

PREPARATION OF CONSTRUCTS TO INDUCE VIRAL RESISTANCE IN PEA

Rohrer M., Hanáček P., Reinöhl V., Procházka S.

Department of Plant Biology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: m.rohrer@seznam.cz

ABSTRACT

The most common viruses that attack peas grown in the Czech Republic are – pea enation mosaic virus (PEMV) and Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV). These viruses can cause serious economic losses in the cultivation. This work is focused on creating vector constructs that induce resistance to viral diseases in plants and the subsequent transformation of pea plants. CP cDNA fragment of both viruses (PEMV and PSbMV) and cDNA fragment of Cell to Cell movement protein (PEMV) were inserted in sense/antisense orientation between the 35S promoter and OCS terminator in the plasmid pHannibal and cloned into tDNA region of the vector system pGreen. Sense/antisense orientation should be transcribed to hairpin RNA (hpRNA) which leads to post-transcriptional gene silencing inducing resistance to both viruses (PEMV and PSbMV). Plasmid pGreen also contains a reporter gene for GUS histochemical test (*uidA*) and selection gene for resistance to the herbicide phosphinotricin (*bar*). This construct was introduced by electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* which included pSoup (binary vector). The ability of the construct to transform plants will be tested by transformation of tobacco leaf discs. The aim of this work is to prepare transgenic pea plant resistant to PEMV and PSbMV.

Key words: transformation, *A. tumefaciens*, post-transcriptional gene silencing

Acknowledgments: This work was supported by a grant IGA AF MENDELU Nr. TP1/2010.

ÚVOD

Při pěstování zemědělských plodin dochází kvůli virózám ke značným ekonomickým ztrátám. Zmírnit výskyt viróz lze hubením přenašečů, pěstováním zdravého osiva a pěstováním rezistentních nebo tolerantních odrůd. V moderním šlechtění se stále častěji objevují metody a přístupy genového inženýrství.

U hrachu pěstovaného v České republice se nejčastěji vyskytují virus výrůstkové mozaiky hrachu (PEMV) a virus semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV). Jednou z metod používanou genovým inženýrstvím pro tvorbu rezistentních rostlin je využívání posttranskripčního utišení genů invertovanými sekvencemi (IR-PTGS). Při vnesení fragmentů genů virů do genomu rostlin v sense/antisense orientaci dojde k vytvoření vlásenkové hairpinRNA (hpRNA). Jako vnašené sekvence se nejčastěji využívají fragmenty genů pro plášťové proteiny viru. Vzniklá dvouvláknová hpRNA je štěpena dsRNázou na 21–23 nukleotidové siRNA (small interfering RNA). SiRNA je poté začleněna do nukleázového komplexu RISC (RNA-induced silencing complex), který podle siRNA sekvence degraduje ssRNA se stejnou sekvencí. Tím by se měla indukovat virová rezistence u rostlin.

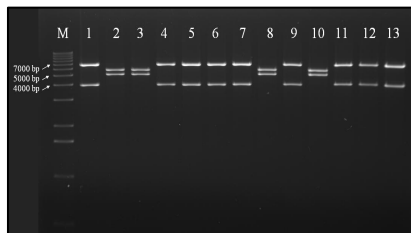
Cílem této práce je vytvořit konstrukt pro navození rezistence k PEMV a PSbMV. Používané metody transformace hrachu mají dosud velmi nízkou účinnost. Tabák, jako modelová rostlina pro transformaci pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, se transformuje snadněji než hrách, a proto je účinnost konstruktů testována pomocí transformace listových disků tabáku. Poté bude přistoupeno k transformaci hrachu, což by u něj mělo navodit rezistenci k PEMV a PSbMV.

MATERIÁL A METODIKA

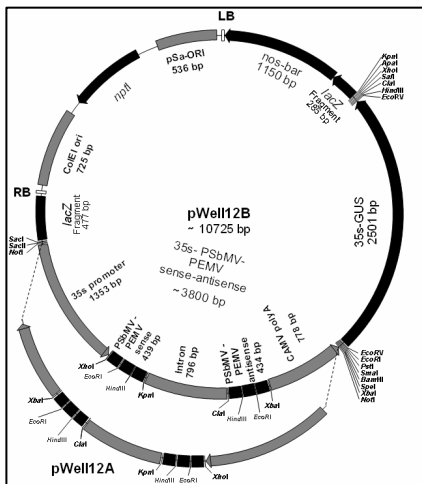
Pro tvorbu konstruktů indukující rezistenci k PEMV a PSbMV u rostlin hrachu byly vybrány sekvence cDNA obou virů s ohledem na ustálenost sekvencí u různých kmenů virů a s ohledem na použité restrikční enzymy a to: fragmenty cDNA genů pro CP virů PEMV (131 bp) a PSbMV (137 bp) a fragment cDNA genu cell to cell movement protine PEMV (149 bp). Ty byly amplifikovány pomocí PCR za použití primerů obsahujících přídavné cílové sekvence pro vhodné restrikční endonukleázy. Produkty byly po agarózové elektroforéze purifikovány z gelu pomocí kitu Invisorb Fragment CleanUp a koncentrace DNA byla stanovena fluorimetricky. Každý fragment byl poté ligován s pGEM-T vektorem a klonován v *Escherichia coli* kmen *Top 10* kultivované při 37°C na médiu LB s ampicilinem a X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-galaktopyranosid), což je aktivní složka při modrobílé selekci, pomocí které byly vybrány pozitivní kolonie *E. coli*. Ty byly přeneseny do roztoku Tris/MgCl₂ (50mM MgCl₂, 50 mM Tris Cl pH 7), ve kterém byly jednotlivé kmeny *E. coli* krátkodobě uchovány a zároveň posloužily jako templát pro kontrolní PCR. Vybrané kolonie byly namnoženy pro izolaci plazmidové DNA (GeneJET Plasmid Miniprep Kit). Izolované

plazmidy byly testovány nejprve pomocí PCR, dále pomocí restrikční analýzy a poté byly sekvenovány.

Z pGEM-T byly postupně všechny tři fragmenty cDNA vyštěpeny a vneseny do vektoru pBluescript SK+ mezi restrikční místa *XbaI*, *EcoRI*; *EcoRI*, *HindIII* a *HindIII*, *Clal*. Po klonování v *E. coli* byl rekombinantní plazmid pBluescript izolován. Pomocí PCR byly spojené fragmenty amplifikovány za použití primerů s odlišnými přídavnými restrikčními sekvencemi (*XbaI* a *Clal* byly nahrazeny *XhoI* a *KpnI*) a klonovány v *E. coli*. Průběžně byly dělány testy pomocí PCR a restrikční analýzy pro ověření správného začlenění fragmentů do plazmidového vektoru.



Obr. 1: Restrikční analýza (*Xho*I)
M – velikostní marker 1kb ladder
1,4,5,6,7,9,11,12,13 – pWell12A
2,3,8,10 – pWell12B



Obr. 2: mapa plazmidu pWell 12A a 12B

Oba spojené fragmenty cDNA byly vyštěpeny a vneseny do vektorového systému pHannibal v sense/antisense orientaci mezi 35S promotor a OCS terminátor tak, aby mezi nimi byl intron (větší účinnost PTGS). Po klonování v *E. coli* byl celý úsek vyštěpen pomocí restriční endonukleázy *NotI* a vložen mezi restriční místo *NotI* vektorového systému pGreen II, který již obsahoval selekční gen bar (rezistence vůči fosfotricinu) a reportérový gen uidA (histochemický GUS test). Plazmid byl opět klonován v *E. coli*. Z vybraných kolonií byla izolována plazmidová DNA. Pomocí restriční analýzy (štěpení restriční endonukleázou XbaI) (*Obr. 1*) byly vybrány kolonie s inzertou vloženými oběma směry (pWell12A a pWell12B) (*Obr. 2*) a ty byly sekvenovány.

PWell12 byl pomocí elektroporace vložen do *Agrobacterium tumefaciens* kmene EHA 105 spolu s plazmidem pSoup (pGREEN II je binární vektorový systém). Transformace *A. tumefaciens* byla prověřena pomocí PCR. Vytvořený konstrukt pWell12 byl ověřen pomocí transformace listových disků tabáku, které byly 1 minutu máčeny v tekutém LB mediu s *A. tumefaciens* obsahující plazmid pWell12.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Byly vytvořeny konstrukty pWell12A a pWell12B, které obsahují fragmenty cDNA genů pro CP virů PEMV a PSbMV a fragment cDNA genu cell to cell movement proteine PEMV v sense/antisense orientaci mezi 35S promotorem a OCS terminátorem. Dále obsahuje reportérový gen uidA pro histochemický GUS test, selekční gen bar navozující rezistenci k herbicidům s účinnou látkou fosfinotricin, gen *NptI* pro bakteriální rezistenci k antibiotiku kanamycin, lacZ gen kódující β -galaktosidázu pro modrobílou selekci a dále obsahuje mnohonásobné klonovací místo (polylinker) a ori místa (počátky replikace u *A. tumefaciens* a *E. coli*). PWell12B má oproti pWell12A otočený směr čtení úseku mezi promotorem 35S a OCS terminátorem. Pomocí těchto konstruktů byly transformovány listové disky tabáku, na kterých byl proveden histochemický GUS test s pozitivním výsledkem (Obr. 3).



Obr. 3: Pozitivní GUS test

ZÁVĚR

Vytvořeným konstruktem pWell12 lze transformovat listové disky tabáku. V budoucnu budou regenerovány a dopěstovány transgenní rostliny tabáku a dále budou transformována klíčící rostliny hrachu *in vivo* metodou (Švábová et al., 2005).

LITERATURA

Švábová L., Smýkal P., Griga M., Ondřej V. (2005): Agrobacterium-mediated transformation of *Pisum sativum* *in vitro* and *in vivo*. Biol. Plant, 49: 361-370.