

S Z E M L E

Növényvédelem génebeszeti úton létrehozott vírus-specifikus interferáló molekulák segítségével

D. NAGY PÉTER—*BALÁZS ERVIN

MTA Növényvédelmi Kutató Központ,

Budapest

*Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont,

Gödöllő

Az *in vitro* rekombináns DNS technika alkalmazását a növényvirológiai kutatásokban jelentősen megnehezítette, hogy a legtöbb növényi vírus messenger RNS polaritású RNS genommal rendelkezik, és szaporodásuk során nem keletkezik DNS intermedier. A technikai áttörést néhány évvel ezelőtt az jelentette, hogy a virális RNS genomról készült DNS másolatot (kópia DNS = cDNS) egy specifikus bakteriális promóter szekvencia után építették be, amelynek segítségével a cDNS-ről ismételtén egyszálú RNS molekulát lehetett szintetizáltatni *in vitro* (Melton *et al.* 1984). E módszer segítségével sikerült fertőzőképes növényi vírust is szintetizálni (Ahlquist *et al.* 1984). A fenti technika lehetővé teszi, hogy rutin génebeszeti módszerekkel a szükséges átalakításokat a cDNS intermedieren elvégezzük, majd azután biológiailag aktív RNS molekulákat szintetizáltassunk mind az *in vivo*, mind az *in vitro* kísérletekhez.

A másik jelentős technikai újítást a növényi molekuláris biológiában érték el: kidolgozták a növényi transzformációs rendszereket (Herrera-Estrella *et al.* 1983). Az „idegen”, kiválasztott gént az *Agrobacterium tumefaciens* átalakított Ti plazmidja segítségével bejuttatták a növényi sejtekbe, amelyeket azután teljes növényekké regeneráltattak. A transzformált sejtekből felnevelt növények minden sejtje tartalmazta az „idegen” gént, amely a mendeli öröklődés szabályai szerint az utódokba ivaros úton is átjutott.

A fent említett két módszer új lehetőségeket tárt fel a molekuláris növényvirológia és a vírusok elleni növényvédelem számára. Igéretes-

nek látszik, hogy a vírusok replikációjával interferáló molekulák növényekbe történő bejuttatásával vírusrezisztens növényeket állítsunk elő anélkül, hogy ez a környezetre veszélyt jelentene. Dolgozatunkban vázoljuk a már elért, vagy várhatóan a közeljövőben megvalósuló eredményeket, illetve újabb lehetőségekről adunk rövid áttekintést.

Az interferáló molekula: a vírusok köpenyfehérjeje

A növények vírusok elleni rezisztenciájának egyik régóta jól ismert esete az ún. keresztvédettség (cross-protection) – az a mechanizmus, amelynek segítségével az első vírushatározó meggátolja az időben második, rokon vírus fertőzésének kialakulását (Hamilton 1980). Rendszerint az első (védő) törzs enyhe tüneteket okoz, olykor tünetmentes és a növényekben megakadályozza egy súlyos tüneteket előidéző törzs felülfertőződésének kialakulását (Fulton 1986). Sajnos a keresztvédettség mechanizmusa pontosan nem ismert. Mivel a kísérleti adatokból származó feltételezések szerint a védettség kialakításában legnagyobb valószínűséggel az első törzs burokfehérjéjének vagy nukleinsavának van szerepe, ezért nem meglepő, hogy számos laboratóriumban kezdtek el a különböző vírusok köpenyfehérje géneinek beépítését olyan növényekbe, amelyek az adott vírussal szemben fogékonyak. Így állítottak már elő transzgenikus dohány-növényeket, amelyek a dohány mozaik vírus (tobacco mosaic virus = TMV), a lucerna mozaik vírus (alfalfa mosaic virus = AIMV) és a burgonya X vírus (potato X virus = PVX) köpenyfehérjét termeltek (Powell-Abel *et al.* 1986, Turner

et al. 1987, Loesch-Fries et al. 1987, Van Dun et al. 1988, Cuozzo et al. 1988, Hemenway et al. 1988). Ezt úgy érték el, hogy az adott vírus köpenyfehérjéjét kódoló gént klónozták, majd azt a kelvirág mozaik vírus (CaMV) 35S promóteréhez kapcsolták és a fent említett Ti plazmid vektor segítségével bejuttatták az adott vírussal szemben fogékony dohány sejtjeibe.

A regenerált növények jelentős mennyiségű köpenyfehérjét termeltek (0,05–0,1%-át a levél fehérjetartalmának) és rezisztensek voltak az adott vírussal szemben (Beachy et al. 1987). A rezisztencia csak az adott vírus és annak közeli rokonai ellen nyilvánult meg. A TMV köpenyfehérje génjével már paradicsomot is transzformáltak, sőt a transzformált növényeket szántóföldön is vizsgálták (Nelson et al. 1988). Az eredmény felettébb biztató volt: a transzgenikus növények rezisztensek bizonyultak a TMV-vel és közeli rokon paradicsom mozaik vírussal (tomato mozaik vírus = ToMV), valamint annak két olyan törzsével szemben is, amelyek még a Tm-2-es rezisztenciagént is átöröközik. Míg a kontroll növényeknél 25–35%-os termésvesztést okozott a ToMV fertőzés; addig a transzgenikus növényeknél nem volt mérhető a veszteség. A transzgenikus növények agronómiai sajátosságai megegyeztek a kontroll növényekével.

Az interferáló molekula: vírus specifikus RNS, „antivírus”

Az előző részben említett keresztvédettség kialakulásában a „védő” törzs köpenyfehérjéjén kívül annak nukleinsava is részt vehet: az időben második vírus fertőzését azáltal gátolja az első vírus, hogy az extra mennyiségben jelenlevő RNS-e hibridizál a második vírus RNS-ével, meggátolva annak replikációját (Palukaitis-Zaitlin, 1984). A génebézsét korábban ismerttetett új módszereivel ehhez hasonló rendszert lehet felépíteni: a vírusgenom kiválasztott részéről készített cDNS-t egy növényi vektor segítségével bejuttatva a növényekbe elérhető, hogy azok (–) szálú virális RNS-t termeljenek. A fenti elmélet szerint a transzgenikus növényekben szintetizálódott vírus-specifikus RNS interferálni (hibridizálni) fog a sejtekbe (az inokuláció során) bejutó, szekvenciában azonos, vagy közel azonos vírus RNS-ekkel.

A kísérleteket már elvégezték néhány vírus esetén (Cuozzo et al. 1988, Hemenway et al. 1988). A rezisztencia azonban csak alacsony vírus koncentrációjú, inokulum esetén nyilvánult meg. Elképzelhető, hogy a termelődött

vírus specifikus RNS mennyisége nem érte el azt a mennyiséget, amelyet a keresztvédettségi reakció során az indukáló vírus képez.

A fenti stratégia (az ún. antisense RNS-ekkel indukált rezisztencia) gyengesége, hogy a vírusfertőzés hatására nem amplifikálódó (sokszorozódó) RNS-eket használ fel.

Az interferáló molekula: szatellit RNS

Néhány növényi RNS vírus izolátumban találtak kicsi és az adott vírus szekvenciájával nem homológ RNS-eket is, amelyek a replikációjukhoz igénylik az adott vírust (helper vírus); és gyengíthetik, illetve akár teljesen meg is szüntethetik a helper vírus által okozott tüneteket (Francki 1985, Simon 1988). A szatellit RNS-ek nemcsak a tüneteket gyengítik, hanem a segítő vírus replikációját is jelentős mértékben visszaszorítják. Ezen megfigyelések előrevetítették a szatellit RNS-ekkel történő védekezés lehetőségét.

A szatellit RNS-ről készített cDNS-t egy növényi transzformációs vektor segítségével bejuttatták a növényi genomba. A szatellit cDNS inaktív maradt mindaddig, amíg egy segítő (helper) vírus meg nem fertőzte a növényt. A fertőzés létrejöttkor az aktiválódott, és visszaszorította a helper vírus szaporodását, illetve gyengítette a tüneteket. Sikertült ily módon a transzgenikus növényeket védetté tenni CMV (Harrison et al. 1987), illetve cseresznye levélsodródás vírus (cherry leafroll vírus = CLRV) ellen (Rowhani et al. 1989). A fenti kísérletek során a természetes szatellit RNS-ekről készített cDNS „kiszabadulhat” a transzgenikus növényekből, azaz vírusvektorok segítségével átjuthat más növényekbe és ez hozzájárulhat az adott szatellit RNS természetbeni széles körű elterjedéséhez.

A „kiszabadult” szatellit RNS más növényeken esetleg nem gyengíti, hanem fokozza a segítő vírus okozta tüneteket (új patogén vírus-törzs alakulhat ki). Ez a védekezési rendszer csak azon kis számú vírus ellen dolgozhat ki, amelynek van szatellit RNS-e. Az első két probléma áthidalására már elkezdődtek a kísérletek: olyan szatellit cDNS-ek előállítására a cél, amelyek interferáló képességük megőrzése mellett elveszítik terjedő képességüket (Baulcombe et al. 1989).

Az állati vírus fertőzése során gyakran keletkeznek ún. defektív interferáló – DI – molekulák (Huang-Baltimore 1970), amelyek visszaszorítják a „szülő” vírus replikációját. Ezek között a DI molekulák között találhatóak nagy

kompetícióval és egyben amplifikációs képességgel is rendelkezők. Az utóbbi években a növényvírusoknál is találtak hasonló molekulákat (Hillman *et al.* 1987, Burgyán *et al.* 1989). Ezen DI molekulák, illetve mesterségesen előállított társaik ígéretes jelöltek a vírusok elleni rezisztens transzgenikus növények előállítására.

Az interferáló molekula: ribozim

Az előző alfejezetben említett egyes szatellit RNS-ek molekuláris analízise feltárta, hogy azok replikációs folyamatában van egy lépés, amelyben a szatellit RNS replikációja során szintetizálódott ún. konkatamer – fej-farok irányítottágú, ismétlődő – RNS szerkezet Mg^{++} ionok jelenlétében monomer szatellit-egységekre hasad (self-cleavage) (Buzayan *et al.* 1986, Forster–Symons 1987/a). A konkatamer RNS hasításáért felelős nukleinsav régiót már azonosították (Forster–Symons 1987/a/b). Ez két részből áll: a szubsztrátból és az ún. ribozimból. A ribozim egy 38 nukleotidból álló kalapács fejre hasonlító struktúrájú (hammer-head structure) RNS. Ezt a „gén ollót” (gene shears) már sikeresen építették ki RNS molekulákban (Haseloff–Gerlach 1988). Mivel a „gén olló” *in vitro* már működik, a következő

lépés RNS vírusok célzott megsemmisítésére alkalmas ribozimok létrehozása, majd ezen ribozimokat termelő transzgenikus növények előállítása.

A bevezetőben már említettük, hogy a molekuláris növényvirológia eredményei nemcsak a vírusok elleni növényvédelemben ígérnek áttörést, hanem a növényi molekuláris biológia robbanásszerű fejlődéséhez is hozzájárulnak. A növényi vírusoknak ugyanis olyan géneik vannak, amelyek a fogékony növényekben aktiválódnak. Egyrészt hasznos modellek a növényi génműködés tanulmányozásában, másrészt génszállító vektorok készíthetők növényi vírusokból.

A növényi biotechnológia, s azon belül a növényi molekuláris virológia új távlatokat nyitott a kórokozó vírusok elleni nem hagyományos növényvédelemben. Napról napra jelennek meg új eredmények ezen a területen. A kísérleti eredmények ma már nemcsak *in vitro* adatok, hanem a szántóföldön is kipróbálásra kerültek. A kezdeti sikeres kísérletek azzal kecsegtetnek, hogy a közeljövőben sikerül a vírusok okozta betegségeket visszaszorítani.

Összefoglalás

A génebézészet jelenlegi haladása képes új technikát adni a növényvédelmi kutatók számára. Ez a rövid közlemény összefoglalja az adatokat a vírus köpenyfehérjék által kialakított keresztimmunitásról, defektív részecskékről (DI), további adatokat szolgáltat az „antisense” virális szekvenciákat használó védelemről, valamint virális RNS enzimeket használó védelemről is.

IRODALOM

1. Ahlquist, P.–Janda, M.: 1984. cDNA cloning and *in vitro* transcription of the complete brome mosaic virus genome. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2876–2882. – 2. Baulcombe, D.–Jaegle, M.–Devic, M.: 1989. Refinement of the satellite RNA of cucumber mosaic virus for use in the control of virus infection. 2nd. Int. Symp. on positive strand RNA viruses. Vienna – 3. Beachy, R. N.–Powell Abel, P.–Nelson, R. S.–Register, J.–Tumer, N.–Fraley, R. T.: 1987. Genetic engineering of plants for protection against of viral diseases. In: Plant resistance to viruses. Ciba Found Symp. 133. pp. 151–158. Wiley/Chichester. – 4. Burgyán, J.–Grieco, F.–Russo, M.: 1989. A defective interfering RNA molecule in cymbidium ringspot virus infections. *J. Gen. Virol.* 70, 235–239. – 5. Buzayan, J. M.–Gerlach, W. L.–Bruening, G.: 1986. Non-enzymatic cleavage and ligation of RNAs complementary to a plant virus satellite RNA. *Nature* 323, 349–353. – 6. Cuzzo, M.–O'Connell, K. M.–Kaniewski, W.–Fang, R.–X. Chua, N. H.–Tumer, N. E.: 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6, 549–557. – 7. Francki, R. I. B.: 1985. Plant virus satellites. *Annu. Rev. Microbiol.* 39, 151–174. – 8. Forster, A. C.–Symons, R. H.: 1987/a. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49, 211–220. – 9. Forster, A. C.–Symons, R. H.: 1987/b. Self-cleavage

of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell* 50, 9–16. – 10. *Fulton, R. W.*: 1986. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 67–81. – 11. *Hamilton, R. I.*: 1980. Defences triggered by previous invaders: viruses. In: *Plant disease: an advanced treatise* (eds. J. G. *Horsfall* and E. B. *Cowling*) Vol. 5. pp. 279–299. Academic Press/New York. – 12. *Harrison, B. D.–Mayo, M. A.–Baulcombe, D. C.*: 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328, 799–802. – 13. *Haseloff, J.–Gerlach, W. L.*: 1988. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature* 334, 585–591. – 14. *Hemenway, C.–Fang, R. X.–Kaniewski, W. K.–Chua, N. H.–Tumer, N. E.*: 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* 7, 1273–1280. – 15. *Herrera-Estrell, L.–Depcker, A.–Van Montagu, M.–Shell, J.*: 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using Ti-plasmid derived vector. *Nature* 303, 209–213. – 16. *Hillman, B. I.–Carrington, J. C.–Morris, T. J.*: 1987. A defective interfering RNA that contains a mosaic of plant virus genome. *Cell* 51, 427–433. – 16. *Huang, A. S.–Baltimore, D.*: 1970. Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226, 325. – 18. *Loesch-Fries, L. S.–Merlo, D.–Zinnen, t.–Burhop, L.–Hill, K.–Krahn, K.–Jarvis, N.–Nelson, S.–Halk, E.*: 1987. Expression of alfalfa mosaic virus RNA4 in transgenic plants confers virus resistance. *EMBO J.* 6, 1845–1851. – 19. *Melton, D. A.–Krieg, P. A.–Rebaqliati, M. R.–Maniatis, T.–Zinn, K.–Green, M. R.*: 1984. Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA hybridisation probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acid. Res.* 12, 7035–7056. – 20. *Nelson, R. S.–McCormick, S. M.–Delanny, X.–Dube, P.–Layton, J.–Anderson, E. J.–Kaniewska, M.–Proksch, R. K.–Horsch, R. B.–Rogers, S. G.–Fraleay, R. T.–Beachy, R. N.*: 1988. Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 6, 403–409. – 21. *Palukaitis, P.–Zaitlin, M.*: 1984. A model to explain the „Cross-protection” phenomenon shown by plant viruses and viroids. In: *Plant-microbe interactions molecular and genetic perspectives*. (Eds. T. Kosuge–E. W. Nester), pp. 420–429. Macmillan/New York. – 22. *Powel Abel, P.–Nelson, R. S.–De, B.–Hoffmann, E.–Forgers, S. G.–Fraleay, R. T.–Beachy, R. N.*: 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738–743. – 23. *Rowhani, A.–Ponz, F.–Daubert, D. S.–Mircetich, S. M.–Bruening, G.*: 1989. Restriction of cherry leafroll virus in cowpeas and walnut by satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Recognition and response in plant-virus interactions NATO Advanced Research Workshop Chichester, West Sussex UK 12–16 April (Abstract)*. – 24. *Simon, A. E.*: 1988. Satellite RNAs of plant viruses. *Plant Molec. Biol. Reporter* 6, 240–252. – 25. *Tumer, N. E.–O’Connell, K. M.–Nelson, R. S.–Sanders, P. R.–Beachy, R. N.–Fraleay, R. T.–Shah, D. M.*: 1987. Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J.* 6, 1181–1189. – 26. *Van Dun, C. M. P.–Bol, J. F.–Van Vloten-Doting, L.*: 1988. Expression of alfalfa mosaic virus and tobacco rattle virus coat protein genes in transgenic tobacco plants. *Virology* 159, 299–305.

Érkezett: 1990. január 5.

A szerzők levélcíme – Address of the authors:

Dr. D. Nagy Péter
MTA Növényvédelmi Kutató Intézete
Budapest
P. O. Box. 102.
H–1525

Dr. Balázs Ervin
Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutató Központ
Gödöllő
P. O. Box. 170.
H–2101

Plant protection using genetically engineered virus-specific molecules

D. NAGY—*E. BALÁZS

**Plant Protection Institute Hungarian Academy of Sciences,
Budapest**

***Agricultural Biotechnology Research Center,
Gödöllő**

Summary

Recent advances in the genetic engineering enable the researcher to develop control techniques for plant protection. This short paper summarizes the data on the coat protein mediated cross protection, data on the interfering particles (DI), and gives details on the protection using antisense viral sequences, and on the protection using viral RNA as enzyme.