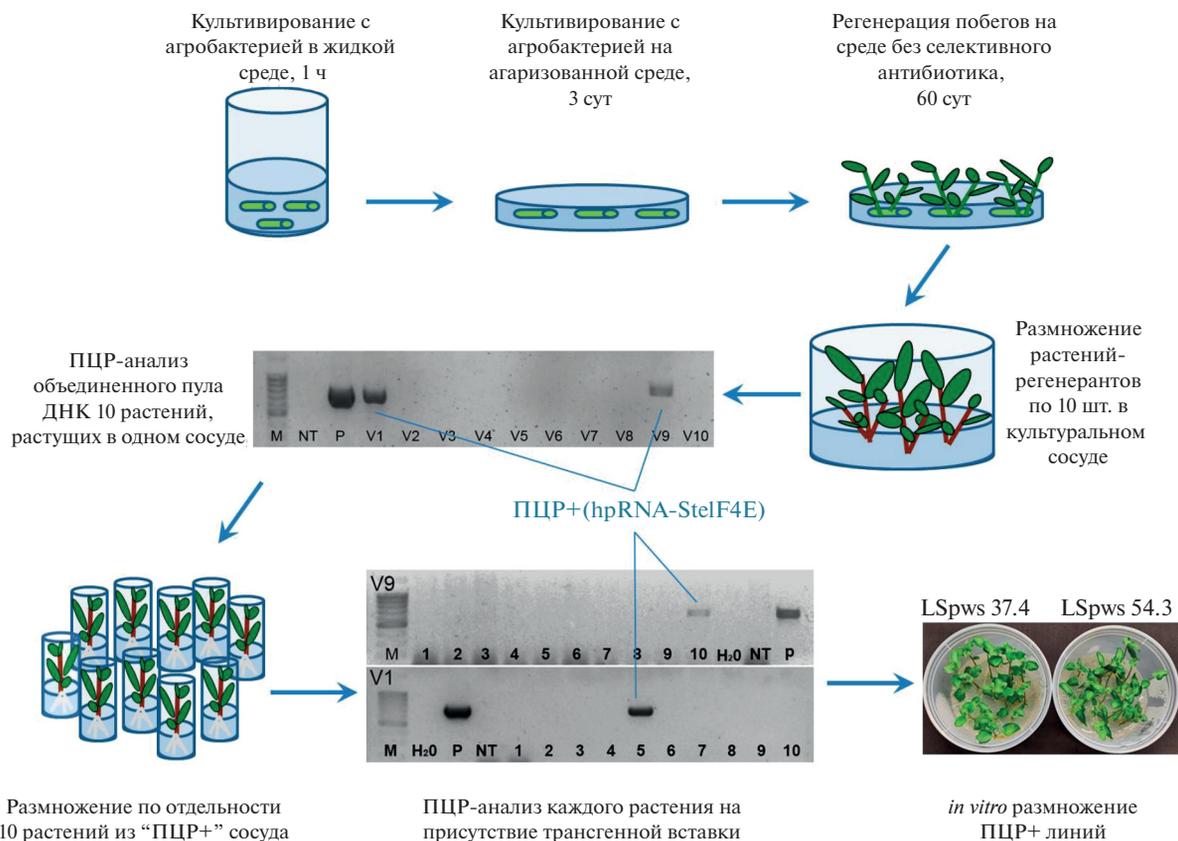


Рис. 1. Схема получения безмаркерных трансгенных растений картофеля сорта La Stada с использованием вектора pWS-E1-Lhca3. На электрофореграммах представлен ПЦР-анализ ДНК растений на присутствие фрагмента, соответствующего последовательности hpRNA-SteIF4E, где М – ДНК маркер 1000/10С (“diaGene”, Россия), NT – нетрансгенное растение, P – вектор pWS-E1-Lhca3, H₂O – ПЦР-смесь без ДНК-матрицы, V1–V10 – объединенный пул ДНК, выделенной из 10 растений-регенерантов, растущих в одном культуральном сосуде; 1–10 – ДНК индивидуальных растений-регенерантов.

Fig. 1. Generation of marker-free transgenic plants of potato cv. La Stada using the pWS-E1-Lhca3 vector. Electrophoregrams show PCR analysis of plant DNA for the presence of a region corresponding to hpRNA-SteIF4E. M, a DNA molecular mass marker 1000/10C (diaGene, Russia); NT, a non-transgenic plant; P, the pWS-E1-Lhca3 vector; H₂O, a PCR mixture without the DNA template; V1–V10, a combined pool of DNA isolated from 10 regenerated plants growing in the same culture vessel; 1–10, DNAs of individual regenerated plants.

анализа с использованием праймеров к последовательности hpRNA-SteIF4E, позволил идентифицировать среди 20 растений две трансгенные линии, обозначенные как LSpws 37.4 и LSpws 54.7 (рис. 1).

Эффективность генетической трансформации при неселективном отборе растений обычно рассчитывают относительно общего числа проанализированных растений, тогда как трансформацию с использованием селективных соединений определяют как долю эксплантов, образовавших трансгенные растения. Таким образом, эффективность проведенной нами безмаркерной трансформации картофеля La Strada составила 0.5% (2 трансгенные линии среди 368 растений-регенерантов). Заметим, что такой же процент трансгенных растений мы регистрировали и для сорта картофеля Pirol после трансформации тем же неселективным

вектором pWS-E1-Lhca3 [16]. В этих двух исследованиях мы практиковали выбраковку “ранних” и “поздних” регенерантов. Отличие заключалось лишь в том, что Pirol относится к медленно регенерирующим сортам, поэтому растения-регенеранты срезали несколько раз в период 55–70 сут после инокуляции агробактериями, тогда как для La Strada эту процедуру проводили единожды. Полученные нами данные согласуются с результатами других авторов [24, 25]. Это позволяет предположить, что трансформация картофеля со “слепым” безмаркерным отбором в меньшей степени зависит от генотипа по сравнению с протоколами с использованием антибиотиков.

Недавно нами показано [23], что при “полуслепом” методе отбора трансгенных растений по экспрессии зеленого флуоресцентного белка эффективность трансформации La Strada составля-

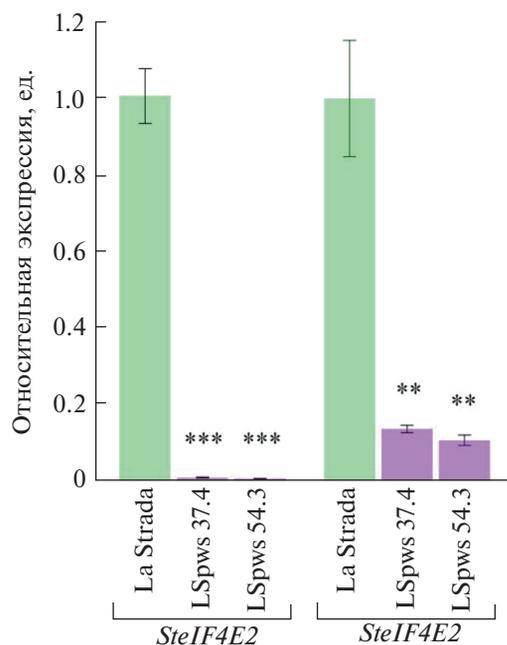


Рис. 2. Относительная экспрессия генов *SteIF4E1* и *SteIF4E2* в контрольных растениях La Strada и двух трансгенных линиях картофеля, LSpws 37.4 и LSpws 54.7, содержащих в геноме последовательность hpRNA-SteIF4E. Здесь и далее: данные представлены как среднее \pm SD, рассчитанные на основании 3 независимых экспериментов с 3 аналитическими повторами. Статистически значимые различия между контрольными растениями и трансгенными линиями согласно оценке ANOVA с последующим post-hoc тестом Тьюки: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$

Fig. 2. Relative expression of *SteIF4E1* and *SteIF4E2* genes in non-transgenic La Strada plants and two transgenic potato lines, LSpws 37.4 and LSpws 54.7, containing the hpRNA-SteIF4E construct in the genome. Hereinafter: data are presented as a mean \pm SD for three independent experiments with three analytical replicates. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, according to post-hoc testing ANOVA.

ла 2%, то есть выше, чем при “слепом” (0.5%). Различия в эффективности, скорее всего, обусловлены тем, что ранее мы анализировали все побеги, формирующиеся за время эксперимента (90 сут), часть из которых могла представлять собой дубликаты, образовавшиеся из одних и тех же трансгенных каллусов на поздних этапах регенерации. По данным проанализированной нами литературы, эффективность безмаркерной трансформации картофеля в различных исследованиях варьировала от 0.4 до 4.5% [24–26]. Результаты, полученные для сорта La Strada, в целом соответствуют значениям, описанным ранее. Варьирование эффективности выхода трансгенных растений в разных исследованиях обусловлено тем, что сорта картофеля в силу генетических особенностей отличаются как по эффективности регенерации (доля регенерирующих эксплантов), так и по числу сформированных растений за один и тот же период времени. Кроме того, в опублико-

ванных работах для стимуляции регенерации применяли различные комбинации фитогормонов, использовали различные генетические конструкции и разную продолжительность отбора растений-регенерантов [24–27].

Ранее нами показано [23], что при отборе на неселективной среде от 20 до 35% первоначально идентифицированных трансгенных растений картофеля представляют собой химеры, состоящие из трансгенных и нетрансгенных клеток. Наш опыт показывает, что необходимо не менее 10 последовательных пассажей, чтобы произошло “расхимирование” растений, которые в конечном итоге становятся либо полностью трансгенными, либо нетрансгенными.

После многократных пересадок *in vitro* мы выделили суммарную РНК из растений линий LSpws 37.4 и LSpws 54.7, чтобы не только убедиться в наличии последовательности hpRNA-SteIF4E в геноме растений, но и оценить ее функциональность. Переносимая экспрессионная кассета сконструирована для одновременного нокдауна двух гомологичных генов *eIF4E1* и *eIF4E2*. Подавление их эндогенной экспрессии подтверждает эффективную работу интегрированной последовательности hpRNA-SteIF4E. Анализ ОТ-ПЦР в реальном времени выявил значительное снижение уровня РНК-транскриптов с генов *SteIF4E1* и *SteIF4E2* в клетках линий LSpws 37.4 и LSpws 54.7 по сравнению с нетрансгенными растениями La Strada (рис. 2). В среднем эндогенный уровень экспрессии гена *SteIF4E1* в трансгенных линиях LSpws 37.4 и LSpws 54.7 оказался более чем в 70 раз ниже, чем в контрольных растениях, а уровень накопления транскриптов гена *SteIF4E2* снизился в 7–9 раз (рис. 2).

Высаженные в теплицу трансгенные растения линий LSpws 37.4 и LSpws 54.7 уже на ранних этапах роста фенотипически отличались от контрольных растений. Так, трансгенные линии отставали в росте и развитии (рис. 3a), при этом их листовая пластинка характеризовалась меньшими размерами, а доли листа – повышенной волнистостью (рис. 3b).

Высота растений на стадии бутонизации была ниже у трансгенных линий LSpws 37.4 и LSpws 54.7 на 16.9 и 27.7% по сравнению с контрольными растениями, а длина листового черешка – меньше на 20.5 и 41.8% соответственно. У линии LSpws 54.7 подавление экспрессии генов *SteIF4E* негативно отразилось на ширине трех верхних долей листа, тогда как для листьев растений линии LSpws 37.4 достоверных различий с нетрансгенными растениями не обнаружили (рис. 4).

Ранее нами показано, что подавление экспрессии генов *SteIF4E1* и *SteIF4E2* не оказывало негативного влияния на рост и развитие растений картофеля сорта Pirol [16]. В работе Н. Duan [5] также не было отмечено негативных плейотроп-

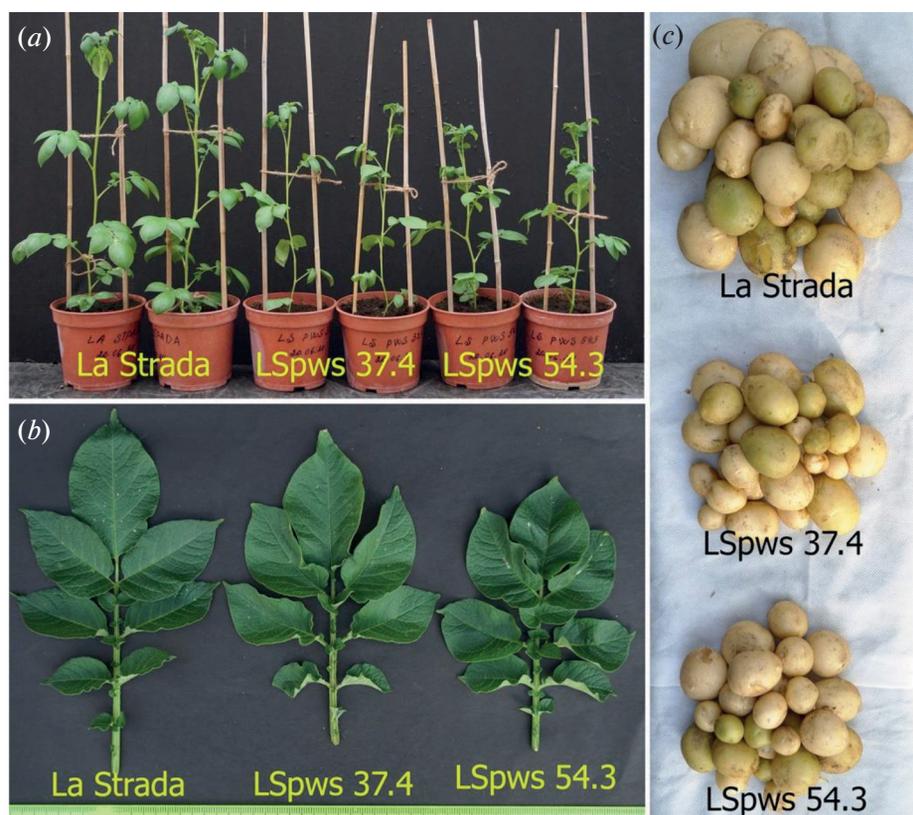


Рис. 3. Рост контрольных (La Strada) и трансгенных линий (LSpws 37.4 и LSpws 54.7) картофеля. *a* – Развитие растений *ex vitro*, общий вид через 35 сут после высадки в теплицу; *b* – типичные листья анализируемых растений, из среднего яруса; *c* – размер, форма и число клубней, собранных с 10 растений.

Fig. 3. Growth of control (La Strada) and transgenic lines (LSpws 37.4 and LSpws 54.7) of potato. *a* – Development of plants *ex vitro*, general view 35 days after planting in a greenhouse; *b* – typical leaves of the analyzed plants, from their middle part; *c* – size, shape and number of tubers collected from 10 plants.

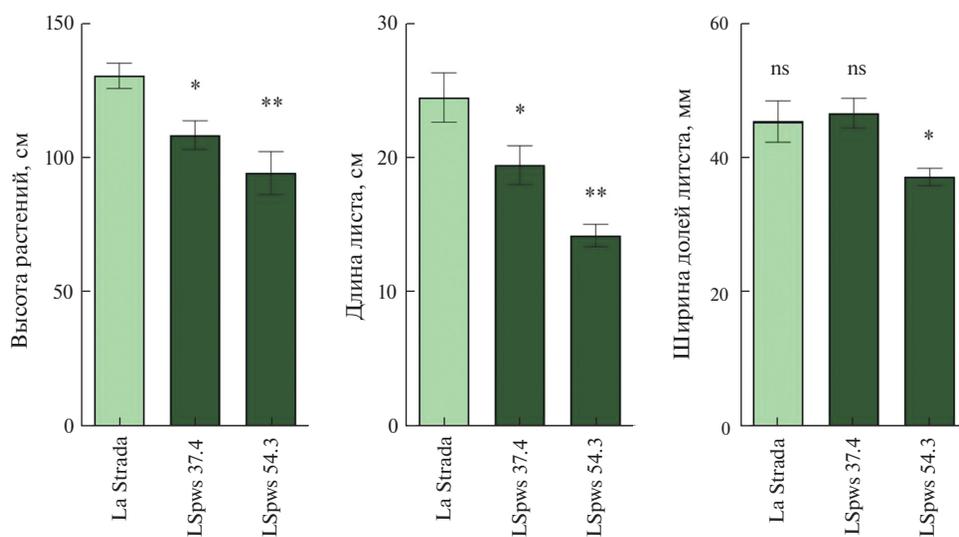


Рис. 4. Сравнительный анализ высоты растений, длины листа и ширины трех верхушечных долей листа в контрольной (La Strada) и трансгенных (LSpws 37.4 и LSpws 54.7) линиях картофеля. ns – нет различий при $p \leq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Fig. 4. Comparative analysis of plant height, leaf length and width of three apical leaf lobes in control (La Strada) and transgenic (LSpws 37.4 and LSpws 54.7) potato lines. ns – differences are not significant at $p \leq 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Таблица 1. Накопление PVY⁰ в листьях растений картофеля через 20 сут после инокуляции по результатам твердофазного иммуноферментного анализа с антителами к белку оболочки PVY

Table 1. Accumulation of PVY⁰ in leaves of potato plant 20 days after inoculation according to the results of ELISA with antibodies to the PVY coat protein

Образец	Инокуляция PVY ⁰	OD ₄₁₅
La Strada	–	0.04 ± 0.03
La Strada	+	0.64 ± 0.13
LSpws 37.4	+	0.06 ± 0.03
LSpws 54.3	+	0.07 ± 0.01

Примечание: Данные представлены как среднее ± SD, рассчитанные на основании 6 независимых экспериментов с 3 аналитическими повторами.

Note: Data are presented as mean ± SD calculated from 6 independent experiments with 3 analytical replicates.

ных эффектов у картофеля сорта Russet Burbank в результате интеграции конструкции для сайленсинга гена *SteIF4E* на основе его 286-нуклеотидного фрагмента. С другой стороны, у ряда растений, например томата и дыни, дефицит функциональной активности генов *SteIF4E* негативно влиял на рост и морфологию растений [10, 11].

Особенности работы генов инициации трансляции в различных сортах и видах могут быть основной причиной различного ответа трансгенных растений при сайленсинге того или иного гена

[4, 12]. Нельзя также не отметить, что подавление экспрессии целевых генов в трансгенных линиях LSpws 37.4 и LSpws 54.7 в результате переноса конструкции hpRNA-*SteIF4E* оказалось сильнее, чем в аналогичных линиях сорта PiroI [16]. Следствием этого может быть значительный функциональный дефицит факторов eIF4E1 и eIF4E2, что повлекло ощутимые негативные изменения в росте и развитии растений обеих трансгенных линий La Strada, а также их продуктивности. Несмотря на то, что в линии LSpws 54.7 несколько увеличилось число клубней, собранных с одного растения (3.3 против 2.9 в контроле), их общая масса снизилась у обеих трансгенных линий: в 2.2 для LSpws 54.7 и в 2.5 раза для LSpws 37.4, – а средний вес одного клубня – в 2.3 и 3 раза соответственно (рис. 5). Ранее было высказано предположение, что дефицит одной или нескольких изоформ факторов инициации трансляции растений (вследствие сайленсинга или нокаута) компенсируется более высокой экспрессией другого гомолога и не приводит к негативным плеiotропным эффектам [4, 12]. По-видимому, эта гипотеза “не работает” в случае сорта La Strada картофеля – такой компенсации мы не обнаружили.

В предварительных экспериментах нами показано, что La Strada относится к сортам картофеля с уровнем вирусоустойчивости выше среднего, при этом чувствительным к штамму PVY⁰. При заражении PVY⁰ мозаичность листьев наблюдали

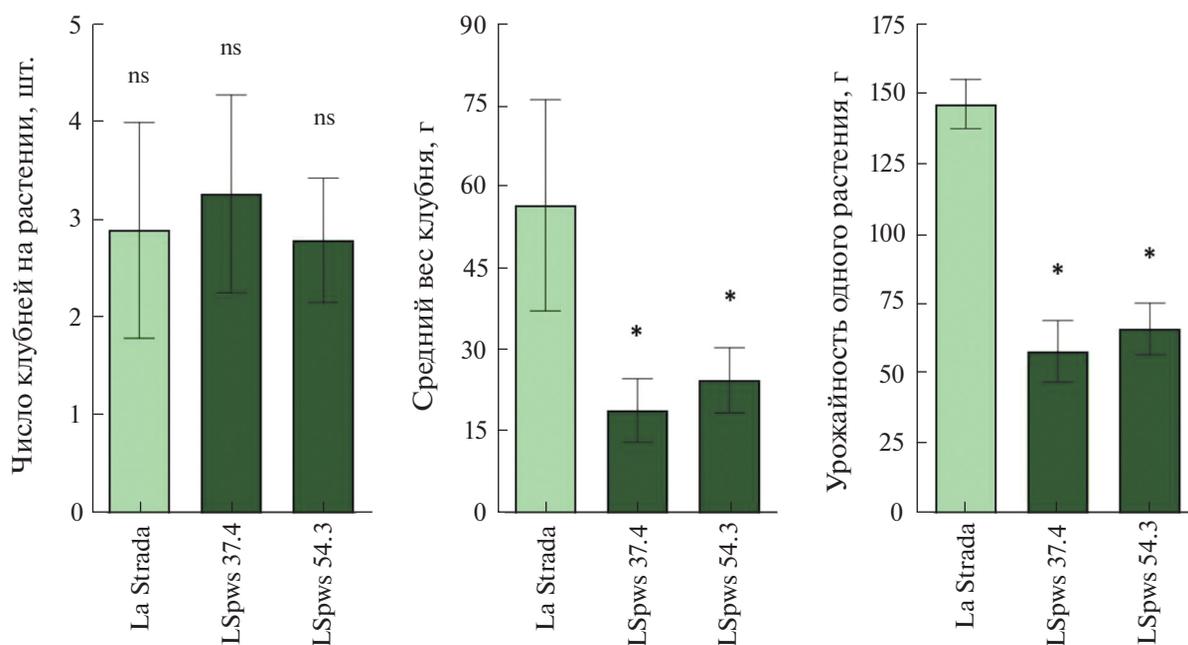


Рис. 5. Сравнительный анализ показателей урожайности контрольных (La Strada) и трансгенных (LSpws 37.4 и LSpws 54.7) линий картофеля. ns – нет различий при $p \leq 0.05$, * $p < 0.05$.

Fig. 5. Comparative analysis of yield indicators of control (La Strada) and transgenic (LSpws 37.4 and LSpws 54.7) potato lines. ns – differences are not significant at $p \leq 0.05$, * $p < 0.05$.

редко: только при плохом состоянии растений, в неоптимальных условиях выращивания. Тем не менее, как и у большинства неустойчивых сортов картофеля, в листьях La Strada регистрировали накопление вирусных частиц через 2–3 недели после экспериментального заражения (табл. 1). Как следует из данных, представленных на рис. 2, в полученных нами трансгенных линиях La Strada эффективная РНК-интерференция привела к сильному подавлению экспрессии целевых генов *SteIF4E*. Согласно результатам анализа на присутствие белка оболочки вируса в листьях контрольной и трансгенных линий картофеля (табл. 1) прослеживается влияние проведенного сайленсинга на чувствительность растений к PVY⁰-заражению, так как обе трансгенные линии оказались устойчивы к инокуляции. Таким образом, эффективный сайленсинг генов *SteIF4E1* и *SteIF4E2* позволил получить линии картофеля La Strada, резистентные к заражению PVY⁰.

Ранее Н. Duan и др. [5] сообщали, что нокадаун генов *SteIF4* в картофеле сорта Russet Burbank не приводил к увеличению устойчивости растений к заражению PVY, тогда как трансформация геном, представляющим собой мутантный вариант *SteIF4E*, позволила достичь приемлемой невосприимчивости к заражению этим вирусом. Для экспрессии целевых конструкций авторы использовали промотор вируса мозаики цветной капусты CaMV 35S. В отличие от Н. Duan и др. [5], в нашей работе конструкция hpRNA-*SteIF4E* для подавления экспрессии генов *SteIF4E* находилась под контролем промотора гена *StLhca3*, кодирующего хлорофилл a/b-связывающий белок светособирающего комплекса фотосистемы I. У картофеля этот промотор активен только в хлорофиллсодержащих тканях; при этом в листьях, ткани которых являются основной мишенью PVY, промотор гена *StLhca3* работает более эффективно, чем конститутивный промотор CaMV 35S [21].

В целом, результаты изменения функциональной активности генов *SteIF4E*, полученные нами на двух сортах картофеля, подтверждают пригодность использования технологии РНК-интерференции для подавления экспрессии генов *SteIF4E* с целью повышения устойчивости к PVY. Хотя создание генномодифицированных линий элитных сортов картофеля без использования селективных маркерных генов менее эффективно, чем при генетической трансформации с маркерами, отсутствие чужеродных последовательностей в геномах растений, предназначенных для пищевой промышленности, расширяет перспективы их дальнейшей реализации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00118).

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

В работе не использованы животные в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lacomme C., Jacquot E. General characteristics of potato virus Y (PVY) and its impact on potato production: an overview. In: *Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management*. Eds Lacomme C., Glais L., Bellstedt D.U., Dupuis B., Karasev A.V., Jacquot E. Cham: Springer International Publishing, 2017, 1–19. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5_1
2. Lacomme C., Pickup J., Fox A., Glais L., Dupuis B., Steinger T., Rolot J.-L., Valkonen J.P.T., Kruger K., Nie X., Modic S., Mehle N., Ravnkar M., Hullé M. Transmission and epidemiology of potato virus Y. In: *Potato Virus Y: Biodiversity, Pathogenicity, Epidemiology and Management*. Eds Lacomme C., Glais L., Bellstedt D.U., Dupuis B., Karasev A.V., Jacquot E. Cham: Springer International Publishing, 2017, 141–176. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58860-5_6
3. Dupuis B., Nkuriyigoma P., Ballmer T. Economic impact of potato virus Y (PVY) in Europe. *Potato Res.*, 2024, 67(1), 55–72. <https://doi.org/10.1007/s11540-023-09623-x>
4. Zlobin N., Taranov V. Plant *eIF4E* isoforms as factors of susceptibility and resistance to potyviruses. *Front. Plant Sci.*, 2023, 14, 1041868. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1041868>
5. Duan H., Richael C., Rommens C.M. Overexpression of the wild potato *eIF4E-1* variant *Eva1* elicits potato virus Y resistance in plants silenced for native *eIF4E-1*. *Transgenic Res.*, 2012, 21(5), 929–938. <https://doi.org/10.1007/s11248-011-9576-9>
6. Zhang C., Zarka K.A., Zarka D.G., Whitworth J.L., Douches D.S. Expression of the tomato *pot-1* gene confers potato virus Y (PVY) resistance in susceptible potato varieties. *Am. J. Potato Res.*, 2021, 98(1), 42–50. <https://doi.org/10.1007/s12230-020-09815-y>
7. Cavatorta J., Perez K.W., Gray S.M., van Eck J., Yeam I., Jahn M. Engineering virus resistance using a modified potato gene. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, 9(9), 1014–1021. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00622.x>
8. Arcibal E., Morey Gold K., Flaherty S., Jiang J., Jahn M., Rakotondrifara A.M. A Mutant *eIF4E* confers resistance to Potato virus Y strains and is inherited in a dominant manner in the potato varieties Atlantic and Russet Norkotah. *Am. J. Potato Res.*, 2016, 93(1), 64–71. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9489-x>

9. Takakura Y., Udagawa H., Shinjo A., Koga K. Mutation of a *Nicotiana tabacum* L. eukaryotic translation-initiation factor gene reduces susceptibility to a resistance-breaking strain of potato virus Y. *Mol. Plant Pathol.*, 2018, 19(9), 2124–2133. <https://doi.org/10.1111/mpp.12686>
10. Mazier M., Flamain F., Nicolai M., Sarnette V., Caranta C. Knock-down of both *eIF4E1* and *eIF4E2* genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS One*, 2011, 6(12), e29595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029595>
11. Rodríguez-Hernández A.M., Gosalvez B., Sempere R.N., Burgos L., Aranda M.A., Truniger V. Melon RNA interference (RNAi) lines silenced for Cm-*eIF4E* show broad virus resistance. *Mol. Plant Pathol.*, 2012, 13(7), 755–763. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00785.x>
12. Rubio J., Sánchez E., Tricon D., Montes C., Eyquard J.-P., Chague A., Aguirre C., Prieto H., Decroocq V. Silencing of one copy of the translation initiation factor *eIFiso4G* in Japanese plum (*Prunus salicina*) impacts susceptibility to plum pox virus (PPV) and small RNA production. *BMC Plant Biol.*, 2019, 19(1), 440. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2047-9>
13. Le Gao, Luo J., Ding X., Wang T., Hu T., Song P., Zhai R., Zhang H., Zhang K., Li K., Zhi H. Soybean RNA interference lines silenced for *eIF4E* show broad potyvirus resistance. *Mol. Plant Pathol.*, 2020, 21(3), 303–317. <https://doi.org/10.1111/mpp.12897>
14. Rupp J.S., Cruz L., Trick H.N., Fellers J.P. RNAi-mediated silencing of endogenous wheat genes *EIF(Iso)4E-2* and *EIF4G* induce resistance to multiple RNA viruses in transgenic wheat. *Crop Sci.*, 2019, 59(6), 2642–2651. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.08.0518>
15. Mourenets L., Pushin A., Timerbaev V., Khmelniitskaya T., Gribkov E., Andreev N., Dolgov S. Effect of gene silencing of translation initiation factors eIF(iso)4G and eIF(iso)4E on sour cherry rootstock resistance to Sharka disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 24(1), 360. <https://doi.org/10.3390/ijms24010360>
16. Miroshnichenko D., Timerbaev V., Okuneva A., Klementyeva A., Sidorova T., Pushin A., Dolgov S. Enhancement of resistance to PVY in intragenic marker-free potato plants by RNAi-mediated silencing of eIF4E translation initiation factors. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2020, 140(3), 691–705. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01746-9>
17. Callot C., Gallois J.L. Pyramiding resistances based on translation initiation factors in *Arabidopsis* is impaired by male gametophyte lethality. *Plant Signal. Behav.*, 2014, 9(2), e27940. <https://doi.org/10.4161/psb.27940>
18. Hoffie R.E., Otto I., Perovic D., Budhagatapalli N., Habekuß A., Ordon F., Kumlehn J. Targeted knockout of eukaryotic translation initiation factor 4E confers Bymovirus resistance in winter barley. *Front. Genome Ed.*, 2021, 3, 784233. <https://doi.org/10.3389/fgeed.2021.784233>
19. Fidan H., Calis O., Ari E., Atasayar A., Sarikaya P., Tek M.I., Izmirli A., Oz Y., Firat G. Knockout of *eIF4E* using CRISPR/Cas9 for large-scale production of resistant cucumber cultivar against WMV, ZYMV, and PRSV. *Front. Plant Sci.*, 2023, 14, 1143813. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1143813>
20. Jung J., Yeam I. (2013) Exploring natural variations in *eIF4E* and screening for potyviral resistance in diverse *Nicotiana* species. *Hortic Environ. Biotechnol.*, 2013, 54(5), 430–440. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0045-7>
21. Miroshnichenko D., Firsov A., Timerbaev V., Kozlov O., Klementyeva A., Shaloiko L., Dolgov S. Evaluation of plant-derived promoters for constitutive and tissue-specific gene expression in potato. *Plants*, 2020, 9(11), 1520. <https://doi.org/10.3390/plants9111520>
22. Holme I.B., Wendt T., Holm P.B. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. *Plant Biotechnol. J.*, 2013, 11, 395–407. <https://doi.org/10.1111/pbi.12055>
23. Miroshnichenko D., Klementyeva A., Sidorova T., Pushin A.S., Dolgov S. Genetic transformation of potato without antibiotic-assisted selection. *Horticulturae*, 2024, 10(3), 222. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10030222>
24. Vetten N. de, Wolters A.-M., Raemakers K., van der Meer I., ter Stege R., Heeres E., Heeres P., Visser R. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nat. Biotechnol.*, 2003, 21(4), 439–442. <https://doi.org/10.1038/nbt801>
25. Jo K.-R., Kim C.-J., Kim S.-J., Kim T.-Y., Bergervoet M., Jongtsma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnol.*, 2014, 14, 50. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-50>
26. Ahmad R., Kim Y.-H., Kim M.D., Phung M.-N., Chung W.-I., Lee H.-S., Kwak S.-S., Kwon S.-Y. Development of selection marker-free transgenic potato plants with enhanced tolerance to oxidative stress. *J. Plant Biol.*, 2008, 51(6), 401–407. <https://doi.org/10.1007/BF03036060>
27. Bai Y., Guo Z., Wang X., Bai D., Zhang W. Generation of double-virus-resistant marker-free transgenic potato plants. *Prog. Nat. Sci.*, 2009, 19(5), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.08.005>

***SteIF4E* Silencing Increases Resistance of Potato cv. La Strada to Potato Virus Y, with Pleiotropic Effects on Plant Growth and Productivity**

D. N. Miroshnichenko^{a, b, #}, A. A. Okuneva^c, T. N. Sidorova^a, V. R. Timerbaev^{a, b},
V. V. Alekseeva^a, A. S. Pushin^{a, b}, and S. V. Dolgov^{a, b}

^aBranch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow oblast', Pushchino, 142290 Russia

^bAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

^cDoka – Gene Technology Ltd, Moscow oblast', Rogachevo, 141880 Russia

[#]e-mail: miroshnichenko@bibch.ru

Abstract—The creation of potato cultivars with resistance to virus Y (PVY) will allow one to solve successfully the problems of yield losses of this important vegetable and industrial agricultural crop. For replication and systemic spread, PVY recruits the translational apparatus of potato cells by interacting with host eIF4E translation initiation factors. By reducing the expression of genes encoding plant eIF4E, it is possible to limit the potyvirus replication in the host cell and further spread. Here, the production of potato cv. La Strada plants with inhibition of *SteIF4E1* and *SteIF4E2* gene expression through the use of RNA-interference technology is described. As a result of transformation with the marker-free expression cassette consisting of potato gene fragments (promoter and terminator of *StLhca3* gene, two inverted repeats of *SteIF4E1* gene separated by the *Strbcs1* intron), transgenic lines with a high degree of suppression of target genes were obtained. Downregulation of *SteIF4E1* and *SteIF4E2* expression resulted in stunted growth and reduced overall productivity of potato plants and, at the same time, stable resistance to PVY infection. The use of a marker-free strategy in genetic transformation ensured the production of virus-resistant potato lines without inserting foreign reporter genes into their genome, which is extremely important from the point of view of environmental safety and public acceptance of genetically modified agricultural crops.

Keywords: *Solanum tuberosum* L., potato virus Y, resistance, RNA interference, *eIF4E1*, genetically engineered plants