

СОЗДАНИЕ УСТОЙЧИВЫХ К ВИРУСУ ШАРКИ КОСТОЧКОВЫХ КУЛЬТУР БИОИНЖЕНЕРНЫМИ МЕТОДАМИ

Т.Н. Сидорова^{1,2}, В.Р. Тимербаев^{1,2,3}, Л.Ю. Муринец¹, О.А. Шульга³, А.С. Пушкин^{1,3}, А.П. Фирсов^{1,3},
С.В. Долгов^{1,2,3}

¹ Институт биорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Филиал),
Московская обл., Россия

² Никитский ботанический сад-Национальный научный центр, г. Ялта, Крым

³ Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, Россия

В последние годы вирус оспы сливы (PPV), возбудитель болезни Шарка, стал главной угрозой для выращивания косточковых плодовых растений. Этот вирус нанес огромный экономический ущерб и вызвал значительное уменьшение производственных площадей. Вирус оспы сливы распространился по всему миру и классифицирован карантинными службами растений как наиболее опасный патоген для абрикосов, слив и персиков. За последние 10–15 лет он зафиксирован на большинстве косточковых плодовых культурах в южных регионах стран СНГ [Митрофанова и др., 2001, 2009]. В настоящее время наука не может предложить никаких способов лечения вирусных заболеваний растений, а уничтожение зараженных деревьев остается единственным способом сдерживания распространения вирусов.

Современная биотехнология включает несколько подходов для повышения устойчивости растений к вирусным патогенам. В настоящее время наибольшее распространение получило использование вирусных генов или их фрагментов для придания PDR – (pathogen-derived resistance) устойчивости к вирусным заболеваниям (Lomonosoff G.P. 1995). При этом в геном растения встраивается вирусный ген в прямой или обратной ориентации (косупрессия или антисенс-технология), либо шпилечная конструкция, содержащая самокомплементарные фрагменты трангена, разделенные интроном (технология РНК-интерференции) (Agrawal N et al., – 2003. Baulcombe D.C. 2001, Beachy, R.N. et al., 1990). Ранее получение трансгенных сортов косточковых культур тормозилось отсутствием надежных методик, способных обеспечить достаточно высокую частоту регенерации ее побегов *in vitro*, поэтому большинство работ проводилось с использованием материалов зародышевого происхождения, что не позволяло сохранить исходные сортовые характеристики. Но к настоящему времени в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений “Биотрон”, ФИБХ РАН разработана методика регенерации растений из соматических тканей сливы домашней (*Prunus domestica* L.), и подвоев косточковых культур, что позволило получить трансгенные растения сорта “Стартовая” и подвоев «Элита» и 1–146 с сохранением исходного генотипа сорта.

С использованием вектора для РНК-интерференционного ингибирования вируса возбудителя Шарки сливы (PPV) получены пять независимых трансгенных растений (RNAi-1, RNAi-2, RNAi-3, RNAi-4, RNAi-6) *Prunus domestica* L. районированного сорта «Стартовая». Трансгенные линии сливы были инфицированы вирусом Шарка (PPV-M) путем окулировки почками, взятых с зараженных растений. После пяти лет культивирования в условиях теплицы все растения показали высокую степень устойчивости к данному вирусу, что также подтверждено с помощью молекулярно-биологических и иммунологических методов (ОТ-ПЦР, DAS-ELISA, Вестерн блоттинг, ImmunoStrip тест). Результаты работы показывают, что использование метода РНК-интерференции позволяет получать трансгенные растения сливы со стабильной устойчивостью к вирусным заболеваниям.

В целях изучения возможности использования позитивной селекции на основе гена фосфоманнозизомеразы (*pmi*) в создании трансгенных растений плодовых культур, свободных от селективных генов устойчивости к антибиотикам и/или гербицидам растения разработана эффективная система агробактериальной трансформации листовых эксплантов сливы (*Prunus domestica* L.) с использованием маннозы как селективного агента, позволяющая сохранить исходные сортовые качества растений сливы сорта Стартовая были трансформированы штаммом *A. tumefaciens* CBE21 несущим вектор pNOV35SGFP. Листовые экспланты были помещены на питательную среду содержащую различные концентрации и комбинации маннозы и сахарозы для разработки эффективной системы селекции. Девять трансгенных независимых линий растений сливы были получены на питательной среде содержащей 2 % сахарозы и 1,5 % маннозы. Наибольшая частота трансформации (1,4 %) наблюдалась при использовании отсроченной схемы селекции.

Начиная с первых дней после трансформации и заканчивая регенерацией побегов из трансгенного каллуса проводили мониторинг отбора трансгенных клеток с использованием GFP флуоресценции. Интеграция трансгенов *mapA* и *gfp* была подтверждена с помощью PCR анализов. Для определения копийности, геномная ДНК трансгенных растений и растений исходного сорта была обработана *HindIII* и проанализирована Саузерн блоттингом анализом. Описанная методика трансформации с использованием позитивной *mapA* системы является альтернативным методом для безопасного получения трансгенных растений сливы без селекции на антибиотиках и гербициде, а использование листовых эксплантов позволяет сохранять сортовые характеристики растений сливы.

Для проведения молекулярно-биологического анализа и оценки уровня экспрессии репортерного гена GFP в растениях сливы трансформированных конструкциями обеспечивающими локализацию гетерологичного белка в различных компартментах клетки (вакуоль, эндоплазматический ретикулум, цитозоль) использовали культивируемые в условиях защищенного грунта растения сливы домашней трансформированные векторами pNOV35SGFP, pCam35SGFP и pGAGFP-AFVY содержащими гены, кодирующие разные формы GFP. Известно, что за внутриклеточную локализацию белка отвечают сигнальные пептиды, входящие в аминокислотную последовательность. Так, в векторе pCam35SGFP химерный ген GFP включал последовательности, кодирующие N-концевой сигнальный пептид из хитиназы арабидопсиса и C-концевой тетрапептид HDEL для локализации продукта экспрессии в эндоплазматическом ретикулуме (ретикулярная форма GFP). В векторе pGAGFP-AFVY химерный ген GFP включал последовательности, кодирующие N-концевой сигнальный пептид из хитиназы арабидопсиса и C-концевой сигнальный пептид AFVY из фазеолина фасоли, обеспечивающий накопление белка в вакуолях (вакуолярная форма GFP). В векторе pNOV35SGFP ген GFP не включал (кодировал) сигнальные последовательности (цитозольная форма GFP). Во всех векторах использовали кодон-оптимизированный для экспрессии в растениях ген GFP под контролем CaMV 35S промотора.

В ходе работы показано влияние компартиментализации продуктов экспрессии гетерологичных генов на примере репортерного гена GFP на уровень экспрессии зеленого флуоресцирующего белка. Полученные результаты продемонстрировали возможность использования лидерных последовательностей из генетически отдаленных видов растений для генетической трансформации сливы. При сравнении трансгенных линий сливы результаты показали визуально детектируемые различия в уровне экспрессии гена GFP. Линии с цитозольной формой GFP (особенно) линия #9 имели более высокий уровень экспрессии GFP по сравнению с линиями с вакуолярной и ретикулярной формами GFP. При этом интенсивность флуоресценции GFP в листьях растений сливы коррелировала с уровнем накопления белка GFP). Также было отмечено, что уровень экспрессии GFP сильно варьировал между линиями, содержащими ген, кодирующий одну и ту же форму GFP.

На основе разработанных ранее протоколов индукции морфогенеза на листовых тканях клоновых подвоев абрикоса АП и № 146–2 (L.Y. Mourenets and S.V. Dolgov, 2016) проводились исследования по разработке способов их генетической трансформации. В качестве исходного материала был выбран подвой № 146–2, как более широко используемый в промышленных насаждениях и демонстрирующий лучшую регенерационную способность. Для проведения генетической трансформации использовался обезоруженный супервирулентный агробактериальный штамм CBE 21, несущий бинарный вектор pBINmGFP5ER, содержащий гены *gfp* (репортерный ген) и *nptII* (ген устойчивости к канамицину).

Первые регенеранты появлялись через 3 недели после трансформации, были как экспрессирующие GFP, так и не проявлявшие экспрессию побегов. Предположительно, GFP-отрицательные регенеранты не являются трансгенами, но способны расти на эксплантах с трансгенными клетками (GFP-положительными каллусами).

Проведена генетическая трансформация клонового подвоя сливы Элита векторной конструкций CamPPVRNAi. В результате получили две независимые трансгенные линии. Частота трансформации клонового подвоя сливы в среднем составила 0.5 %. Укорененные трансгенные побеги успешно адаптировались к условиям защищенного грунта. Проведено заражение трансгенных растений сливового подвоя «Элита» (линия RNAi-1, полученных в результате трансформации вектором CamPPVRNAi) проводили методом окулировки почками, взятыми с растений сливы инфицированными вирусом Шарки. в августе 2017 года в условиях зимней теплицы.

Окулировку почками, взятыми с растений сливы инфицированными вирусом PPV (серотип М), проводили в период активного сокодвижения растений. Одновременно с трансгенными растениями проводили заражение вирусом контрольных нетрансгенных растений подвоя «Элита». Все привитые почки прижились, часть из них образовали побеги, которые будут являться постоянным источником вируса, что позволило оценить эффективность перенесенной шпильчатой кассеты для придания устойчивости к вирусу Шарки.

Визуальная оценка трансгенных и нетрансгенных растений сливового подвоя «Элита» показала развитие симптомов вируса Шарка, таких как хлоротичные пятна и кольца на листьях, а также наличие деформации листовой пластинки на листьях контрольных растений и на листьях побегов, проросших из зараженных почек, привитых на трансгенные растения. В то же время на трансгенных растениях в течение всего времени наблюдения визуальные симптомы болезни Шарка не проявлялись. Проведенный одновременно с визуальными наблюдениями иммуноферментный анализ (ИФА) на присутствие белка оболочки вируса PPV в тканях трансгенных и нетрансгенных растений инокулированных вирусом полностью подтвердил результаты визуальной диагностики. В трансгенных растениях сливы белок оболочки вируса не был обнаружен, тогда как во всех контрольных нетрансгенных инокулированных растениях, а также в проросших прививках, белок оболочки вируса PPV присутствовал.

Создана кассета экспрессии на основе фрагментов генома вируса Шарки для генерирования РНК интерференции в полученных растениях, в том числе с использованием системы рекомбинации для создания цисгенных растений, не содержащих генов селективных антибиотиков. В дальнейшей работе будет использован вектор с индуцируемой гомологичной рекомбинацией для создания растений, не содержащих генов селективных антибиотиков MF2 имеющий дополнительный селективный ген *hpt*, обеспечивающий устойчивость к антибиотику гигромицину.

В дальнейшем для создания косточковых культур, устойчивых к вирусу PPV, было решено применить подход РНК-интерференционного ингибирования генов трансляционных факторов растения-хозяина. Известно, что эукариотические факторы инициации трансляции являются детерминантами устойчивости растений против восприимчивости к потивирусам. Белок eIF4E связывается с 5'-структурой мРНК и является ключевым звеном при инициации биосинтеза белка. eIF4E ассоциирован с eIF4G, вместе они формируют комплекс eIF4F. eIF4G – поддерживающий, структурный белок осуществляющий взаимодействие между другими факторами инициации. Последовательности ДНК промоторов, интронов и терминаторов были амплифицированы с геномной ДНК подвоя персика. Последовательности генов факторов инициации трансляции амплифицированы с кДНК сорта Родзинка. Все версии промоторов, а также терминаторов взяты с последовательностями 5'- и 3'-нетранслируемых регионов соответственно, поскольку их присутствие способно значительно увеличить уровень экспрессии. В качестве спейсера между плечами «шпильки» использованы интроны генов ACO2 и RBCS персика длиной 178 и 371 п.н. соответственно. Способность к сплайсингу проверена по базам онлайн.

РНК-интерференционные кассеты были собраны в векторе pUCXB1 (pUC18 с добавленными сайтами рестрикции). Векторы были так спроектированы по типу «конструктора» таким образом, чтобы все сайты, использованные для клонирования, остались целыми сохранили свою уникальность после последнего шага клонирования, и их можно было затем использовать для замены тех или иных элементов. Все стыки фрагментов генов в конструкциях содержат лишь по одному 6-членному палиндрому без дополнительного генетического «мусора» и остатков полилинкеров.

Проведена агробактериальная трансформация сорта сливы «Стартовая» векторной конструкцией pMF2-TFRNAi6' (R10-4isoE). Вектор сконструирован на основе системы pMF2, с удаляемыми селективными маркерами устойчивости к гигромицину, а также содержит интерференционные шпильчатые последовательности, комплементарные гену транскрипционного фактора 4isoE косточковых культур. Анализ ДНК, выделенной из листовых тканей этих побегов, подтвердил перенос гена устойчивости к антибиотику в геном полученных линий. Дальнейший анализ показал, что полноразмерная последовательность экспрессионной кассеты pMF2 присутствует в одной из изучаемых линий. Это открывает возможность исследовать изменение устойчивости к вирусу PPV у плодовых косточковых культур.

Также проведена агробактериальная генетическая трансформация сливового и абрикосового клонового подвоя 146–2. Для переноса использовался обезоруженный супервирулентный штамм агробактерий *A.tumefaciens* CBE21, содержащий вектор pMF1-R6–4isoG с селективным маркерным геном неомицин-фосфотрансферазы (*nptII*) и кассету интерференционного ингибирования целевых генов трансляционных факторов на основе фрагментов гена *eIF4isoG*.

В результате экспериментов получено 6 трансгенных линий, частота трансформации составила 0.35–0.69 %. Из линий была выделена тотальная ДНК с помощью набора реактивов ThermoScientific для выделения и очистки геномной ДНК и проведен ПЦР-анализ на наличие гена *nptII* и целевых генов.

Полученные линии подтвердили свой трансгенный статус и были укоренены на среде $\frac{1}{2}$ MS, содержащей 20 г./л сахарозы, витамины MS, 0.5 мг/л ИМК и 30 мг/л канамицина. После адаптивного периода укорененные растения были выданы в теплиц. Линия с переносом всех генов, полученная первой, была привита путем окулировки материалом от зараженного вирусом Шарки растения (слива, сорт Стартовая). С началом вегетации будет проведен анализ привитых растений (9 растений трансгенной линии и 5 контрольных растений) на наличие у них симптомов и вирусного агента в растительных тканях. Таким образом, будет проведена оценка устойчивости трансгенных растений к вирусу Шарки.

В дальнейшем предполагается разработать эффективную методику генетической трансформации как подвоев, так и сортов абрикоса и получить устойчивые к вирусу Шарки сливы формы в том числе и с использованием технологии элиминации маркерных генов.

Для редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9 необходимо подобрать и оценить функциональность гидовых РНК, комплементарных участкам гена-мишени. Обязательным условием для выбора потенциальной гидовой РНК является наличие прилегающего к протоспейсеру РАМ мотива 5'-NGG-3'. Для выбранных участков генов *eIFiso4E* и *eIFiso4G* по этому критерию удалось обнаружить более 40 мест посадки гидовой РНК. Помимо присутствия РАМ мотива для выбора эффективных гидовых РНК необходимо учитывать достаточно обширный набор факторов и правил, описывающих GC состав, последовательность, прилегающую к РАМ, наличие повторяющихся нуклеотидов, консерватизм по отношению к другим аллельным вариантам гена, и один из самых важных критериев – присутствие в геноме косточковых «ложных» мишеней. После тщательного анализа потенциальных гидовых РНК с учетом всех вышеперечисленных факторов удалось отобрать по 10 последовательностей для генов трансляционных факторов. Двадцать плазмид с уникальными последовательностями гидовых РНК были наработаны, очищены и проверены рестрикционным анализом. После секвенирования эти векторы использованы для *in vitro* транскрипции гидовых РНК и анализа эффективности выбранных последовательностей в экспериментах с белком Cas9 и субстратом, содержащем фрагмент гена-мишени. В качестве таковых выступили промежуточные векторы, созданные на предыдущих этапах работ при создании плазмид для получения интра-генных растений косточковых с помощью технологии РНК интерференции.

Эксперименты по расщеплению векторов с генами-мишенями белком Cas9 позволили определить наиболее эффективно работающие гидовые РНК. Для каждого гена были отобраны по 3 РНК, в присутствии которых происходит внесение разрывов с эффективностью более 50 %. Эти гидовые РНК в дальнейшем будут использованы для редактирования геномов косточковых культур и получению, в конечном итоге, устойчивых к вирусу оспы сливы растений.

ЛИТЕРАТУРА

Sidorova T, Mikhailov R, Pushin A, Miroshnichenko D, Dolgov S. Agrobacterium-mediated Ttransformation of Russian commercial plum cv “Startovaya”. *Front Plant Sci* (2019), 10.286

Sidorova T, Pushin A, Miroshnichenko D, Dolgov S. Generation of transgenic rootstock plum ((*Prunus pumila* L. P. *salicina* Lindl.) (P. *cerasifera* Ehrh.)) using hairpin-RNA construct for resistance to the plum pox virus. *Agronomy (Basel)* (2018), 8 (1).

Sidorova T, Mikhailov R, Pushin A, Miroshnichenko D, Dolgov S. A non-antibiotic selection strategy uses the phosphomannose-isomerase (PMI) gene and green fluorescent protein (GFP) gene for Agrobacterium-mediated transformation of *Prunus domestica* L. leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* (2017), 128 (1) 197–209.

Mourenets, L.Y. and Dolgov, S.V. (2016). Adventitious shoot regeneration from leaf explants of two apricot rootstocks. *Acta Hort.* 1139, 285–290

Sidorova, T.N., Vagapova, T.I. and Dolgov, S.V. (2016). Intron-hairpin-RNA construct provides stable resistance to Plum pox virus in plum cultivar ‘Startovaja’. *Acta Hort.* 1110, 197–202