

## INDUCTION OF VIRAL AND INSECTS RESISTANCE IN PEA THROUGH TRANSGENESIS

Rohrer M., Břusková H., 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 aim of this work was to create a plasmid construct which should induce the resistance of pea plants to viral diseases and insects after the transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. The final construct pWELL14 is based on the plasmid pWELL11, which was constructed in the vector system pGREEN. pWELL11 contained a serine protease inhibitor gene SPI2 fused with GFP reporter sequence, driven by 35S promoter (Triple X) and the OCS terminator. Furthermore pWELL11 carried the selection gene *bar* for resistance to phosphinothricin, *nptII* gene for bacterial resistance to kanamycin and the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene *uidA*. Into this recombinant plasmid a part of the construct pWELL12 was inserted carrying cDNA fragments of the coat proteins (CP) of pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) and pea enation mosaic virus (PEMV) and a fragment of MP (PEMV) cDNA in sense / antisense orientation between the 35S promoter and OCS terminator. This cassette should produce after transcription a hairpin RNA conformation (hpRNA) which plays a key role in induction of post-transcriptional gene silencing (PTGS) causing in the transformed plants resistance to both viruses. The expression of the SPI2 gene for a protease inhibitor should cause resistance in the transformed plant to insect pests. The created pWELL14 construct was tested by transformation of tobacco leaf disks and subsequent GUS test with positive results.

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

**Acknowledgement:** This work was supported by a grant IGA FA MENDELU Nr. TP7/2011.

## ÚVOD

Hrách setý (*Pisum sativum* L.) patří k nejrozšířenějším luskovinám a vyznačuje se cennými agronomickými vlastnostmi. Luskoviny jsou obecně dobrou předplodinou především pro pšenici a představují významný zdroj rostlinných bílkovin a pro jejich úzký poměr k sacharidům jsou důležitou složkou v krmných směsích živočišné výroby nebo při přímém konzumu v lidské výživě (Candráková 2009). V zemědělství jsou kladeny stále větší nároky na objem a kvalitu produkce.

Jednou z nejčastějších viróz hrachu setého v ČR je enačnická mozaika hrachu (PEMV), často v komplexu se semenem přenosnou mozaikou hrachu (PSbMV). Tyto mohou být příčinou až 80% ztráty na výnosu semen. Jedním z přenašečů těchto viróz je kyjatka hrachová (*Acyrtosiphon pisum* Harris), právě z tohoto důvodu je vnímána jako nejzávažnější hmyzí škůdce hrachu v ČR (Seidenglanz 2011). Další z řad hmyzích škůdců jsou třásněnky (*Thripidae*), listopas čárkovaný (*Sitona lineatus* L.), nebo zrnokaz hrachový (*Bruchus pisorum* L.).

Chemická ochrana rostlin proti škůdcům a patogenům je značně nákladná a má negativní vliv na životní prostředí. Vhodnější je pěstování rezistentních odrůd zemědělských plodin.

Jednou z metod používanou genovým inženýrstvím pro tvorbu rezistentních rostlin vůči virovým onemocněním je využívání posttranskripčního utišení genů invertovanými sekvencemi (PTGS), který ve své práci popsal Berstein et. al., (2001). Při vnesení fragmentů genů virů do genomu rostlin v sense/antisense orientaci dochází k vytvoření vlásečkové hairpinRNA (hpRNA). Jako vnášené 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.

Proteolytické enzymy katalyzují štěpení molekuly bílkoviny na menší řetězce a posléze až na jednotlivé aminokyseliny. Serinové proteasy byly nalezeny v zažívacím traktu mnohých zástupců hmyzu, zejména řádu motýlů (*Lepidoptera*), který zahrnuje celou řadu významných škůdců kulturních rostlin. Inhibitory proteas inhibují proteasovou aktivitu těchto trávicích enzymů a snižují tak množství strávených proteinů. Inhibice proteas zároveň vede k nadprodukci trávicích enzymů, což má za následek vyčerpání rezerv sirných aminokyselin. Výsledkem těchto pochodů je oslabení hmyzu, jeho omezený vývoj a často i smrt. Inhibitory serinových proteas mají optimální pH prostředí 9–11, což koresponduje s obvyklým pH střevního traktu řady zástupců *Lepidoptera*

(Hraška 2006). Jedním z vhodných genů pro navození rezistence rostlin vůči požerovému hmyzu je *SPI2* izolovaný ze zavřejče voskového (*Galleria mellonella* L.) (Nirmala et al., 2001).

V této práci bylo využito jak PTGS, tak i inhibitorů proteas k vytvoření transgenních rostlin hrachu, s předpokladem vzniku rezistence rostlin vůči virům PSbMV a PEMV a rovněž také vůči hmyzím škůdcům.

## MATERIÁL A METODIKA

V Práce byla rozdělena na dvě části. První část spočívala v tvorbě konstruktů pWELL12 obsahující sekvence genů plášťových proteinů virů semenem přenosné mozaiky hrachu (PSbMV) a enační mozaiky hrachu (PEMV) v sense/antisense orientaci, jehož T-DNA inkorporovaná do genomu rostliny by měla navodit rezistenci vůči oběma virózám. Druhá část práce zahrnovala přenesení kazety se sekvencemi genů plášťových proteinů virů v sense/antisense orientaci mezi 35S promotorem a OCS terminátorem z pWELL12 do již dříve vytvořeného konstruktů pWELL11B, který obsahuje gen (*SPI2*) pro inhibitor serinových proteas. Tento gen by měl navodit u transformované rostliny rezistenci vůči požerovému hmyzu.

Konstrukt pWELL12 byl vytvořen na základě vektorového systému pGREEN II. V práci byla použita verze pGREEN II 229, která obsahuje rovněž selekční gen *bar* pro rezistenci k fosfotricinu (glufosinát - účinná látka komerčních herbicidů Liberty-Link<sup>®</sup>, Basta<sup>®</sup>, Finale<sup>®</sup>, Radicale), gen *nptI* pro bakteriální rezistenci k antibiotiku kanamycin a také reportérový gen *uidA*, který produkuje  $\beta$ -glukuronidázu. Mezi restrikční místo *NotI* byla vložena kazeta 35S::cpPSbMV:cpPEMV:mpPEMV. Pro sestavování této kazety byly vybrány sekvence cDNA virů PSbMV a PEMV s ohledem na ustálenost sekvencí u různých kmenů virů a s ohledem na použité restrikční enzymy a to: fragmenty cDNA genů pro cp (coat protein) virů PEMV (131 bp) a PSbMV (137 bp) a fragment cDNA genu mp (movement protein) PEMV (149 bp). Ty byly amplifikovány pomocí PCR za použití primerů obsahujících přidané cílové sekvence pro vhodné restrikční endonukleázy. Produkty PCR byly po agaróзовé elektroforéze purifikovány z gelu pomocí kitu Invisorb Fragment CleanUp (Invitek) a koncentrace DNA byla stanovena fluorimetricky. Jednotlivé fragmenty byly pomocí DNA-ligázy vloženy do vektoru pGEM-T (Promega). Elektroporací byly plazmidy pGEM-T transformovány elektrokompetentní buňky *Escherichia coli* kmen Top 10 a klonovány. Pomocí modro/bílé selekce byly vybrány pozitivní kolonie *E. coli* a ty byly přeneseny do roztoku Tris/ MgCl<sub>2</sub> (50mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris Cl pH 7), kde byly jednotlivé kolonie *E. coli* krátkodobě uchovány v chladničce a zároveň posloužily jako templát pro kontrolní PCR. Vybrané kolonie byly namnoženy v tekutém LB mediu a pomocí GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) z nich byla izolována plazmidová DNA, která byla testována pomocí PCR a restrikční analýzy a poté sekvenována.

Jednotlivé fragmenty virové cDNA byly, po namnožení a kontrole, pomocí restrikce a následné ligace postupně klonovány za sebe do vektoru pBluescript. Po opětovném namnožení v *E. coli* a izolaci plazmidové DNA byla celá vložená sekvence amplifikována pomocí PCR za použití

primerů s jinými přídatnými cílovými sekvencemi pro restriční endonukleázy. To umožnilo vložení obou těchto sekvencí do vektorového systému pHANNIBAL (CSIRO) v orientaci sense/antisense mezi 35S promotor a OCS terminátor tak, aby mezi nimi byl intron. Průběžně bylo prováděno testování pomocí PCR, restriční analýzy a poté byla provedena sekvenace. Nakonec byla celá kazeta 35S::cpPSbMV:mpPEMV:cpPEMV přenesena do vektorového systému pGREENII. Hotový konstrukt byl nazván pWELL12 (Obr. 2).

Po namnožení konstruktů pWELL12 a izolaci plazmidové DNA byly pomocí restriční analýzy odlišeny dvě verze pWELL12A a pWELL12B v závislosti na směru čtení GUS genu *uidA*.

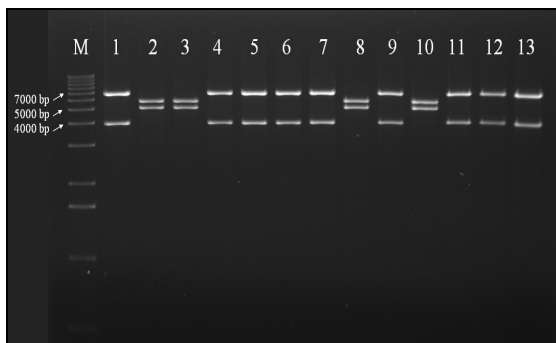
Elektroporací byly konstrukty pWELL12 spolu s pomocným plazmidem pSoup transformovány kompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* kmen EHA 105. Pro ověření funkčnosti byl konstrukt pWELL12 transformován tabák virginský (*Nicotina tabacum*) kmen SR-1, jako modelová rostlina pro transformace pomocí *A. tumefaciens*. Tabák byl transformován metodou transformace listových disků. Korkovrtem byly vyřezány disky z listů tabáku a ty byly máčeny jednu minutu v suspenzi kultury *A. tumefaciens*. Po osušení byly listové disky dány na kultivační médium MS 0,1/1. Po třech dnech kultivace byli explantáty převedeny na médium MS 0,1/1 s augmentinem a několik málo disků bylo použito na histochemický GUS test podle Fütterera et al. (1995). Tři až čtyři týdny staré regeneranty byly přeneseny na selekčním médium MS 0,1/1 s augmentinem a fosfinotricinem.

Dále byl vytvořen konstrukt pWELL14B (Obr. 3). Ze zhotoveného konstruktů pWELL12 byla pomocí restriční endonukleázy *NotI* vyjmuta kazeta 35S::cpPSbMV:mpPEMV:cpPEMV a poté byla vložena do již dříve zhotoveného konstruktů pWELL11B (Obr. 1). Tento konstrukt byl také založen na vektorovém systému pGREENII 0229 a obsahoval navíc gen pro inhibitor serinových proteás SPI2 fúzovaný s reporterovým genem GFP. Tyto dva geny byly regulovány promotorem 35S (triple X) a terminátorem OCS. Hotový konstrukt pWELL14B byl opět průběžně testován pomocí PCR, restriční analýzy, sekvenace a poté pomocí transformace rostlinných disků tabáku.



## VÝSLEDKY A DISKUZE

V první části této práce se podařilo na základě vektorového systému pGREENII 0229 vytvořit konstrukt pWELL12, který nese fragmenty cDNA genů pro cp virů PEMV a PSbMV a fragment cDNA genu mp PEMV v sense/antisense orientaci mezi 35S promotorem a OCS terminátorem. Při tvorbě konstruktů byl využit plazmid pHANNIBAL. Wesley et. al., (2001) se ve své práci zmiňuje o vhodnosti plazmidu pHANNIBAL pro snadnější tvorbu konstruktů využívajících posttranskripční utišení genů a jeho používání při studiu genů. Bylo zjištěno, že intron mezi fragmenty poskládané v sense/antisense orientaci značně zvyšuje účinnost PTGS. Dále konstrukt obsahuje reportérový gen *uidA* vhodný pro rychlé testování transformovaných rostlin (například pomocí histochemického GUS testu), selekční gen *nos-bar* navozující rezistenci transgenní rostliny k herbicidům s účinnou látkou fosfinitricin, gen *NptI* pro bakteriální rezistenci k antibiotiku kanamycin, *lacZ* gen kódující β-galaktosidázu pro modrobílou selekci bakterií a dále obsahuje mnohonásobné klonovací místo (polylinker). Pro umožnění replikace v *E. coli* a *A. tumefaciens* plazmid dále nese dvě *ori* místa.

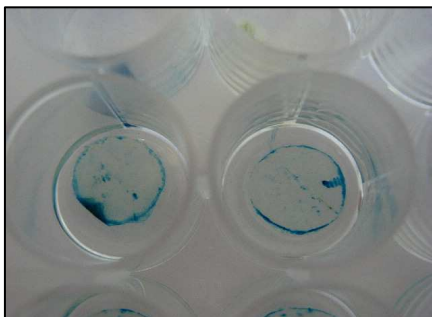


Obr. 4: Restrikční analýza (*XhoI*) M – velikostní marker 1kb ladder 1,4,5,6,7,9,11,12,13 – *pWell12A* 2,3,8,10 – *pWell12B*

Pomocí restrikční analýzy jsme rozlišili dvě varianty konstruktů a to pWELL12A a pWELL12B (Obr. 4). Tyto plazmidy se liší ve směru čtení operonu nesoucího *uidA*. Umístění promotoru na tomto genu by mohlo ovlivnit expresi i okolních genů. V průběhu práce byly prováděny kontroly pomocí PCR, restrikční analýzy a jednotlivé vkládané fragmenty byly sekvencovány pro ověření absence mutací. Hotovým konstruktem pWELL12 byl poté metodou transformace listových disků podle Dombrowského et al. (1994) transformován tabák jakožto modelová rostlina pro transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Úspěšnost transformace byla prokázána pomocí pozitivního GUS testu listových disků tabáku. Po zregenerování celých rostlin bude GUS test opakován a doplněn PCR. Tento konstrukt by měl u cílové rostliny, což je hrách setý, který se bude transformovat metodou transformace hrachových semen *in vitro* podle Švábová et al., (2005), vyvolat rezistenci vůči virům PSbMV a PEMV způsobenou vlivem posttranskripčního utišení genů

PTGS. O využívání PTGS při ochraně rostlin proti virózám pojednává Kyrychenko et. al., (2007) a Jones et al., (1998) jej využil při tvorbě hrachu odolného k PSbMV.

V druhé části práce byl využit vytvořený konstrukt pWELL12 a dříve vytvořený konstrukt pWELL11B k tvorbě vektoru, který by spojil indukcí rezistence k virům PSbMV a PEMV s indukcí rezistence proti požerovému hmyzu vyvolávané konstruktem pWELL11B. Zhotovený vektor pWELL14B byl opět v průběhu práce testován pomocí PCR, restrikční analýzy a sekvenování. Schopnost transformovat dvouděložné rostliny byla i tentokrát testována pomocí transformace listových disků tabáku a následného GUS testu, který dal pozitivní výsledky (Obr. 5). Další práce bude spočívat v transformování rostlin hrachu zhotoveným konstruktem pWELL14B.



Obr. 5: Pozitivní GUS test listových disků tabáku

## ZÁVĚR

Podařilo se připravit konstrukt pWELL12, který nese fragmenty cDNA genů pro cp virů PEMV a PSbMV a fragment cDNA genu mp PEMV v sense/antisense orientaci mezi 35S promotorem a OCS terminátorem a transformovat tímto vektorem rostliny tabáku. Dále byl vytvořen konstrukt pWELL14B, který navíc obsahuje gen pro inhibitor serinových proteás *SPI2* a reportérový gen pro GFP taktéž pod regulací trojnásobného 35S promotoru a OCS terminátoru. Tento konstrukt spojuje navození rezistence vůči hmyzím škůdcům a virózám, které by měl indukovat v transformovaných rostlinách hrachu. Vzhledem k obtížnosti transformace hrachu je to významný krok k usnadnění přípravy transgenních linií rezistentních vůči uvedeným chorobám a škůdcům.

## LITERATURA

Bernstein, E., Caudy, A., Hammond, S., Hannon, G. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 18: 363-6.

Candráková, E., Hanáčková, E. (2009): Kvalita semen hrachu siateho v závislosti od podmínek pestovania. *Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo*: 88-95.

Dombrowski, J.E., Gomez, L., Chrispeels, J., Raikhel, N.V. (1994): Targeting of proteins to the vacuole. In: Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. (1995): Plant molecular biology manual, Kluwer academic publishers, Dordrecht.

Fütterer, J., Gisel, A., Iglesias, V., Klöti, A., Kost, B., Mittelsten S, O., Neuhaus, G., Neuhaus-Url, G., Schrott, M., Shillito, R., Spangenberg, G., Wang, Z.Y. (1995): Standard Molecular Techniques for the Analysis of Transgenic Plants. In: Potrykus, I., Spangenberg, G. (1995): Gene transfer to plants. Springer-Verlag, Berlin.

Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland N. R., Bean, S., Mullineaux P. M. (2000): pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Bio.*, 42: 819-832.

Hraška, M., Rakouský, S., Čurn, V. (2006): Inhibitory proteas, mechanism účinku a perspektivy jejich využití v transgenozí rostlin. *Chem. listy*, 100: 501 – 507.

Jones, A., Johansen, I., Bean, S., Bach, I., Maule, A. (1998): Specificity of resistance to pea seed-borne mosaic potyvirus in transgenic peas expressing the viral replicase (NIb) gene. *J Gen Virol*, 79: 3129-37.

Kyrchenko, A. M., Telegeyeva, T. A., Kovalenko, O. G. (2007): Molecular and Genetic Mechanisms of Resistance of Plants to Viruses. *Tsitolgiya i Genetika*, 41: 67-79.

Seidenglanz, M., Huňady, I., Poslušná, J., Loes, A. (2011) Influence of Intercropping whit Spring Cereals on the Occurrence of Pea Aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris, 1776) and their Natural Enemies in Field Pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Protect. Sci.*, 47: 25-36.

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.

Wesley, S., Helliwell, C., Smith, N., Wang, M., Rouse, D., Liu, Q., Gooding, P., Singh, S., Abbott, D., Stoutjesdijk, P., Robinson, S., Gleave, A., Green, A., Waterhouse, P. (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J.*, 27: 581-90.