

Wirus M ziemniaka: klonowanie genomowych kopii izolatów o odmiennej patogenności

Izabela Walczak¹

Andrzej Pałucha²

Marek Juszczuk²

Tomasz Muchalski³

Urszula Szybiak-Stróżycka¹

¹Katedra Biochemii i Biotechnologii,
Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego
Poznań

²Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk
Warszawa

³Instytut Ziemniaka
Młochów

1. Wstęp

1.1. Badania molekularne wirusów roślinnych

Śpośród około 800 znanych wirusów roślinnych (1) szczególne znaczenie przypisuje się wirusom roślin uprawnych, przede wszystkim ziemniaków. Wirusy ziemniaka, sklasyfikowane w kilka grup taksonomicznych (Potex, Poty, Luteo, Carla etc.) powodują rokrocznie poważne straty plonów. Prace badawcze: podstawowe i aplikacyjne mają na celu, poprzez poznanie molekularnych mechanizmów infekcji i opracowanie odpowiednich metod diagnostycznych, doprowadzenie w konsekwencji do zwalczania chorób wirusowych, bądź ograniczenia ich skutków.

Wirusologia molekularna roślin koncentruje się na: 1) badaniu sekwencji i ekspresji genomów wirusowych, 2) wyjaśnianiu molekularnych oddziaływań roślina/wirus, 3) opracowywaniu odpowiednich metod diagnostycznych oraz 4) konstruowaniu roślin transgenicznych odpornych na określone patogeny.

W ostatnich latach techniki biologii molekularnej, jak się wydaje, wypierają, bądź znacząco uzupełniają dotychczasowe metody. Zastosowanie **metod hybrydacyjnych** z użyciem odpowiednich sond molekularnych, a zwłaszcza wprowadzone z początkiem lat dziewięćdziesiątych wykorzystanie **reakcji łańcuchowej polimerazy** (PCR) dokonało przewrotu w diagnostyce chorób

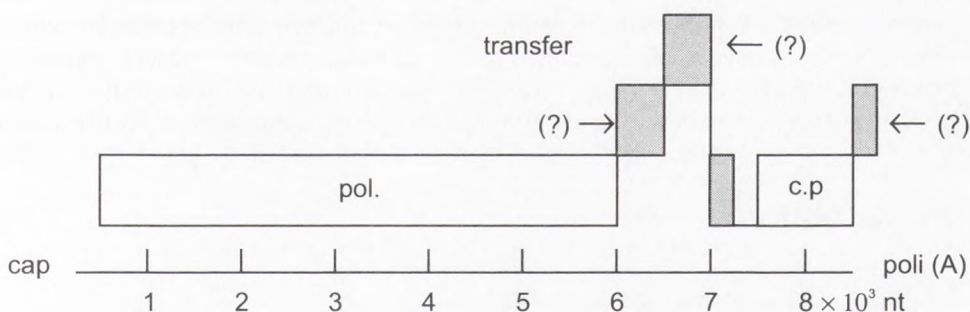
wirusowych (2). **Technika PCR** stosowana na szeroką skalę w medycynie, toruje sobie pomalą drogę również w praktyce rolniczej (3). Można ją zastosować zarówno do identyfikacji jakościowej i ilościowej wirusów jak i do precyzyjnego określenia ich populacji i genetycznej różnorodności (4,5). PCR posłużyła m.in. do analizy sekwencji, a także charakterystyki zmienności genetycznej luteowirusów (6), potywirusów (7) i geminiwirusów (5,8).

Duże nadzieje wiąże niektórzy z uzyskiwaniem **roślin transgenicznych**, odpornych na określonego wirusa(y) wskutek wprowadzenia do genomu roślinnego specyficznych genów wirusowych, np. dla białka kapsydu, wirusowej polimerazy, bądź dodatkowych białek wirusa (9-11). Próbuje się też wyłączać genów wirusowych *in situ*, przy użyciu tzw. **antysensowych RNA** (12,13). W istocie opisane działania stanowią **substytucję szczepień** przeciw-wirusowych stosowanych u ludzi i zwierząt. Rośliny, pozbawione charakterystycznego dla zwierząt układu odpornościowego, nie mogą być immunizowane; dlatego wprowadza się na trwałe geny wirusowe do ich genomów. Produkowane w transgenicznej roślinie białka określonego wirusa wywołują w niej odporność wobec tego wirusa — nie znane są jednak, jak dotąd, powody i mechanizmy tej odporności. Dlatego często podkreśla się niebezpieczeństwa potencjalnych zagrożeń dla roślin oraz możliwość (na przykład drogą krzyżowych enkapsydacji) rozprzestrzeniania się wirusów na nowe gatunki roślin. Wyjątkową obawę wywołuje ryzyko powstawania *in vitro* nowych, szczególnie zjadliwych wirusów i ich niekontrolowanego rozprzestrzeniania się w przyrodzie. „Do we let history repeat itself?” — bije na alarm M. de Zoeten — jeden z pionierów wirusologii molekularnej (14).

W kontekście tych rozważań trzeba wspomnieć o naturalnej **genetycznej odporności roślin** na infekcje wirusowe (15). Tu otwiera się, naszym zdaniem, najszersze pole dla badań podstawowych. Dopiero bowiem molekularne określenie poszczególnych etapów oddziaływań roślina/wirus (nb. bardzo słabo poznanych), może doprowadzić do wyodrębnienia czynników odpowiedzialnych za odporność genetyczną roślin. Wówczas to można będzie próbować świadomego przenoszenia genów (czynników) odporności do roślin podatnych. Na razie robi się to niejako na oślep, np. drogą fuzji somaklonalnych, czy też fuzji protoplastów. Technika PCR, zwłaszcza w połączeniu z innymi metodami, np. tzw. *random amplified polymorphic DNA analysis* (RAPD) może tu oddać nieocenione usługi (4,16).

1.2. Analiza molekularna wirusa M ziemniaka

Opublikowana w roku 1981 przez U. Szybiak i A. Legockiego praca pt. *Translation in vitro of ribonucleic acids from PVX, PVM and WCLMV* była pierwszą na świecie publikacją opisującą ekspresję genomu wirusów ziemniaka. Jej wyniki stanowią do dziś wielokrotnie cytowany materiał źródłowy (17). Obecnie liczni biolodzy molekularni zajmują się tą ważną gospodarczo grupą wirusów. W Polsce badania molekularne wirusów ziemniaka prowadzone są w IBB PAN w Warszawie (pracownie W. Zagórskiego i D. Hulanickej) we współpracy z Instytutem Ziemniaka w Młochowie. Znana jest dziś



Rys. 1. Organizacja genomu karlawirusów i potexvirusów. Długość genomu 8500-9000 nt; białka o nieznannej funkcji — (?); c.p. — białko kapsydu, pol. — RNA zależna, wirusowa polimeraza RNA; transfer — wirusowe białko transferu międzykomórkowego.

całkowita lub częściowa sekwencja nukleotydów kilku wirusów ziemniaka (m.in. PVX (18,19), PLRV (20), PVY (21), a także PVM (22,23) i PVS (24,25).

Wirusy PVM i PVS badane były przez U. Szybiak na początku lat osiemdziesiątych. Badania dotyczyły organizacji i ekspresji genomów, analizy białkowych produktów translacji oraz identyfikacji subgenomowych RNA (17). Pod koniec lat osiemdziesiątych grupa badaczy pod kierunkiem J. Atabekova rozpoczęła analogiczne prace, określając ponownie strategię genomów PVX i PVM (19,23) oraz dowodząc pokrewieństwa sekwencyjnego potex- i karlawirusów.

Wirus M ziemniaka (z ang. *Potato Virus M* — PVM) jest przedstawicielem grupy karlawirusów (26). Jego genom stanowi pojedyncza nić (+) RNA o długości około 8530 nt. Genom wirusowy zawiera „cap” (m^7G) na końcu 5' oraz sekwencję poli (A) na końcu 3'. Charakteryzuje go występowanie tzw. potrójnego bloku genów (patrz rys. 1), typowego także dla potexvirusów. Funkcjonalną rolę przypisano, jak dotąd, jedynie genom: wirusowej polimerazy, wirusowego białka kapsydu oraz (ewentualnie) białka transferu międzykomórkowego. Udział w ekspresji genomu PVM pozostałych genów wirusa nie jest wyjaśniony.

2. Cel i przedmiot badań

Celem badań było sklonowanie dwu szczepów (izolatów) wirusa M ziemniaka o skrajnie różnej patogeniczności. Klonowanie stanowiło wstępny etap zakrojonych na szerszą skalę badań zmienności wirusów roślinnych oraz molekularnych oddziaływań między rośliną a wirusem.

Przedmiot badań stanowiły: łagodny izolat PVM 57 oraz zjadliwy izolat tego samego wirusa — PVM Uran. Oba izolaty zostały wyprowadzone przez badaczy Instytutu Ziemniaka w Młochowie (27, 28) i tam były przez nas hodowane.

Infekcja PVM 57 wywołuje u roślin łagodne objawy chorobowe: brązowienie nerwów liściowych, deformację górnych liści, czasem nawet przebiega bezobjawowo. Natomiast PVM Uran silnie poraża rośliny: obserwuje się plamy nekrotyczne i chlorozy, deformację liści oraz wyraźne karłowacenie roślin.

3. Wyniki badań

3.1. Hodowla wirusów. Izolacja PVM

Rośliny pomidora zainfekowano dwoma izolatami PVM: zjadliwym szczepem Uran oraz łagodnym — 57. Izolację obu szczepów wirusa prowadzono wg własnej oryginalnej procedury (17), w połączeniu z klasyczną metodą Tavantzisa (29). Ze 150 g liści uzyskano: 5,8 mg PVM Uran oraz 5,9 mg PVM — 57. Odpowiadało to przewidywanej ilości RNA — około 290 µg.

3.2. Izolacja RNA z badanych wirusów

PVM Uran (4 mg) i PVM 57 (4 mg) poddawano kolejno: 1) deproteinizacji rodnikiem guanidyny, 2) ekstrakcji RNA mieszaniną fenol : chloroform i jego wytrącaniu izopropanolem lub etanolem. Używano zestawu gotowych odczynników firmy Promega. Uzyskano z 4 mg wirusa: 190 µg RNA Uran oraz 180 µg RNA 57. Przy założeniu, że RNA stanowi ok. 5% cząstki PVM odpowiada to niemal 100% wydajności metody.

3.3. Synteza c DNA na matrycy PVM-RNA Uran oraz PVM-RNA 57

Materiałem wyjściowym do wszelkiego rodzaju prac nad wirusem o genomie zbudowanym z RNA jest odpowiednio zsyntetyzowane, dobrej jakości cDNA genomowe. Otrzymywanie pełnej długości cDNA wirusowego jest obecnie ułatwione przez użycie nowego typu mieszanin enzymatycznych. Podczas badań zastosowano początkowo zestaw RiboClone® cDNA Synthesis System (Promega), lepsze wyniki uzyskano jednak używając zestawu SuperScript Preamplification System (Gibco BRL). W obu przypadkach starter stanowiła 16-nukleotydomowa cząsteczka oligo dT (pamiętajmy, że karlawirusy są poliadenylowane na 3' końcu).

W rezultacie uzyskano cDNA obu szczepów PVM o całkowitej długości genomu — ok. 8500 nt!

3.4. Amplifikacja RT-PCR cDNA dwu izolatów PVM

Reakcje PCR prowadzono przy użyciu zestawu enzymatycznego *Expand Long Template System* (Boehringer) oraz zestawu starterów zsyntetyzowanych na bazie klasycznych starterów karlawirusów (30), a także opublikowaną sekwencję rosyjskiego szczepu PVM (23). Stosowano następujące startery:

Vp1

5' GGGTCTAGATAATACGACTCACTATAGTAAACAAACATACAATATCTGGACTTAC 3'

Vp2

5' TTAGTCCTCTCTGACACCGCGGAGATG 3'

Vp3

5' ATTTACATCTCCGCGGTGTCAGAGAGG 3'

Vp4

5' GGGTCTAGACGCGTTTTTTTTTTGGCTAAAAATAGTTAAAAACCCAG 3'

Startery Vp1 i Vp4 zawierały sekwencję dla enzymu restrykcyjnego *Xba*I, natomiast Vp2 i Vp3 — miejsce cięcia *Sac* II. Starter Vp1 posiadał dodatkowo sekwencję promotora polimerazy T₇, umożliwiającą przyszłą analizę ekspresji genów wirusowych *in vitro*.

50 μl mieszaniny reakcyjnej zawierało: 1-5 μl cDNA, 2 μl 10 mM dNTP, 50 pmoli starterów (2,5 μl), 5 μl buforu dla polimerazy, 2,5 jednostek enzymu (Expan Long Template PCR System) oraz sterylną, dejonizowaną wodę.

Amplifikacja przebiegała według następującego programu:

Dla syntezy pełnej długości nici DNA: wstępna denaturacja 94°C — 2 min; **10 cykli:** 94°C — 10 sek; 55,7°C — 30 sek; 68°C — 6 min 30 sek; **20 cykli:** jak wyżej, z tym, że każdy kolejny etap elongacji wydłużano o dodatkowe 10 sek; elongacja w ostatnim cyklu — 10 min.

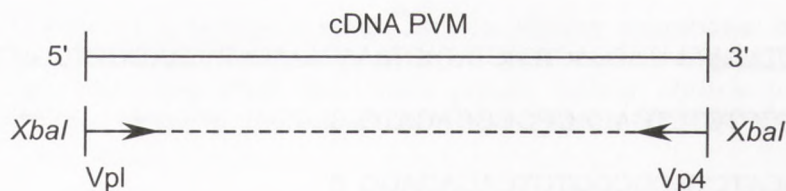
Dla syntezy nici DNA w dwóch fragmentach: wstępna denaturacja 94°C — 2 min; **10 cykli:** 94°C — 10 sek; 55,8°C — 30 sek; 68°C — 3 min 30 sek; **20 cykli:** jak wyżej, z tym że każdą kolejną elongację wydłużano o 10 sek; elongacja w ostatnim cyklu — 10 min.

Amplifikacji dokonywano w dwóch wariantach:

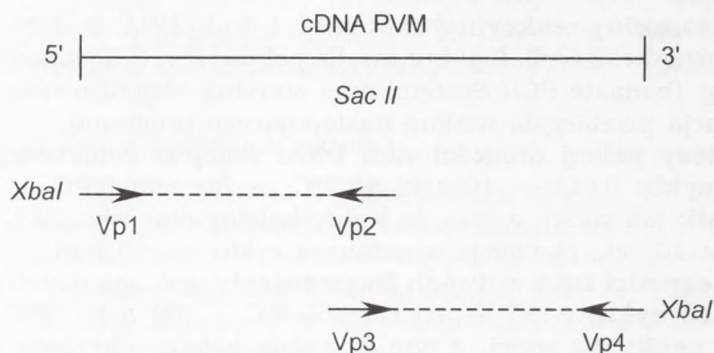
1. Amplifikując cDNA w postaci jednego fragmentu, ze starterów zewnętrznych Vp1 i Vp4. Uzyskiwano wówczas pełną kopię cDNA dla izolatu Uran (rys. 2).

2. Amplifikując cDNA w dwóch fragmentach: odpowiednio — koniec 5' z użyciem starterów Vp1 i Vp2 oraz koniec 3' z użyciem starterów Vp3 i Vp4. Otrzymywano wówczas produkty PCR odpowiadające połowie długości cDNA PVM zarówno dla izolatu Uran jak i dla PVM 57 (rys. 3).

Wydajność i jakość amplifikacji monitorowano w 0,8% żelach agarozowych. Zastosowanie zestawu ELT PCR System umożliwiło otrzymanie pełnej kopii wirusowego cDNA — około 8530 nt.



Rys. 2. Schemat amplifikacji pełnej kopii cDNA PVM.



Rys. 3. Schemat amplifikacji cDNA PVM z użyciem wewnętrznych starterów.

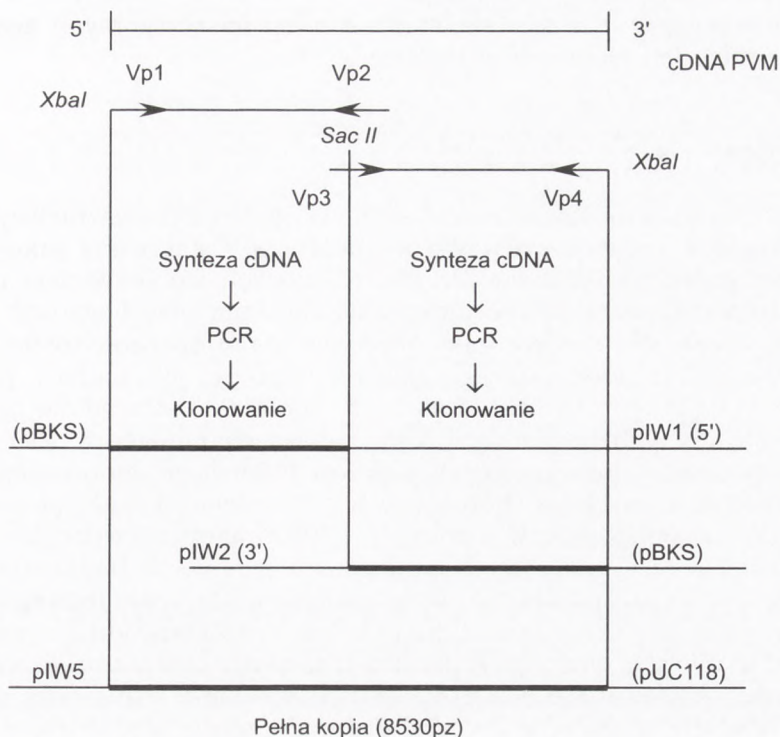
3.5. Klonowanie cDNA wirusa PVM Uran i PVM 57

Otrzymane produkty reakcji oczyszczano na kolumnach Qiagen®, a następnie przygotowywano do klonowania:

— fragmenty cDNA odpowiadające pełnej długości genomu (PVM Uran) oraz wektor pUC 118 trawiono enzymem restrykcyjnym *Xba I*, wektor defosforylowano przy użyciu fosfatazy CIAP i ligowano ligazą T₄. Otrzymanym plazmidowym DNA (**pIW5**) transformowano komórki kompetentne *E. coli*, szczep *DH 5α*.

— fragmenty odpowiadające połowie cDNA wirusa (izolaty PVM Uran i PVM 57) oraz wektor pBKS+ trawiono *Xba I* i *Sac II*. Następnie ligowano i transformowano kompetentne *DH 5α*.

Zrekombinowane klony izolowano na podłożach selekcyjnych, zawierających X-Gal i ampicylinę, jako białe kolonie. Analiza restrykcyjna plazmidów wyodrębnianych z poszczególnych kolonii potwierdziła obecność odpowiedniej wielkości wstawek:



Rys. 4. Schemat klonowania DNA wirusa M ziemniaka.

— około 8500 pz w przypadku klonu PVM Uran w wektorze pUC 118 → **pIW5**
 — około 4200 pz w przypadku obu klonów: 5' i 3' PVM Uran → **pIW3**

(5'); **pIW4** (3'),

w wektorze pBKS, a także w przypadku obu klonów: 5' i 3' PVM 57 → **pIW1** (5'); **pIW2** (3') w wektorze pBKS.

3.6. Analiza zmienności sekwencyjnej izolatów PVM Uran i PVM 57

We wstępnej analizie sekwencyjnej wykazano, że oba izolaty: „słaby” PVM 57 i „silny” PVM Uran różnią się przynajmniej w kilku miejscach genomu. Po zsekwencjonowaniu około 600 nt obu końców klonowanych izolatów Uran i 57 zauważono co najmniej kilka różnic dotyczących pojedynczych nukleotydów, które są, być może, odpowiedzialne za różnice patogenności obu izolatów PVM.

Dalsze prace sekwencyjne pozwolą w przyszłości określić molekularne przyczyny wyjątkowej zmienności wirusa, który — jak się wydaje, stanowi populację różnych wariantów molekularnych. Dysponowanie klonami o pełnej długości genomu umożliwi porównanie obu izolatów na poziomie mole-

kularnym oraz pomoże w zdefiniowaniu funkcji poszczególnych genów PVM i mechanizmów ich ekspresji w roślinie.

4. Dyskusja

Studia nad zmiennością wirusów stanowią jeden z najważniejszych aspektów wirusologii molekularnej. Wirus może być traktowany jako kolekcja szczepów o podobnych właściwościach, różniących się sekwencją nukleotydową. Poszczególne szczepy charakteryzują się skalą wywoływanych objawów chorobowych rośliny, niektóre mogą powodować obumieranie roślin. Dobrym przykładem jest tu PVM, którego zjadliwe szczepy, jak badany przez nas Uran, wywołują na niektórych odmianach ziemniaka szczególnie ostre objawy, podobne do tych, które wywołuje najbardziej patogenny PVY. Analiza sekwencji genomów poszczególnych izolatów PVM może doprowadzić do wyjaśnienia molekularnych mechanizmów tego zjawiska, a także pomóc w rozszyfrowaniu funkcji genów wirusowych, gdyż zmiany sekwencyjne genomu odzwierciedlają się w białkowych produktach genów. W badaniach prowadzonych w pracowni Drehera (31) wykazano, że zastąpienie **jednego nukleotydu** (!) w sekwencji TYMV (substytucja U 1888 → C) powodujące wstawienie histydyny w miejsce tyrozyny w białku transferu, czterokrotnie zwiększało infekcyjność zmutowanego szczepu wirusa, wskutek wzmożonej produkcji białka. Ułatwiało to, w konsekwencji przemieszczanie się wirusa w roślinie i tym samym zwiększało jego infekcyjność.

Dlatego interesujące jest, jak się wydaje, prześledzenie poszczególnych etapów ekspresji PVM *in vitro*. Szczególnie ważne jest zbadanie wczesnych oddziaływań molekularnych między rośliną i wirusem. Z dużym prawdopodobieństwem można bowiem założyć, że uczestniczą w nich geny PVM, którym nie udało się przypisać konkretnych funkcji. Określenie kolejności oraz poziomu transkrypcji (i ewentualnie: translacji) poszczególnych genów PVM w różnych stadiach rozwoju infekcji powinno się przyczynić do poznania sposobu działania i funkcji tych genów.

Badania były finansowane przez Komitet Badań Naukowych, grant Nr 5-P06A-011-10.

Autorzy wyrażają serdeczne podziękowania prof. prof. M. Chrzanowskiej, D. Hulanickiej, E. Guzowskiej, J. Pudełce oraz W. Zagórskiemu za pomoc i życzliwość.

Literatura

1. Zavriev S. K., (1994), *Carlaviruses*, in: *Encyclopedia of Virology*, Eds. R. G. Webster, A. Granoff, vol. 1, 214-218, London, San Diego, New York, Boston.
2. Mullis K. B., (1987), *Meth. Enzymol.*, 155, 335-350.
3. Erlich H. A., (1991), *PCR Technology*, Stockton Press, New York.
4. Henson J.M., French R., (1993), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 31, 81-109.

5. Gilbertson R. L., Rojas M. R., Russel D., Maxwell D. P., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72, 2843-2848.
6. Robertson N. L., French R., Gray S. M., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72, 1473-1477.
7. Matthews R. E. F., (1991), *Plant Virology*, 3rd ed. Academic Press, London.
8. Rojas M. R., Gilbertson R. L., Russel D., Maxwell D. P., (1993), *Plant Dis.*, 77, 340-347.
9. Hoekema A., (1989), *BioTechnology*, 7, 273-278.
10. Gasser C. S., Fraley R. T., (1989), *Science*, 244, 1293-1297.
11. Golemboski D. B., (1990), *PNAS*, 87, 6311-6315.
12. Rezaian M. A., (1988), *Plant Mol. Biol.*, 11, 463-471.
13. Powell P. A., (1989), *PNAS*, 86, 6942-6952.
14. de Zoeten G. A., (1991), *Phytopathology*, 81, 585.
15. Fraser R. S. S., (1990), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 28, 179-200.
16. Nicolas O., Laliberte J.-F., (1992), *J. Gen. Virol.*, 73, 2785-2793.
17. Szybiak U., Legocki A. B., (1981), *Acta Biochim. Polon.*, 28, 99-104.
18. Huisman M. J., Linthorst H. J. M., Bol J. F., Cornelissen B. J. C., (1988), *J. Gen. Virol.*, 69, 1789-1798.
19. Morozov S., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72, 2039-2042.
20. Robaglia C., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 935-947.
21. Mayo M. A., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 1037-1051.
22. Rupasov V. V., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 1861-1869.
23. Zavriev K. V., Kanyuka K. E., Levay K. E., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72, 9-14.
24. Mac Kenzie D. J., Tremaine J. H., Stace-Smith R., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 1053-1063.
25. Morris J., de Zoeten G. A., (1990), *Phytopathology*, 80, 446-450.
26. Koenig R., (1982), *Carlavirus group. CMI/AAB Description of Plant Viruses*, 259.
27. Kowalska A., (1978), *Phytopathol. Z.*, 93, 227-240.
28. Chrzanowska M., (1996), *Biul. Inst. Ziemniaka, Młochów*, 46.
29. Tavantzis S. M., (1983), *Phytopathology*, 73, 190-194.
30. Foster G. D., (1992), *Res. Virol.*, 143, 103-112.
31. Ching-Hsiu Tsai, Dreher T. W., (1993), *Mol. Plant-Microbe Int.*, 6, 268-273.

Cloning of full-length copy DNA of two PVM isolates

Summary

Potato virus M, a member of carlavirus group, is one of the most common viral pathogens affecting potato in Poland. Disease symptoms vary from truly severe to the very mild ones depending on the PVM isolate and/or potato variety. In order to study the molecular aspects of PVM diversity, we cloned the full-length copy DNA of PVM *Uran* and PVM 57 genomes, respectively. Then after preliminary nucleotide sequence analysis we could find out several sequence motifs with possible role in PVM virulence.

Key words:

potato virus M, molecular diversity, RT-PCR amplification, genomic clones.

Adres do korespondencji:

Urszula Szybiak-Stróżycka, Katedra Biochemii i Biotechnologii, Akademia Rolnicza, ul. Wołyńska 35, 60-637 Poznań.