

Komkommermozaiekvirus in siergewassen

Y-K. Chen

Op maandag 24 maart 2003 promoveerde aan de Wageningen Universiteit dr Yuh-Kun Chen op een proefschrift getiteld: '**Occurrence of Cucumber Mosaic Virus in ornamental plants and perspectives of transgenic control**'. Het onderzoek was uitgevoerd bij Virologie, Wageningen Universiteit. De promotor was prof. dr. R.W. Goldbach, hoogleraar Virologie; co-promotor was dr. ir. M.W. Prins, universitair docent Virologie. Het onderzoek was gefinancierd door het Taiwanese ministerie van onderwijs.

Inleiding

Door gebruik te maken van het principe van pathogeen-afgeleide resistentie (engels: pathogen-derived resistance, PDR) zijn de afgelopen twee decennia verschillende benaderingen ontwikkeld om planten door middel van genetische modificatie virus-resistent te maken. De ontwikkeling van transgene virus-resistente sierplanten loopt achter bij die van andere gewassen, omdat de introductie van transgenen in sierplanten, in het bijzonder monocotylen zoals lelie en gladiool, zeer moeizaam is gebleken. Het werk dat beschreven is in dit proefschrift is de eerste fase van een lange-termijn project met als doel het ontwikkelen van lelie cultivars die resistent zijn tegen het komkommer-mozaïek virus (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV) en als gevolg daarvan ook minder vatbaar zijn voor schade veroorzaakt door andere virussen waarvan de symptomen versterkt worden door co-infectie met

CMV. Van alle voorhanden zijnde methoden leek de op specifieke expressie en afbraak van RNA gebaseerde transgene resistentie (*RNA-mediated virus resistance*, RMVR) het meest veelbelovend om dit doel te bereiken en dus werd voor deze benadering gekozen.

Classificatie van CMV isolaten in siergewassen

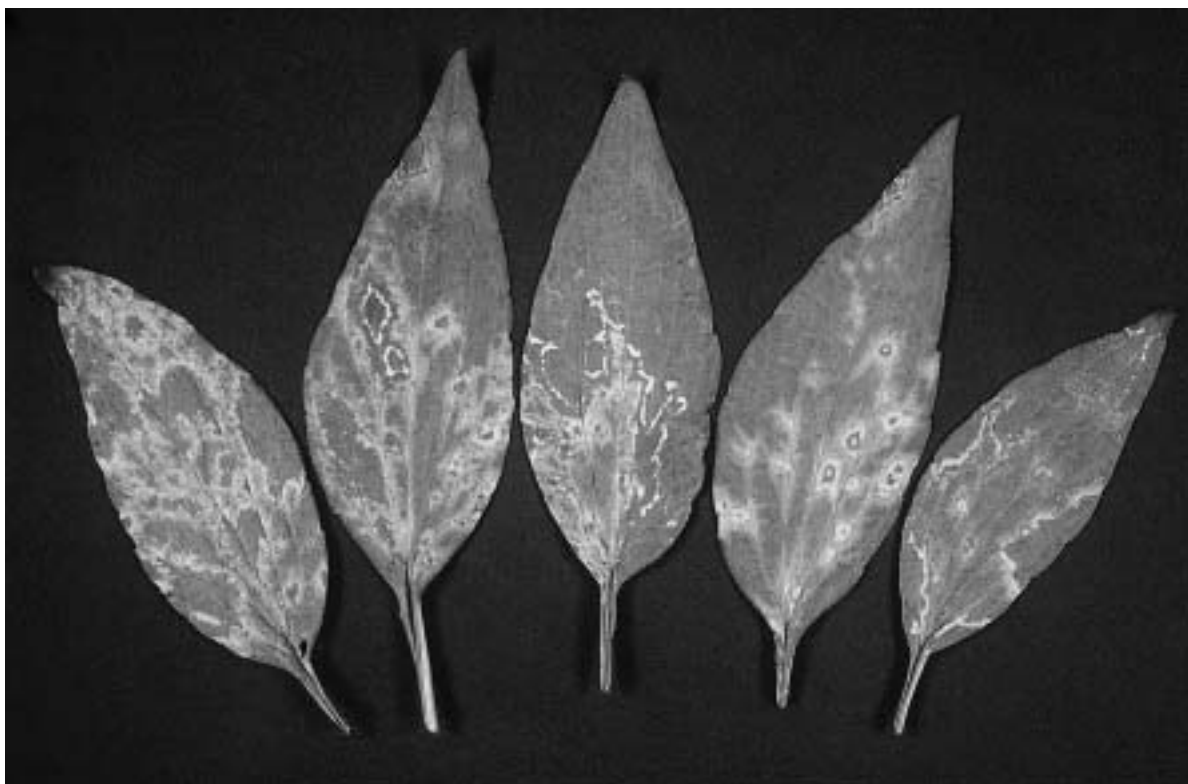
Hoewel RMVR erg effectief is heeft het als nadeel dat het slechts werkt tegen het virus waarvan het transgen is afgeleid, dientengevolge is het belangrijk allereerst te inventariseren welke CMV isolaten sierplanten infecteren. Van 11 CMV isolaten uit sierplanten van verschillende geografische herkomst werd de nucleotidesequentie van het RNA 4 (coderend voor het manteleiwit) bepaald. Op basis van vergelijking van deze sequenties met bekende sequenties uit de databank zijn de isolaten in te delen in twee subgroepen. Twee isolaten, afkomstig van alstroemeria en krokus, konden worden ingedeeld in subgroep II, terwijl de andere negen isolaten, afkomstig van gladiool, *Amaranthus*, larkspur, *Lisianthus* en lelie, bleken te behoren tot subgroep I. Over het algemeen was de variatie in sequentie een afspiegeling van de geografische verdeling, met één belangrijke uitzondering: de vijf lelie isolaten vertoonden onderling een bijzonder hoge mate van homologie in RNA 4, ondanks hun uiteen-

lopende geografische herkomst. Deze bevinding geeft aan dat het toepassen van RMVR in transgene lelie een haalbare optie is.

Invloed plantensoort op evolutie CMV

Uit de sequentievergelijking van verschillende CMV isolaten bleek een CMV isolaat van alstroemeria een extra sequentie van 218 nucleotiden te bevatten in het 3' niet-coderende gedeelte (*nontranslated region*, NTR) van RNA 3. In een vervolgstudie werd aangetoond dat ook de RNA sequenties van drie andere CMV isolaten uit alstroemeria vergelijkbare inserties bevatten in zowel RNA 3 als RNA 2. Aan de hand van deze informatie werd een *DIG*-gelabelde probe ontwikkeld die gebruikt kan worden om door middel van dot blot hybridisaties de aanwezigheid van subgroep II CMV isolaten aan te tonen, alsmede om door middel van Northern hybridisatie onderscheid te maken tussen CMV isolaten die deze extra sequenties al dan niet bevatten. De nucleotide-sequentie en voorspelde secundaire structuur van het 3' uiteinde van de alstroemeria CMV RNAs 2 en 3 wezen erop dat tijdens virale RNA replicatie zowel intra- als intermoleculaire recombinaties hadden plaatsgevonden. In een replicatieanalyse werd vervolgens aangetoond dat in alstroemeria de replicatie-efficiëntie van de recombinant groter was dan die van het wildtype, terwijl in tabaksplanten juist het omgekeerde het geval was. Aangezien de verschillende

PROMOTIE



Figuur 1. Veel siergewassen worden aangetast door komkommermozaiekvirus. Dit zijn de symptomen van virus-aantasting in Rudbeckia. Foto PD (met dank aan Ko Verhoeven).

alstroemeria isolaten, hoewel ze allen extra sequenties bevatten in hun RNAs 2 en 3, niet identiek zijn, kan 'pseudo-recombinatie' van hun genoom-segmenten tijdens een gemengde infectie wellicht leiden tot meer varianten met andere replicatie-efficiënties. Hierdoor is het mogelijk dat binnen het zeer brede gastheerbereik van CMV sommige plantensoorten een relatief grote invloed zouden kunnen hebben op de evolutionaire ontwikkeling van dit virus.

Resistentie tegen CMV

De afgelopen jaren zijn verschillende nieuwe benaderingen om resistentie tegen CMV te bereiken gerapporteerd. Deze zijn gebaseerd op het PDR concept en behelzen o.a. transgene expressie van viraal mantelwit of (defect) replicase. De uitkomsten van deze studies zijn echter sterk wisselend.

Zo werd in een aantal van de oorspronkelijke studies aangetoond dat het mantelwitgen van CMV effectieve resistentie kan bewerkstelligen, terwijl dit in latere studies niet herhaald kon worden, ondanks een goed expressieniveau van transgeen mantelwit. Daarnaast is een positief effect op resistentie gerapporteerd van transgene expressie van (defect) replicase, hetgeen duidt op een "replicase-mediated" resistentie. Er werd echter net als in de meeste andere studies geen correlatie gevonden tussen resistentie en de accumulatie van transgeen eiwit, en dus zou de transgene replicase-mediated resistentie tegen CMV wellicht op RNA in plaats van eiwit niveau kunnen werken. Gezien de tegenstrijdige resultaten van deze studies naar artificiële vormen van resistentie tegen CMV, werd de praktische waarde van een dergelijke benadering geëvalueerd door transformatie van een modelplant, *Nicotiana tabacum*, met een serie virale cDNA constructen afgeleid

van CMV RNAs 2 en 3. Transformatie met het mantelwitgen resulteerde in zeer beperkte bescherming tegen CMV, de S_1 nakomelingen van mantelwit-expressieplanten vertoonden slechts een vertraging in de ontwikkeling van systemische ziektesymptomen terwijl ook de homozygote S_2 slechts gedeeltelijk beschermd was. Wat betreft RMVR bleek dat transgene (niet-vertaalbare) RNA 3 sequenties niet in staat zijn resistentie te induceren, RNA 2 sequenties daarentegen kunnen dat wel. Door transgene expressie van RNA 2 sequenties vertoonden de S_1 planten van een aantal transgene lijnen een hoge mate van resistentie, terwijl de homozygote S_2 nakomelingenpopulatie van deze lijnen volledig beschermd was. Deze resultaten benadrukken dat, hoewel niet alle genomische sequenties even geschikt zijn, het toepassen van RMVR de voorkeur heeft boven resistentie gebaseerd op mantelwit expressie.

Hoewel RMVR een zeer goede strategie kan zijn om virusresistente waardplanten te verkrijgen, bleek de efficiëntie van de methode erg laag. Het verkrijgen van één volledig resistente lijn op S_2 niveau vereist het produceren en testen van tientallen onafhankelijke transgene lijnen. Deze lage efficiëntie zou een groot probleem zijn in het geval van moeilijk te transformeren planten zoals monocotyle sierplanten. De waargenomen RMVR tegen CMV is gebaseerd op een plant-eigen antiviraal verdedigingsmechanisme dat 'post transcriptional gene silencing' (PTGS) of 'RNA silencing' wordt genoemd. In diverse studies is aangetoond dat de transgene productie van dubbelstrengs RNA (dsRNA) zeer effectief kan zijn in het induceren van dit afweermechanisme. Door het RNA silencing mechanisme worden 21 tot 23 nt kleine 'small interfering RNAs' (siRNAs) gegenereerd middels het knippen van dsRNA door een RNaseIII-achtig enzym (DICER). Volgens de hypothese maken deze siRNAs deel uit van een multimeer endonuclease (RNA-induced silencing complex, RISC) en zorgen zij ervoor dat dit complex specifiek RNA kan knippen dat sequentiehomologie vertoont met het inducerende dsRNA. Om een hogere efficiëntie van inductie van RNA-mediated virus resistentie tegen CMV te bereiken, werden *inverted repeat* construc-

ten, afgeleid van de 3' helft van CMV RNA 2 en RNA 3, gemaakt en getransformeerd naar *Nicotiana benthamiana*. Daar waar de transgene planten die enkelstrengs CMV tot expressie brengen een resistentiefrequentie van hooguit 5% van de S_1 lijnen halen, bleek maar liefst vijftien procent van de geteste R_0 planten die getransformeerd waren met een RNA 2-afgeleid *inverted repeat* construct extreem hoge resistentie tegen CMV te vertonen. Een lager maar nog steeds significant percentage (30%) resistentie in R_0 lijnen werd verkregen met een soortgelijk construct dat een kortere virale RNA 2 sequentie bevatte. Opvallend was dat ook de resistentie die bereikt werd met mantelwit sequenties sterk kon worden verbeterd door gebruik van een *inverted repeat* construct en wel tot een niveau van 50% van de origineel getransformeerde R_0 planten. Van de meeste resistente planten werden S_1 lijnen verkregen die volledig beschermd waren tegen virusinfectie. Deze resultaten tonen aan dat de toepassing van een dsRNA-producerend transgen construct een bijzonder efficiënte benadering is om virusresistente planten te verkrijgen, wat zou kunnen compenseren voor de lage efficiëntie van transformatie van siergewassen.

Conclusies en vooruitblik

Zowel de uitkomsten van de niet-vertaalbaare constructen als de immuniteit van de verkregen transformatanten, duiden er op dat de transgene resistentie door transgeen RNA geïnitieerd wordt. De moleculaire bewijzen hiervoor werden verder versterkt door het bestaan van siRNAs specifiek in resistente lijnen aan te tonen. In vervolgonderzoek zou het interessant zijn om het effect te bestuderen van dsRNA-vormende transformatieconstructen met sequenties van verschillende lengtes en van verschillende delen van het virale genoom, om tot in meer detail te bepalen wat de moleculaire basis van sequentie specifieke resistentie-inductie zou kunnen zijn. Aangezien zowel subgroep I als subgroep II isolaten van CMV aanwezig zijn in sierplanten kan de strategie voor de ontwikkeling van RVMR tegen subgroep I, zoals beschreven in dit proefschrift, ook toegepast worden voor gastheren die vatbaar zijn voor subgroep II stammen, zoals alstroemeria en krokus. Bovendien kan het protocol verder verbeterd worden door gebruik te maken van een transgeen construct dat een dsRNA kan produceren dat genomische sequenties van beide subgroepen bevat en op die wijze een brede bescherming zou kunnen bieden tegen alle isolaten van CMV.

PROMOTIE