

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PEA SEED-BORNE MOSAIC VIRUS (PSBMV) RESISTANCE GENE

Konečná E.¹, Hanáček P.¹, Smýkal P.²

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

²Department of Plant Biotechnology, AGRITEC Plant Research Ltd., Zemědělská 2520/16, 787 01 Šumperk, Czech Republic

E-mail: eva.konecna@mendelu.cz

ABSTRACT

In recent years, biotechnology has permitted regulation of the expression of endogenous plant genes to improve agronomically important traits. Genetic modification of crops has benefited from emerging knowledge of new genes, especially genes that exhibit novel functions. Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV), a member of the genus *Potyvirus*, family *Potyviridae*, is currently one of the most frequent viral pathogens causing yield losses of legumes. Beside aphid vectors, PSbMV is transmitted by infected seed batches. These losses can be easily prevented by growing resistant cultivars. In pea (*Pisum sativum*), recessive resistance genes to several potyviruses have been mapped genetically to linkage groups II and VI. Resistance to the common strains of PSbMV is conferred by a single recessive gene *eIF4E*, localized on linkage group VI (*sbm-1* locus). Homologues *eIF4E(iso)* gene was found in close relation to *sbm-2* locus (on linkage group II). Eukaryotic translation initiation factor 4E (*eIF4E*) and its isoform *eIF4E(iso)* play a key role during virus infection in plants. The *eIF4E(iso)* genes from several pea lines were isolated and sequenced. Full genomic fragments of *eIF4E(iso)* were obtained and protein sequences were deduced. Mutations of *eIF4E(iso)* between resistant and susceptible genotypes have been identified but are not yet functionally assigned. Selected genotypes are currently tested by L1 (P2) PSbMV pathotype. Using the RACE method, sequences of 3' and 5' UTR regions, were obtained and used for specific primers design to detect any differences between resistant and susceptible genotypes. Quantitative expression analysis is conducted for both genes.

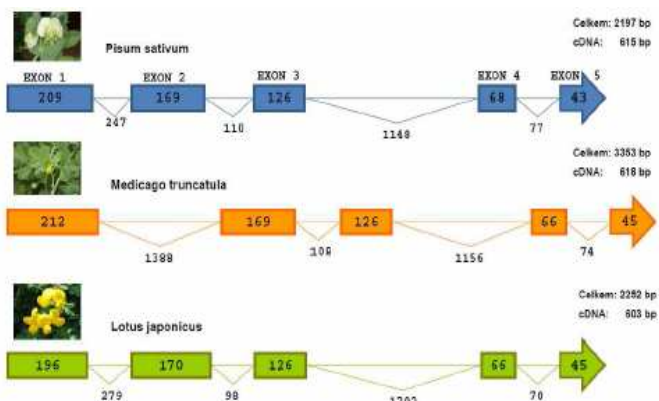
Key words: Pea seed-borne mosaic virus, resistance, *eIF4E*, *eIF4E(iso)*

Acknowledgement: IGA FA MENDELU Nr. TP 7/2011

ÚVOD

Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) patří mezi RNA viry, do čeledi *Potyviridae*, rodu *Potyvirus*. Spolu s virem enační mozaiky hrachu (Pea enation mosaic virus, PEMV) a virem žluté mozaiky hrachu (Bean yellow mosaic virus, BYMV) tvoří trojici hlavních virových patogenů, způsobujících hospodářsky významné škody na porostech hrachu a některých dalších zástupců luskovin. Virus PSbMV je přenášen semenem, mechanicky a hmyzími vektory (mšicemi). K hlavním symptomům napadení PSbMV patří nápadné svinování okrajů, tvorba listové mozaiky, prosvětlování listových žilek, tvorba zkrácených internodií a různý stupeň zakrslosti rostliny. U napadených rostlin dochází k pozdějšímu kvetení. Květy jsou často deformované, mohou ale vykvést za vzniku deformovaných lusků. Následně jsou také postižena semena, s typickou mozaikou, je snížena jejich životaschopnost a kvalita. Nejúčinnějším nástrojem pro omezení výskytu je využití rezistentních genotypů, které již byly v minulosti v genových kolekcích identifikovány a jsou dnes využívány při šlechtění. U hrachu bylo popsáno několik lokusů rezistence k virovým patogenům rodu *Potyvirus*. Tyto lokusy tvoří dva shluky recesivních genů nacházejících se ve dvou odlišných vazebných skupinách (chromozomech). Vazebná skupina VI obsahuje shluk recesivních genů *sbm-1*, *sbm-3*, *sbm-4*, *cyv-2* a *wlv*, které zodpovídají za rezistenci k PSbMV P1, P3, P4; *Clover yellow vein virus* (CIYVV) a *Bean yellow mosaic virus* kmen white lupin (BYMV-W). Další shluk je umístěn na vazebné skupině II a zahrnuje *bcm*, *cyv-1*, *mo*, *pmv* a *sbm-2* zprostředkující rezistenci k *Bean common mosaic virus*, *Clover yellow vein virus* (CIYVV), *Bean yellow mosaic virus*, *Pea mosaic virus* PSbMV P2 (Providenti et al., 1990). Lokusu *sbm-1* (LG-VI) odpovídá eukaryotický translační iniciační faktor 4E (*eIF4E*) a v těsné vazbě s lokusem *sbm-2* byl nalezen jeho homolog *eIF4E(iso)*.

Obr. 1 Schéma genomických sekvencí u vybraných druhů čeledi Fabaceae



U virů čeledi *Potyviriidae* je na 5' konci RNA vlákna místo čepičky připojen protein VPg (viral protein genomelinked), který je při iniciaci translace rozeznán rostlinným *eIF4E* jako čepička a tím dochází k translaci virové RNA. Pokud je alela *eIF4E* mutovaná (*sbm-1*) v tzv. "oblasti vázající čepičku" (cap binding pocket), nedochází k jejímu navázání na VPg a polypeptid nemůže být vytvořen, protože nedojde k úspěšnému složení ribozomu. Blízkost lokusu *sbm-2* a *eIF4E(iso)* naznačuje, že P3 a *eIF4E(iso)* spolu interagují podobně jako VPg a *eIF4E*.

V roce 2010 byly publikovány úplné genomické sekvence *eIF4E* u hrachu, včetně přímých markerů pro MAS (Marker assisted selection), které jsou založeny na nukleotidových mutacích vedoucích k záměně aminokyselin v primárním řetězci polypeptidu a umožňují identifikaci, jak homozygotních náchylných nebo rezistentních jedinců se 100 % spolehlivostí, tak zároveň identifikaci heterozygotů (Smýkal et al., 2010).

Cílem této práce je s pomocí molekulárně biologických metod stanovit celkovou genomovou sekvenci genu *eIF4E(iso)* u vybraných položek hrachu (*Pisum sativum* L.), dříve popsanych jako rezistentní či senzitivní k patotypu P2 PSbMV. Výsledky porovnat s dosud publikovanými sekvencemi cDNA tohoto genu a provést predikci primární struktury proteinů. V případě zjištění polymorfismů vázaných na rezistentní genotypy navrhnout jednoduchý markerovací systém pro detekci těchto alel, jež by mohl být využitelný při MAS.

MATERIÁL A METODY

Rostlinný materiál: Semena hrachu byla získána z genofondové kolekce USDA-ARS Western Regional Plant Introduction Unit, Pullman, WA, USA.

Izolace genomové DNA a RNA: Izolace nukleových kyselin byla provedena pomocí komerčně dodávaných kitů. Genomová DNA byla izolována z jednotlivých suchých semen pomocí DNEasy Plant Mini Kit (Qiagen). Izolace RNA byla provedena z mladých listů za použití RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) dle protokolu výrobce.

PCR amplifikace fragmentů *eIF4E(iso)*: PCR amplifikace byla provedena v 25μl objemu v 0,2ml zkumavkách. Složení PCR reakční směsi bylo podle standardního protokolu výrobce s použitím Green GoTaq polymerázy (Promega). Seznam použitých PCR primerů viz tab. 1. Teplotní profil PCR reakce, počáteční denaturace 94°C: 3 minuty, 30 cyklů: 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/1min 30s a závěrečná elongace 72°C po dobu 10 minut. Sekvence 5'UTR oblasti byla získána pomocí SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kitu (Clontech). Rozdělení PCR produktů bylo provedeno horizontální gelovou elektroforézou na 1% agarosovém gelu (Bioline, Velká Británie) v 1 x TAE pufru. Separace probíhala 30-45 minut při 75-120 V, detekce probíhala pomocí EtBR, vizualizace na UV transluminátoru a Gel Documentation System (Vilber Lourmat, Francie).

Klonování PCR produktu: Při klonování fragmentů bylo postupováno dle návodu k produktu pGEM-T Vector System (Promega) za použití originálních roztoků. Elektroporace kompetentních buněk byla provedena dle Ausubela et al. (1992). Na výsev buněk *E.coli* TOP 10 byly použity Petriho misky s pevným LB médiem a selekce na ampicilin a komponenty pro blue/white selekci. Pro testování pozitivních kmenů *E.coli* nesoucích pGEM-T s inzertem byla použita PCR s primery T7 a SP6. Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). Sekvenování bylo provedeno pomocí BigDye Terminator kitu (Applied Biosystems) v Macrogene Korea a Laboratoři sekvenace DNA PFF UK v Praze.

Tab. 1 Seznam použitých primerů

Název primeru	Sekvence (5'-3')	Poloze v <i>eIF4E(iso)</i>	Orientace
eIF4E-isoM-F	GTGTAGTTGCGAGTGTACGCCAGTG	786-710 F	F
eIF4E-isoM-R	CACTGGCGTACACTCGCAACTACAC	786-710 R	R
Ps- eIF4Eiso-F	ATATGGCAACAACAGAACCACTCG	0-22 F	F
sbm2-3UTR-Rev3	GATTTATGATTGTACAATCAACACAAC	3'UTR	R

VÝSLEDKY A DISKUZE

Sekvenací byla získána úplná genomová sekvence *eIF4E(iso)* vybraných položek hrachu. Exonové oblasti (cDNA) získaných *eIF4E(iso)* fragmentů byly porovnány s cDNA sekvencí dostupnou v databázi NCBI, konkrétně s genotypem Bonneville. U analyzovaných položek nebyl v oblasti exonů nalezen žádný délkový polymorfismus, byly v nich však zjištěny substituce v pozici 149 (C→A), 306,307 (TT→GA), 405 (C→A), 416 (C→G) a 521 (G→A). Délkový polymorfismus byl naopak nalezen v intronové oblasti, zejména u nejdelšího intronu 3. Podobný délkový polymorfismus, založený na opakované repetici, byl již popsán v intronu 3 u genu *eIF4E* ve vazbě na rezistentní alelu a bylo jej využito pro tvorbu markerů (Smykal et al., 2010). Introny jsou sice během posttranskripčních úprav vystříženy a nemají tedy vliv na primární strukturu proteinů, často však mohou sloužit jako regulátory genové exprese, rovněž je polymorfismus intronů vhodným základem pro tvorbu markerů využitelných ve šlechtění na rezistenci.

Tab.2 Seznam analyzovaných položek s vyznačenými mutacemi v kódující oblasti

(+ substitute v dané pozici, - bez substitute)

Číslo položky	Mutace v kódující oblasti					
	149 C→A	306,307 TT→GA	405 C→A	410 A→T	416 C→G	521 G→A
OSU 668	-	-	-	-	-	-
PI 193835	-	-	-	-	-	-
W6 15451	-	-	-	-	-	-
PI 347464/Z	+	-	-	-	-	-
PI 347464/K	+	-	-	-	-	-
JI 3135	+	-	-	-	-	-
Aa 134	+	-	-	-	-	-
VR-74-910-2	-	-	-	-	-	-
JI 1794	+	-	-	-	-	-
VIR 2523	+	+	-	-	-	-
VIR 60-70	+	+	-	-	-	-
VIR 2759	-	-	-	-	-	-
VIR 3424	-	-	-	-	-	-
PI 347422	-	-	-	-	-	-
PI 193835R	-	-	-	-	-	-
PI 347492/10	-	-	-	-	-	-
PI 347482	-	-	+	+	+	-
PI 347528	-	-	-	-	-	+

Role eukaryotních translačních faktorů v rezistenci k virovým patogenům rodu *Potyvirus* byla již popsána u několika druhů rostlin včetně salátu (Niciase et al., 2003), papriky (Ruffel et al., 2002), rajčete (Parrela et al., 2002), fazolu (Naderpour et al., 2010), ječmene (Stein et al., 2005), *Arabidopsis thaliana* (Lellis et al., 2002) a hrachu (Gao et al., 2004). Mutace v translačním faktoru mohou přerušit cyklus RNA virů, aniž by ovlivnily vývoj rostliny. Výsledky pokusů s *Arabidopsis thaliana* ukazují, že *eIF4E* i *eIF4E(iso)* jsou zapojeny do přirozené rezistence rostlin k potyvírům (Sato et al., 2005). Tyto výsledky by mohly potvrdit původní domněnku, kdy gen *eIF4E(iso)* a *sbm-2* lokus byly označeny za totožné. Tyto mutace lze využít v přirozené rezistenci rostlin k rychlé analýze nebo identifikaci a ulehčit screening genových kolekcí na požadovaný znak. Zatím se však nepodařilo najít takové rozdíly mezi senzitivní a rezistentní alelou, které by se daly jako v případě *sbm-1* využít při MAS (Marker assisted selection). Další možností při hledání polymorfismu mezi náchylnými a rezistentními genotypy jsou 5' a 3' UTR oblasti. V předchozí práci jsme získali pomocí 3' RACE postupu 3' UTR oblast, která se v rámci jednoho genotypu vyskytovala ve třech délkově odlišných formách, její délka byla 292bp. Metodou 5' RACE byla získána 82bp dlouhá sekvence 5' UTR oblasti *eIF4E(iso)*. Na začátek UTR oblastí byly navrženy primery, které jsme využili při hledání polymorfismu mezi náchylnými a rezistentními genotypy.

ZÁVĚR

Práce se zabývá sekvenční analýzou translačního iniciačního faktoru *eIF4E(iso)* u rodu *Pisum*, který se nachází ve vazebné skupině II a předpokládá se, že je lokusem *sbm-2* zodpovídajícím za rezistenci k patotypu P2 PSbMV viru. Bylo analyzováno 18 položek, zahrnující liniové, krajové a plané druhy hrachu setého, dříve popsaných jako senzitivní či rezistentní k patotypu P2. Sekevenováním byla zjištěna celková délka genomické úseku *eIF4E(iso)* a identifikovány mutace v *eIF4E(iso)* vedoucí k aminokyselinové záměně mezi rezistentními a náchylnými genotypy. Tyto mutace však nebyly dosud funkčně přiřazeny, nelze je pravděpodobně spojovat s rezistencí, neboť se vyskytují na ojedinělých pozicích a lze je tedy spíše přisuzovat vnitrodruhové variabilitě. Vybrané genotypy jsou testovány L1 (P2) PSbMV patotypem. Užitím metody RACE byla získána sekvence 5' a 3' UTR oblastí, které byly využity k návrhu specifických primerů a studiu sekvenčního polymorfismu a genové exprese. Rovněž se budeme snažit o charakterizaci dostupných TILLING mutantů, majících nové alely obou studovaných genů, které by mohly být přímo použitelné ve šlechtitelské praxi.

LITERATURA

- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (2002) *Short protocols in Molecular Biology* Fifth edition, John Wiley and Sons, Inc.
- Gao, Z., Eyers, S., Thomas, C., Ellis, N., Maule, A. (2004): Identification of markers tightly linked to *sbm* recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theor Appl Genet*, 109:488-494
- Hjulsager, C. K.; Olsen, B. S.; Jensen, D. M. K.; Cordea, M. I.; Krath, B. N.; Johansen, I. E.; Lund, O. S. (2006): Multiple determinants in the coding region of Pea seed-borne mosaic virus P3 are involved in virulence against *sbm-2* resistance. *Virology*, 355 (3), 52–61.
- Naderpour, M.; Lund, O. S.; Larsen, R.; Johansen, E. (2010): Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated *eIF4E* allele. *Mol. Plant. Pathol.*, 11 (2), 255–263.
- Niciase, V.; German-Retana, S.; Sanjuán, R.; Dubrana, M. P.; Mazier, M.; Maisonneuve, B.; Candresse, T.; Caranta, C.; LeGall, O. (2003): The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Controls Lettuce Susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus1. *Plant Physiol.*, 132, 1272–1282.
- Parrela, G.; Ruffel, S.; Moretti, A.; Morel, C.; Palloix, A.; Caranta, C. (2002): Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. *Theor. Appl. Genet.*, 105, 855–861.

Provvidenti, J. A.; Muehlbauer, F. J. (1990) Evidence of a cluster of linked genes for resistance to pea seedborne mosaic virus and clover yellow vein virus on chromosome 6. *PNL*, 22, 43–46.

Ruffel, S.; Dussault, M. H.; Palloix, A.; Moury, B.; Bendahmane, A.; Robaglia, C.; Caranta, C. (2002): A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.*, 32, 1067–1075.

Sato, M.; Nakahara, K.; Yoshii, M.; Ishikawa, M.; Uyeda, I. (2005): Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett.*, 579, 1167–1171.

Smykal P., Šafářová D., Navrátil M., Dostálová R. (2010): Marker assisted pea breeding: eIF4E allele specific markers to pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) resistance. *Mol Breeding*. 26:425-438.

Stein, N.; Perovic, D.; Kumlehn, J.; Pellio, B.; Stracke, S.; Streng, S.; Ordon, F.; Graner, A. (2005): The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *Plant J.*, 42, 912–922.