

WDV toleráns árpavonalak előállítása CRISPR/Cas9 rendszerrel

Kis András¹, Hamar Éva*^{1,3}, Tholt Gergely², Taller János³ és Havelda Zoltán¹

¹NAIK-Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, 2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert u. 4.

²MTA-ATK Növényvédelmi Intézet, 1022 Budapest, Hermann Ottó. u. 15.

³Pannon Egyetem Fesztetics Doktori Iskola, 8360 Keszthely, Deák Ferenc u. 16.

*e-mail: hamar.eva@abc.naik.hu

Összefoglalás

A növényi vírusok évente akár 10-15%-os veszteséget is okozhatnak a mezőgazdaságban. A fertőzött növények kezelésére nincs mód, így a gyakorlatban jelenleg a megelőzés (vektorszervezetek gyérítése és a helyes vetésidő megválasztása) az egyetlen hatásos védekezési lehetőség. A vegyszeres növényvédelem viszont kettős: anyagi és környezeti terheléssel is jár. A legjobb megoldás vírusokkal szemben ellenálló fajták termesztése, illetve előállítása.

A *Geminiviridae* családba tartozó búza törpülés vírus (wheat dwarf virus-WDV) hazánkban is jelentős károkat okoz az árpa és búzaállományokban. Kutatócsoportunk az elmúlt években mesterséges miRNS-ek segítségével sikeresen állított elő WDV-rezisztens növényeket, viszont az alkalmazott technika csak a vírus DNS genomjáról átíródó RNS-transzkriptumok ellen hatásos (Kis és mtsai, 2016). Ezzel szemben a bakteriális immunrendszer működésén alapuló CRISPR/Cas9 genomszerkesztő rendszer magát a vírus DNS-t képes hasítani, és a létrejövő mutációkkal akár inaktiválni a WDV-t. Jelen munkánk során egy négy guide RNS-t kódoló konstrukciót (WDVGuide4Guard) alkalmaztunk sikerrel árpában. A transzformáns árpavonalak a WDV fertőzésre magas fokú toleranciát mutattak.

Kulcsszavak: WDV, DNS vírus, CRISPR/Cas9, genomszerkesztés, vírus rezisztencia.

Abstract

Plant viruses can cause up to 15% yield loss in agriculture. Nowadays prevention (reducing vector abundance, and choosing the optimal sowing-time) is the only way of antiviral defence. Chemical plant defence has double costs: financial and ecological, so the best solution would be production and breeding of virus resistant crop varieties.

WDV (wheat dwarf virus) - a member of *Geminiviridae* family- causes significant damages in Hungarian wheat and barley cultivation. Over the past years our research group have made an attempt to produce WDV tolerant barley lines with artificial microRNA (amiRNA) technology. Besides this system's relative simplicity, it has several drawbacks too: It affects only the transcripts of WDV genome (Kis et al. 2016). In contrast to amiRNA technology, CRISPR/Cas9 (a genome editing tool from bacteria) can directly cut and inactivate the viral DNA. To increase WDV tolerance in barley, we created the WDVGuide4Guard genetic construct. According to our investigations the transgenic barley lines containing this construct are WDV tolerant.

Keywords: WDV, DNA virus, CRISPR/Cas9, genome editing, virus resistance.

Bevezetés

A búza és árpa törpülését okozó WDV a *Geminiviridae* család *Mastrevirus* nemzetségébe tartozik. A Geminivírusok jellemzője, hogy viszonylag kicsi, (~2730 nt) cirkuláris DNS örökítőanyaggal rendelkeznek, mely kettős ikozahedrális fehérjeburokba csomagolódik. A *Mastrevirus* nemzetség tagjai zömmel egyszikű növényeket károsítanak. Genomjuk tipikus esetben a következő fehérjéket kódolja: i.) a mozgásért felelős MP (movement protein), ii.) a burkoló CP (coat protein), valamint a komplementer szál által kódolt, a vírus replikációjáért felelős iii.) RepA, és iv.) Rep fehérjéket (Parizipour és mtsai, 2016).

Számos búza és árpafajtát teszteltek napjainkig WDV toleranciájuk tekintetében, de teljes rezisztenciát mutató vonalat, vagy éppen rezisztenciagént nem találtak (Benkovics és mtsai, 2010). A vírus elleni védekezést nehézkessé teszi, hogy a WDV DNS genommal rendelkezik. A gyakran növényi immunrendszerként is emlegetett RNS interferencia siRNS útvonala ugyan a virális RNS-átíratok ellen hatásos lehet, de bizonyos növényekben alacsony hőmérsékleten (15°C alatt) nem működik megfelelően (Szittyá és mtsai, 2013). Ezzel a módszerrel elméletben nem alakítható ki teljes WDV rezisztencia. A miRNS útvonal - mely a növény fejlődési folyamatait szabályozza - szintén felhasználható vírusokkal szembeni védekezésre. Kutatócsoportunk korábban kialakított WDV rezisztens vonalakat ezen technika felhasználásával, ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy a mesterséges miRNS-ek (amiRNS) mennyisége szorosan korrelál a vírus mennyiségével. Így csak magas amiRNS expressziót mutató árpa vonalak maradtak vírusrezisztensek (Kis és mtsai, 2016).

A geminivírusokkal szembeni védekezésre a mesterséges mikro RNS technika mellett az elmúlt években megjelent a genomszerkesztés új módszere a CRISPR/Cas9 rendszer. Ez a

baktériumoktól származó technológia lehetővé teszi, hogy a komplementaritás elvén az általunk megválasztott 20 nt-os célszekvenciáknál hajtsunk végre módosításokat eukarióta, illetve jelen esetben a vírus genomokban. A Cas9 fehérje funkcióját tekintve endonukleáz, így a megfelelő, ún. guide RNS-sel (gRNS) komplexben (ami a szekvenspecifitást biztosítja) duplaszálú törést képes létrehozni DNS-en (Havelda és Kis, 2017). Ennek előnye az RNS interferenciára épülő eljárásokkal szemben, hogy nem a virális RNS-ek szintjén hat, hanem magát a WDV DNS-ét károsítja.

A CRISPR/Cas9 rendszer segítségével, tartós WDV rezisztenciát lehetünk képesek kialakítani gabonafélékben a vírusgenom inaktiválása révén. A megfelelő egyszikűekre kodonoptimalizált Cas9 endonukleáz és a WDV genomján kiválasztott 4 célszekvenciával komplementer gRNS-t expresszáló transzformációs kazetta bejuttatásával olyan árpavonalak állíthatók elő, melyekben a kórokozó replikációja és terjedése gátolt.

Anyag és módszer

pHUE411 vektorrendszer

A 4 guide RNS-t kódoló konstrukciónk előállításához Xing és munkatársai (2014) által létrehozott vektorrendszert alkalmaztuk. Az általuk közzétett bináris vektor (pHUE411) egy kukorica-kodonoptimalizált, konstitutív promóterrel meghajtott Cas9 gén mellett 1-4 általunk megválasztott ún. single-guide RNS expressziójára képes egyszikűekben.

Agrobacterium-mediált növénytranszformáció

Az árpa stabil genetikai transzformációjához az *A. tumefaciens* AGL-1 törzsét használtuk. Explantként árpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden promise) éretlen embriót alkalmaztunk (Harwood és mtsai., 2014).

WDV-fertőzés

A transzformáns árpa növényeket egy hetes WDV fertőzésnek vetettük alá a vírus természetes vektorával, a csikos gabonakabócával (*Psammotettix alienus* Dhalbom; Hemiptera, Cicadellidea). A fertőzendő növények kiválasztott levelére kabócákat tartalmazó izolátort helyeztünk, majd a rovarok táplálkozásuk során bejuttatták a kórokozót az árpa szállítósöveibe.

Eredmények

Létrehoztuk a WDVGuide4Guard konstrukciót, amely tartalmaz egy konstitutív promóterrel (Ubi1) ellátott, kodonoptimalizált Cas9- és négy guideRNS (sg02, sg09, sg17, sg19) gént. Ezek a

WDV genom különböző szegmenseit célozzák: egy a szabályozó régiót (LIR), egy a mozgási fehérje és burokfehérje átfedő kódrégióját és kettőt terveztünk a replikáz génre, mely a vírusgenom replikációjához nélkülözhetetlen. Ezzel transzformáltunk tavaszi árpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Golden promise) éretlen embriókat.

4 független transzformáns árpa vonalat egy hetes WDV fertőzésnek vetettük alá kabóca vektorral, majd molekulárisan vizsgáltuk a vírus jelenlétét és figyeltük a WDV fertőzés makroszkopikusan is észlelhető tüneteit (törpülés, sárgulás, sterilitás). A konstrukciónkat tartalmazó árpavonalak a kontroll vad típusú növényekhez hasonlóan növekedtek és kalásztak. A teljes növényre jellemző törpülés, amit a fertőzött vad típusú növények mutattak, nem volt rajtuk észlelhető. A vírus jelenlétét a négy közül csak egy vonalból tudtuk kimutatni northern hibridizáció segítségével. A WDVGuide4Guard által kódolt 4 guide RNS közül 3 expresszióját tudtuk igazolni RT-PCR segítségével, viszont csak egynek (sg17) a működését voltunk képesek bizonyítani a vírusgenomon okozott mutáción keresztül.

Megvitatás

A klímaváltozás kedvez a növényi víruskórokozók vektorainak, így a WDV-t terjesztő csíkos gabonakabócának is. Az egyre gyakoribbá váló vírusfertőzések és a következményként jelentkező termésveszteség ellen – WDV rezisztens búza, illetve árpafajták hiányában - eddig csak a vektorszerkezet vegyszeres gyérítése és a vetésidő helyes megválasztása jelentett megoldást.

Eredményeink bizonyítják, hogy a prokariótákban kialakult CRISPR/Cas9 „immunrendszer” hatékonyan használható növényekben a DNS vírusokkal szemben. Az általunk tervezett WDVGuide4Guard konstrukciót sikerrel alkalmaztuk vírustolerancia kialakítására árpában. A 4 alkalmazott guide RNS közül (sg02, sg09, sg17, sg19), 3 expresszált, illetve csak egy (sg17) működött bizonyítható módon a vizsgált vonalakban.

A tolerancia kialakítása is hasznos módszer a víruskórokozóval szembeni küzdelem során, de a cél a teljes rezisztencia elérése. Ezért a jövőben olyan több guide RNS-t kódoló transzformációs kazettát tervezünk előállítani, melyben az összes gRNS bizonyíthatóan működik. Ehhez egy tranzien্স expressziós rendszert lenne szükséges kidolgozni, amiben külön vizsgálhatjuk az egyes guide-ok biológiai aktivitását. Az ilyen módon tesztelt, bizonyíthatóan működőképes gRNS-ekkel, ha szimultán több helyen okozunk mutációt a WDV örökítőanyagán, vagy egyszerre történik meg a cirkuláris vírusgenom hasítása a célszekvenciáknál, nagyobb eséllyel válik működésképtelenné a kórokozó.

Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését az NKFI OTKA K116602, és az EFOP-3.6.3- VEKOP-16- 2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Hivatkozások

- Benkovics A. H., Vida Gy., Nelson D. 2010. Partial resistance to wheat dwarf virus in winter wheat cultivars. *Plant Pathology* 59. 1144-1151.
- Harwood W. A. 2014. A protocol for high-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. In: *Cereal Genomics*: Robert J. H., Furtado H. Springer Science and Business Media, New York 251-260.
- Havelda Z., Kis A. 2017. Genomszerkesztés a növényi vírusrezisztencianemesítés szolgálatában. In: *Precíziós nemesítés– Kulcs az agrárinnovációhoz*. Balázs E., Dudits D. Agroinform Budapest 96-105.
- Kis A., Tholt G., Ivanics M., Várallyay É., Jenes B., Havelda Z. 2016. Polycistronic artificial miRNA-mediated resistance to wheat dwarf virus in barley is highly efficient at low temperature. *Molecular Plant Pathology* 17. 427–437.
- Parizipour M. H., Schubert J., Behjatnia S. A. A., Afsharifar A., Habekuß A., Wu B. 2016. Phylogenetic analysis of wheat dwarf virus isolates from Iran. *Virus Genes* 53. 266–274.
- Szittyá, G., Silhavy, D., Molnar, A., Havelda, Z., Lovas, A., Lakatos, L. Banfalvi, Z., Burgyan, J. 2003. Low temperature inhibits RNA silencing-mediated defence by the control of siRNA generation. *The EMBO Journal* 22. 633-640.
- Xing H., Dong L., Wang Z., Zhang H., Han C., Bing L. B., Wang X., Chen Q. 2014. A CRISPR / Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biology* 14. 327.