

TRANSFORMACIJA KROMPIRJA SORTE 'IGOR' ZA VNOS REZISTENCE NA VIRUS PVY^{NTN} - REZULTATI LONČNIH POSKUSOV

Jana ŽEL¹, Darja STANIČ², Tina DEMŠAR³, Borut ŠTRUKELJ⁴, Hugh BARKER⁵

^{1,2,3} Nacionalni Inštitut za biologijo, Ljubljana, ⁴Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana
⁵ Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Velika Britanija

IZVLEČEK

Bolezen obročkasta nekroza gomoljev krompirja, ki jo povzroča virus PVY^{NTN}, je ena najhujših boleznih krompirja, ki se je pojavila v zadnjih letih. Med drugimi je prizadela tudi eno najbolj priljubljenih sort krompirja v Sloveniji - sorto 'Igor'. S pomočjo transformacije rastlin in vnosa virusnih genov smo želeli vzgojiti rastline sorte 'Igor' odporne na virus PVY^{NTN}. Z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* smo v rastline vnesli gen, ki kodira plaščni protein virusa PVY^{NTN} ali pa enak gen s premaknjenim bračnim okvirjem, ki zato kodira nefunkcionalni protein. Pridobljene transformirane linije smo testirali na odpornost na virus z mehansko inokulacijo in z metodo cepljenja. Opazovali smo pojavljanje simptomov na listih in gomoljih ter zastopanost ali nezastopanost virusa potrdili z ELISA testom. Pri treh linijah na listih in gomoljih po mehanski inokulaciji nismo opazili simptomov. Ena od teh transformiranih linij kaže odpornost tudi pri bolj invazivni metodi cepljenja. V postopku testiranja so še nadaljne transformirane linije.

Ključne besede: krompir, odpornost, plaščni protein, PVY^{NTN}, *Solanum tuberosum*, transformacija

ABSTRACT

TRANSFORMATION OF POTATO CV. IGOR FOR RESISTANCE TO PVY^{NTN} - RESULTS OF POT EXPERIMENTS

Potato tuber necrotic ringspot disease, caused by necrotic strain of potato virus Y (PVY^{NTN}) is one of the most harmful potato diseases shown to have infected potato crops in Slovenia, cv. Igor being the worst affected. As the spreading of disease cannot be stopped by any of conventional control measures, we tried to obtain transgenic potato plants conferring resistance to PVY^{NTN}. Two different coat protein (CP) gene constructs of PVY^{NTN} - sense or frame-shift were inserted into potato cv. Igor using *Agrobacterium tumefaciens*. Resistance of transgenic plants to virus PVY^{NTN} was evaluated by mechanical inoculation and by grafting-experiments. The symptoms on plants as well as on tubers were closely examined; the presence of PVY^{NTN} was tested by ELISA. Results showed resistance to PVY^{NTN} on three transformed lines from 19 tested. Resistance was identified by failure to develop symptoms on plants and on tubers after mechanical inoculation. One of these lines showed resistance also in grafting-experiments. New transgenic lines are under testing.

Key words: coat protein, PVY^{NTN}, potato, *Solanum tuberosum*, transformation, virus resistance

¹ izr. prof., dr., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

² mag. bioteh., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

³ dipl. biol., SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

⁴ doc., dr. farmac., SI-1000 Ljubljana, Jamova 39

⁵ dr., Dundee DD2 5DA, Great Britain

1 UVOD

Nekrotičen različek virusa PVY^N (PVY^{NTN}) pripada skupini potivirusov in povzroča bolezen, imenovano obročkasta nekroza gomoljev. V Sloveniji smo jo v večjem obsegu opazili jeseni 1988; od tedaj se nezadržno širi in iz leta v leto stopnjuje (Kus, 1994). Upravičeno govorimo o pravi epidemiji, ki je najbolj vplivala na spremembe v sortnem sestavu krompirja. PVY^{NTN} zmanjšuje pridelok bolj kot ostali različki virusa PVY^N, pri občutljivih sortah pa tudi njegovo kakovost. Prav zaradi tega je Igor, najbolj priljubljena slovenska sorta, ki smo jo pred pojavom epidemije sadili na najmanj 60% njiv s krompirjem, hitro izginila z naših polj.

S transformacijo rastlin so bile že vzgojene na nekatere potiviruse odporne rastline (Maiti in Hunt, 1997). Zato smo v rastline krompirja sorte 'Igor' vnesli gen za plašni protein virusa (Žel *et al.*, 1998) in rastline testirali na odpornost na PVY^{NTN}.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Vektor in transformacija

Slovenski izolat PVY^{NTN} je bil izoliran iz rastlin krompirja sorte 'Igor' in vzdrževan v istem kultivarju (Petrovič *et al.*, 1995). cDNA knjižnica je bila narejena iz PVY^{NTN} RNA in gen za plašni protein (CP) je bil pomnožen iz knjižnice s PCR. Začetniki za pomnoževanje CP sekvenc so bili narejeni na osnovi objavljenih sekvenc različnih PVY izolatov. Za vnos mutacije bralnega okvirja (FS) smo premaknili start kodon za štiri nukleotide naprej pri konstruiranju 5' FS začetnika. cDNA dele vmo klonirali v binarni plazmid pROK2. Uporabili smo CaMV 35S promotor. S »triparental mating« smo prenesli ta vektor iz *E. coli* v *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404. Tako smo dobili bakterijo, ki je nosila gen za plašni protein virusa (CP) ter bakterijo z genom, ki ima premaknjen bralni okvir in kodira nefunkcionalni protein virusa. Za selekcijo transformiranih rastlin smo vnesli v blok genov tudi NPT II gen, ki nosi rezistenco na kanamicin. Koščke listov in internodije krompirja *Solanum tuberosum* sorte 'Igor' smo transformirali po metodi Webster s *sođ.* (1994). Vzgojene transformirane rastline smo razmnožili s segmentacijo nodijev, ter jih prenesli v tla v rastno komoro oziroma rastlinjak.

2.2 Testiranje rezistence na PVY^{NTN}

Za inokulum smo pri mehanski inokulaciji uporabili ekstrakt sveže strtih listov tobaka *Nicotiana tabacum* cv. 'Samsun' ali krompirja *Solanum tuberosum* cv. 'Igor', okužene s PVY^{NTN}. Ko so rastline razvile 6-7 listov, smo ekstrakt vtrli na liste, naprašene s prahom karborunda.

Pri cepljenju smo za podlago uporabili sekundarno okužene rastline zrasle iz gomoljev cv. 'Igor'. Za cepič pa neokužene transgene linije ter kontrolne netransformirane rastline. Opazovali smo pojavljanje simptomov in za preverjanje zastopanosti virusa v testiranih rastlinah uporabili DAS ELISA test (Clark in Adams, 1977) z monoklonskimi protitelesi proti PVY (proizvajalca Bioreba). Testiranje z ELISA je bilo možno, ker z njim nismo zaznali endogene CP ekspresije.

3 REZULTATI IN DISKUSIJA

V rastni komori smo testirali 19 transformiranih linij (preglednica 1). Po enem tednu so se pri kontrolah (netransformirane rastline) in štirinajstih različnih transformiranih linijah pojavili

lokalni simptomi, v naslednjem tednu pa sistemski simptomi. ELISA test je potrdil zastopanost virusa.

Zanimivi sta bili dve transformirani liniji št. 3 in št. 9, kjer smo na listih opazili milejšo obliko simptomov in njihovo časovno zakasnjeno. ELISA test je pokazal zastopanost virusa le v eni od treh inokuliranih transformiranih rastlin teh dveh linij.

Preglednica 1: Zastopanost lokalnih in sistemskih simptomov in rezultati ELISA testa pri različnih transformiranih linijah krompirja cv. Igor po mehanski inokulaciji z virusom PVY^{NTN}.

Table 1: The presence of local and systemic symptoms and results of ELISA at different transformed potato lines cv. 'Igor' after manual inoculation by PVY^{NTN} virus.

Transformirana linija krompirja		Število rastlin inokuliranih z virusom PVY ^{NTN}	Obstoj simptomov 1. teden po inokulaciji		Obstoj simptomov 2. teden po inokulaciji		Obstoj simptomov 3. teden po inokulaciji		Rezultati ELISA testa
Vnesen gen	Oznaka linije		Lokalni	Sistemski	Lokalni	Sistemski	Lokalni	Sistemski	
CP	1	3	+	-	/	+	/	+	+
	2	3	-	-	/	-	/	-	-
	3	3	++	-	/	++	/	+	++
	4	2	+	-	/	+	/	+	+
	5	1	+	-	/	+	/	+	+
	6	3	+	-	/	+	/	+	+
FS	7	3	+	-	/	+	/	+	+
	8	2	+	-	/	+	/	+	+
	9	3	++	-	/	++	/	+	++
	10	3	+	-	/	+	/	+	+
	11	2	+	-	/	+	/	+	+
	12	2	+	-	/	+	/	+	+
	13	3	+	-	/	+	/	+	+
	14	3	+	-	/	+	/	+	+
	15	3	+	-	/	+	/	+	+
	16	3	+	-	/	+	/	+	+
	17	2	+	-	/	+	/	+	+
	18	3	-	-	/	-	/	-	-
	19	3	-	-	/	-	/	-	-
KONTROLA		19	+	-	/	+	/	+	+

CP – gen za plaščni protein (gene for coat protein)

FS – gen za plaščni protein s premaknjenim bralnim okvirjem (shift frame coat protein gene)

- pomeni, da simptomov ni (pri ELISA testu pa, da ni virusa) (no symptoms present)

+ pomeni, da simptomi so (pri ELISA testu pa, da virus je) (presence of symptoms)

++ pomeni zastopanost milejše oblike simptomov (pri ELISA testu pa pozitivno vrednost le pri eni od treh inokuliranih rastlin) (mild symptoms)

/ pomeni propad inokuliranih listov (inoculated leaves felled off)

Pri treh transformiranih linijah št. 2 ter št. 18 in št. 19 pa se na testiranih rastlinah niso pojavili niti lokalni niti sistemski simptomi. Tudi ELISA test je potrdil, da v njih ni virusa.

Za nadaljnja testiranja v rastlinjaku smo izbrali tri linije, ki so kazale odpornost v prvem poskusu (linije 2, 18 in 19) ter eno neodporno linijo (4). Rastline smo gojili v tleh do gomoljev. Testiranje je potrdilo predhodne ugotovitve. Potrdili smo, da so tri transgene linije (št. 2, št. 18 in št. 19) odporne na virus po mehanski inokulaciji, simptomi se niso pojavili niti na rastlinah niti na gomoljih. Tudi na neodporni liniji (št. 4) smo opazili milejšo obliko simptomov na gomoljih, čeprav smo na rastlinah opazili simptome. Cepljenje je potrdilo odpornost linije 19. Zaradi delno neuspešnega cepljenja linij 2 in 18, pa je potrebna ponovitev poskusa za dokončno razjasnitev teh rezultatov.

V uporabi so različne strategije vnosa genov za odpornost na: vnos genov za plašni protein, vnos genov za replikazo, vnos genov za proteinazo Nla, vnos drugih potivirusnih genov (Maiti in Hunt, 1997).

Vnos genov za plašni protein virusa je za zdaj najuspešnejši način varstva rastlin pred virusnimi infekcijami. Ideja za tako gensko modifikacijo rastlin izhaja iz fenomena navzkrižnega varstva (Hackland *et al.*, 1994), ki pomeni, da predhodna inokulacija gostiteljske rastline z milejšim različkom virusa varuje rastlino pred poznejšimi inokulacijami z bolj virulentnimi različki istega virusa. Odpornost transgenih rastlin je lahko posledica delovanja mehanizma na ravni proteina ali RNK molekul vnesenega gena za plašni protein (Baulcombe, 1996). Zato bomo v nadaljnjih preučevanjih testirali rastline na molekularnem nivoju. Poleg tega pa smo vzgojili še nove linije, ki jih bomo testirali na odpornost na PVY^{NTN}.

4 SKLEPI

V rastline krompirja sorte 'Igor' smo vnesli gen za plašni protein virusa PVY^{NTN} ali gen s premaknjenim bralnim okvirjem, ki kodira nefunkcionalni protein. Testirali smo 19 transformiranih linij, od katerih so tri pokazale odpornost na virus. V nadaljnjih preučevanjih bomo rastline testirali še na molekularnem nivoju.

Zahvala

Najlepše se zahvaljujemo sodelavcem Laboratorija za fiziologijo in virusne bolezni krompirja M KŽK Kranj za konstruktivno in prizadevno sodelovanje. Projekt je financiralo Ministrstvo za znanost in tehnologijo RS in The British Council.

5 LITERATURA

- Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants.- *The Plant Cell*, 8, s. 1833-1844.
- Clark H. F. / Adams A. N. (1977): Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent-assay for the detection of plant viruses.- *J. Gen. Virol.*, 34, 457-483.
- Hackland A. F., Rybicki E. P., Thomson J. A. (1994). Coat protein-mediated resistance in transgenic plants.- *Arch Virol*, 139, 1-22.

- Kus M. (1994): Krompir.- ČZP Kmečki glas, Ljubljana 1994, 225 s.
- Maiti I. B. / Hunt, A. G. (1997): Genetically Engineered Protection of Plants against Potyviruses. V: Technology Transfer of Plant Biotechnology, ed. Gresshoff P. M., CRC Press.
- Petrovič N., Gruden K., Ravnikar M. (1995) Purification of potato virus Y^{NTN} from different plant material. - Acta Chimica Slovenica. 42: 425-430.
- Webster K. D. / Reavy B. / Barker H. (1994): An introduction to *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation techniques (A handbook methods used in the Virology department)., SCRI, 44 s.
- Žel J. / Stanič D. / Štruceļ R. / Štrakeļ B. (1998): Transgene rastline odporne proti virusom, Kmetijstvo in okolje, Zbornik posveta, Bled 12-13.3.1998.