

# Otrzymanie transgenicznego ziemniaka odpornego na infekcje wirusem liściozwoju ziemniaka

Andrzej Pałucha<sup>1</sup>

Mirostawa Chrzanowska<sup>2</sup>

Włodzimierz Zagórski<sup>1</sup>

Danuta Hulanicka<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instytut Biochemii i Biofizyki

Polska Akademia Nauk

Warszawa

<sup>2</sup>Instytut Ziemniaka

Oddział w Młochowie

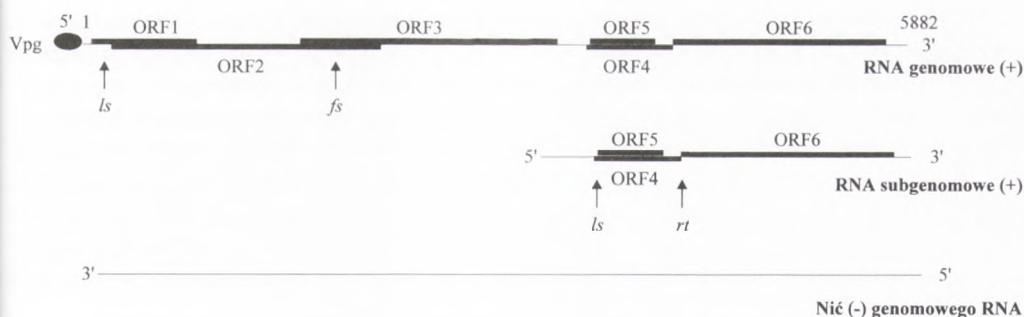
Rozalin

## 1. Wstęp

Choroby wirusowe roślin są przyczyną poważnych strat w uprawach na całym świecie mimo prowadzenia szerokiej działalności zapobiegawczej mającej na celu produkcję wolnych od wirusów nasion i bulw, eliminację owadźcych wektorów odpowiedzialnych za ich rozprzestrzenianie oraz testowanie roślin przeznaczonych do dalszej hodowli. Straty materialne spowodowane przez wirusy, związane są nie tylko z obniżeniem plonów, lecz też ze spadkiem jakości produktów rolnych.

Ziemniak jest jednym z podstawowych produktów rolnych w Polsce. Infekcje wirusowe, a zwłaszcza infekcje wirusem liściozwoju ziemniaka (ang. *potato leafroll virus* — PLRV) należącym do grupy luteowirusów (1), powodują duże straty w uprawach. Rozwój inżynierii genetycznej, a zwłaszcza technik związanych z otrzymywaniem roślin transgenicznych, umożliwia zastosowanie niekonwencjonalnych metod w walce z infekcjami wirusowymi.

Genom wirusa liściozwoju ziemniaka zbudowany jest z pojedynczej nici RNA zamkniętej w izometrycznym kapsydie o średnicy 25 nm. Pojedyncza nić RNA składa się z ok. 6 tysięcy nukleotydów, posiada na swoim 5' końcu kowalencyjnie przyłączone białko (VPg) oraz nie ma sekwencji poli(A) na 3' końcu (2). Podczas infekcji rośliny wirus jest zdolny do namnażania się tylko w komórkach towarzyszących tkanki przewodzącej. Transmisja wirusa pomiędzy roślinami jest możliwa wyłącznie przy udziale owadziego wektora, jednego gatunku mszyc — *Myzus persicae* (3). Znana jest do tej pory sekwencja kilku izolatów wirusa PLRV, z różnych krajów (4-7). W każdym przypadku organizacja genomu poszczególnych izolatów jest analogiczna.



Rys. 1. Istotne elementy strukturalne genomu wirusa PLRV. Strzałkami wyróżniono mechanizmy ekspresji genów wirusowych: *ls* (ang. *leaky scanning*); *fs* (ang. *frame shift*); *rt* (ang. *read-through*).

W obrębie ich sekwencji zidentyfikowano sześć otwartych ramek odczytu (ang. *open reading frame* — ORF) w dwóch cistronach oddzielonych sekwencją niekodującą. Podczas analizy obecności RNA w zainfekowanych wirusem protoplastach tytoniu wykryto obecność nici dodatniej i ujemnej RNA genomowego, a także obecność krótszego subgenomowego RNA (sgRNA) będącego wariantem nici dodatniej genomu wirusa (8,9). Na rysunku 1 przedstawiono najistotniejsze elementy genomu PLRV.

Od czasu pionierskiej pracy Beachy'ego i wsp. w roku 1986 (10) donoszącej o otrzymaniu transgenicznego tytoniu, zawierającego w genomie gen BP wirusa mozaiki tytoniowej (TMV) i wykazującego zwiększoną odporność na infekcje tym wirusem, ukazało się wiele prac o konstrukcji roślin transgenicznych odpornych na około 20 różnych wirusów (11-13). Tego rodzaju odporność określamy jako obronę zależną od białka płaszczka CP-MR (ang. *coat protein-mediated resistance*). Wyrażanie białka kapsydu w transgenicznej roślinie często indukowało znaczącą redukcję lub opóźnienie pojawiania się symptomów w wyniku infekcji wirusowej. W wielu aspektach CP-MR jest podobna do zjawiska krzyżowej obrony (ang. *cross protection*), w którym infekcja szczepem łagodnym danego wirusa redukuje lub opóźnia pojawienie się objawów powodowanych przez szczep zjadliwy tego wirusa. Analogia ta nie jest pełna, gdyż znane są prace, w których wykazano wpływ na akumulację wirusa w zainfekowanej komórce genu BP, sklonowanego również w odwrotnej orientacji (14). Brak jednoznacznego mechanizmu odporności zależnego od obecności genu białka płaszczka w transgenicznej roślinie zainspirował nas do skonstruowania szeregu transgenicznych linii ziemniaka różniących się długością granicznych regionów genu CP PLRV. Do tej pory opisano szereg udanych prób otrzymania transgenicznego ziemniaka odpornego na infekcje tym wirusem (14-17).

## 2. Zakres i metodyka badań

W pracy opisano otrzymanie transgeniczných ziemniaków wyrażających zarówno (+) jak i (-) transkrypty pokrywające obszar genu białka płaszczka PLRV. Badania prowadzono nad odmianą Bzura charakteryzującą się naturalną odpornością na wirusy PVY i PVX. Rośliny transformowano konstrukcjami zawierającymi gen białka płaszczka wraz z różnej długości sekwencjami otaczającymi w obu orientacjach, sensowej i antysensowej. W transgeniczných roślinach sprawdzano metodą *Southerna* obecność wirusowego cDNA zintegrowanego z chromosomem, a także, metodą *Northerna*, wyrażanie wprowadzonych genów. Odporność roślin transgeniczných sprawdzano w testach z użyciem mszyc lub zrazów jako wektora wirusowego.

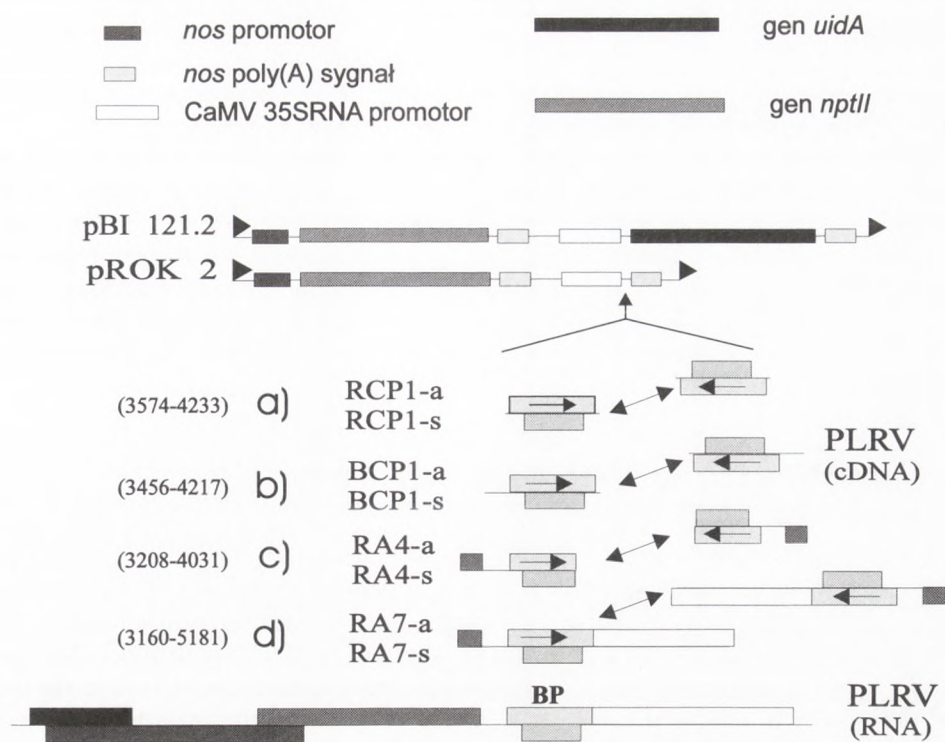
### 2.1. Otrzymanie transgeniczných roślin ziemniaka

Po ustaleniu sekwencji nukleotydujowej polskiego izolatu PLRV-P (6) skonstruowano szereg klonów plazmidowych zawierających gen białka płaszczka (BP) wirusa wraz z sekwencjami otaczającymi. cDNA tych klonów posłużył jako materiał do konstrukcji plazmidów binarnych do celów transformacji roślin za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Do transformacji użyto konstrukty zawierające: 1) gen BP bez sekwencji liderowej (pRCP1); 2) cDNA genu BP wraz ze 131-nukleotydujową sekwencją liderową (pBCP1); 3) pełnej długości sekwencję liderową zawierającą przypuszczalne miejsce inicjacji replikacji subgenomowego RNA oraz gen BP (pRA7); 4) pełnej długości sekwencję liderową zawierającą skrócony gen BP (pRA4). Wszystkie zawierały fragmenty cDNA genomu wirusa w orientacji sensowej i antysensowej (rys. 2).

Plazmidy wprowadzono metodą elektroporacji do *Agrobacterium*. Do transformacji roślin użyto skrawków liściowych ziemniaka odmiany Bzura. Komórki ziemniaka zawierające zintegrowane kopie wprowadzanej kasety ekspresyjnej selekcjonowano na podłożach z kanamycyną w stężeniu 100 µg/ml. Wytworzone na rosnącym kalusie pędy o długości od 6 do 7 mm odcinano i przenoszono na podłoża bez kanamycyny, prowadząc dalsze mikrorozmnażanie.

### 2.2. Analiza roślin transgeniczných

W rozmnażanych *in vitro* roślinach sprawdzano obecność DNA i RNA transgeny. W celu wyizolowania DNA rozcierano 200 mg liści, a następnie izolowano całkowity DNA (18). W celu wyizolowania RNA rozcierano 200 mg liści w ciekłym azocie, a następnie dodawano podgrzany do temperatury 80°C bufor z fenolem, a RNA wytrącano chlorkiem litu (19). Analizę hybrydacyjną trawionego enzymem *Hind*III lub mieszaniną enzymów *Hind*III i *Eco*RI DNA prowadzono metodą *Southerna* (20) na membranach nylonowych Hybond N (Amersham). Analizę typu *Northern* prowadzono na RNA rozdzielanym w 1% żelu agarozowym w obecności glikoksalu jako czynnika denaturującego (20), a następnie przeniesionym na pozytywnie naładowaną



Rys. 2. Schemat klonowania fragmentów cDNA PLRV do wektorów binarnych (w nawiasach podano koordynaty klonowanych sekwencji).

membranę nylonową Hybond N<sup>+</sup> (Amersham) zgodnie z przepisem producenta. Jako sondy do hybrydyzacji używano fragmentu restrykcyjnego zawierającego cDNA genu CP PLRV znakowanego [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] dCTP.

### 2.3. Badanie odporności transgenicznych roślin

Odporność na infekcje wirusem PLRV testowano w roślinach transgenicznych infekowanych wirusem za pomocą mszyc oraz zrazów. Źródłem wirusa były zainfekowane rośliny ziemniaka odmiany Osa. Transgeniczne linie ziemniaka propagowano w warunkach sterylnych, a następnie małe roślinki przenoszono do doniczek z ziemią i dalej hodowano w szklarni. Z każdej linii wybierano po osiem roślin, na których przez 4 dni żywiono po 10 mszyc uprzednio hodowanych na roślinach zainfekowanych. Dwie inne rośliny z każdej linii szczepiono zrazami z zainfekowanego wirusem ziemniaka. Do próby oczkowej wybierano potomstwo uzyskane z 2 – 4 bulw każdej rośliny transgenicznej. Sprawdzenia obecności wirusa wykonywano w 200  $\mu\text{l}$  soku testem ELISA. Testy serologiczne wykonywane były na roślinach 4- i 6-tygodniowych oraz na roślinach w cztery tygodnie po wykiełkowaniu z bulw (próba oczkowa).

### 3. Wyniki

#### 3.1. Transformacja ziemniaka

Z 362 eksplantatów liści kokulturowanych z klonami *A. tumefaciens* zawierającymi opisane plazmidy, niosące wybrane fragmenty cDNA PLRV, otrzymano 50 roślin ukorzeniających się w podłożu z kanamycyną. Wszystkie z uzyskanych roślin zostały ocenione pod względem cech fenotypowych i z wyjątkiem linii RA7a-2, nie różniły się od rośliny dzikiej. Każda z roślin ziemniaka zdolna była do wytwarzania bulw. Analizę odporności przeprowadzono do tej pory dla 20 linii. Badania dalszych 30 linii są prowadzone i jeszcze nie ukończone.

#### 3.2. Analiza hybrydacyjna transgenicznych roślin

DNA genomowy izolowany z wybranych roślin trawiono enzymami restrykcyjnymi *HindIII* oraz *HindIII* i *EcoRI*. Trawienie pojedynczym enzymem pozwala na określenie liczby genetycznych loci zintegrowanego z chromosomem cDNA PLRV, gdyż jedno miejsce rozpoznawane przez enzym znajduje się w obrębie kasety ekspresyjnej natomiast drugie, w DNA roślinnym. Na podstawie danych hybrydacyjnych wykazano, że transformacja roślin metodą agroinfekcji umożliwia wprowadzenie transgeny w jedno lub więcej loci genetycznych. Trawienie dwoma enzymami informuje o wszelkich rearanżacjach wintegrowanej kasety mających wpływ na wielkość analizowanego fragmentu. Z wyjątkiem dwóch analizowanych linii transgenicznych (RA4a-2 i RA4a-10), we wszystkich pozostałych stwierdzono obecność fragmentu restrykcyjnego, hybrydującego z sondą zawierającą gen BP PLRV, o wielkości zgodnej ze skonstruowaną i wprowadzoną kasetą. Jedynie w przypadku dwóch analizowanych, opornych na kanamycynę, linii nie wykryto zintegrowanego z chromosomem cDNA PLRV.

W celu wykazania ekspresji wprowadzonych fragmentów cDNA wirusowego wykonano analizę typu *Northern*. Do analizy wybrano rośliny wykazujące obecność nie zmienionych kaset ekspresyjnych. W przypadku wszystkich analizowanych roślin stwierdzono obecność mRNA genu CP o wielkości zgodnej ze spodziewaną.

#### 3.3. Analiza odporności transgenicznych roślin ziemniaka na infekcje PLRV

Wstępną analizę odporności przeprowadzono dla 20 roślin transgenicznych, spośród których dwie linie, RA7a-2 i BCP1s-4 charakteryzowały się niezdolnością do akumulacji wirusa po szczepieniu mszycami, na co wskazują niskie wartości absorbancji w teście ELISA (odpowiednio: 0,069 i 0,048 w 4 tygodnie; oraz 0,036 i 0,033 w 6 tygodni po szczepieniu; tab. 1), w przeciwieństwie do roślin kontrolnych, które akumulowały wirusa (0,168 w 6 tygodni po szczepieniu; tab. 1). Zakażone rośliny hodowano aż do wytworzenia

bulw, a następnie sprawdzano obecność wirusa w 4-tygodniowych roślinach uzyskanych z oczek. W przypadku linii RA7a-2 i BCP1s-4 nie doszło do transmisji wirusa przez bulwy (odpowiednio:  $A_{405} = 0,027$  i  $0,03$ ; tab. 1).

TABELA 1  
ŚREDNIE WARTOŚCI ELISA ( $A_{405}$ ) TESTOWANYCH ROŚLIN LINII BCP1s I RA7a

Linia roślinna	4 tygodnie po szczepieniu mszycami			6 tygodni po szczepieniu mszycami			Próba oczkowa roślin szczepionych mszycami			Próba oczkowa roślin szczepionych zrazami		
	liczba roślin	średnia wartość $A_{405}$	BS	liczba roślin	średnia wartość $A_{405}$	BS	liczba roślin	średnia wartość $A_{405}$	BS	liczba roślin	średnia wartość $A_{405}$	BS
n. sz.	4	<b>0,069</b>	0,009	4	<b>0,056</b>	0,011	4	<b>0,040</b>	0,009	2	<b>0,056</b>	0,012
sz.	7	0,059	0,01	7	0,168	0,065	7	0,232	0,147	3	0,696	0,322
P1s-4	7	<b>0,048</b>	0,015	7	<b>0,033</b>	0,008	7	<b>0,03</b>	0,017	4	0,41	0,08
7a-2	7	<b>0,069</b>	0,01	7	<b>0,036</b>	0,012	7	<b>0,027</b>	0,007	3	<b>0,069</b>	0,07

Thustym drukiem wyróżniono wartości wskazujące na brak wirusa; n. sz. — nie szczepiona; sz. — szczepiona; BS — błąd standartowy.

Szczepienie roślin za pomocą zrazów z rośliny porażonej powoduje stały przepływ wirusa do rośliny testowanej. W tak ostrych warunkach infekcji obecność wirusa sprawdzana jest w roślinach potomnych wyhodowanych z bulw roślin szczepionych zrazami. Testowane rośliny transgeniczne linii BCP1s-4 wykazały zdolność akumulacji wirusa ( $A_{405} = 0,41$ ), natomiast rośliny otrzymane z bulw linii RA7a-2 wirusa nie akumulowały ( $A_{405} = 0,069$ ), co oznacza, że w tak ostrych warunkach infekcji odporność jednej linii (BCP1s-4) została przełamana, natomiast w przypadku drugiej (RA7a-2) nadal utrzymuje się na wysokim poziomie (tab. 1).

Obydwie linie infekowano dodatkowo wirusami PVY i PVX i stwierdzono, że charakterystyczna dla odmiany Bzura wysoka odporność na te dwa patogeny wirusowe nadal jest zachowana.

#### 4. Dyskusja

Transformacja wybranej odmiany ziemniaka opisanymi konstruktami zawierającymi gen BP PLRV, umożliwiła otrzymanie transgenicznych roślin, o różnym stopniu odporności na infekcje tym wirusem (tab. 1).

Rośliny linii BCP1s-4 wyrażające sensowy transkrypt genu BP nie różniły się wyglądem od rodzicielskiej odmiany. Rośliny linii RA7a-2 były nieco mniejsze, o krótszych międzywęzłach, i bardziej zwartej budowie. Rośliny obu linii produkowały normalne bulwy. Obie transgeniczne linie charakteryzowały się odpornością na infekcje PLRV, w przypadku gdy wektorem wirusa były mszyce, a linia RA7a-2 wykazywała odporność nawet po szczepieniu zrazami rośliny zakażonej wirusem. Sugeruje to, że rośliny linii RA7a-2,

w kontrolowanych warunkach szklarniowych, są w wysokim stopniu odporne na infekcje PLRV, co więcej rośliny obu linii zachowały naturalną odporność na infekcje wirusami PVY i PVX.

Do tej pory uważano odporność zależną od białka płaszczka jako skuteczną ochronę przed skutkami infekcji różnymi wirusami i dlatego najczęściej jest doniesień literaturowych o konstrukcji transgenicznych roślin zawierających geny BP różnych wirusów (21,22). W odporności tej główną rolę przypisuje się obecności w komórce roślinnej strukturalnego białka wirusowego, co może prowadzić do poważnych zaburzeń procesu infekcji. Donoszono także o odporności roślin na infekcje wirusowe będącej wynikiem ekspresji różnych genów niestukturalnych, takich jak fragmenty genów replikaz wirusowych czy zmodyfikowanych białek odpowiedzialnych za różne etapy rozprzestrzeniania wirusów w roślinie.

W pracy opisano dwie transgeniczne linie roślin zawierających dwa różne warianty cDNA PLRV wykazujące zróżnicowany stopień odporności na infekcje tym wirusem.

W przypadku odpornej na infekcje transgenicznej linii BCP1s-4, zawierającej cDNA genu BP PLRV wraz ze 132-nukleotydowym fragmentem sekwencji liderowej sgRNA, możliwa jest ekspresja genu białka płaszczka wirusa, a co za tym idzie, odporności zależnej od BP. Druga linia RA7a-2, charakteryzująca się znacznie wyższym stopniem odporności, zawiera zintegrowany fragment cDNA w odwrotnej orientacji, a zatem odporność jest spowodowana obecnością transkryptu cDNA wirusowego. Do tej pory, poza jednym przypadkiem (14), w którym wykryto śladowe ilości BP, nie udało się wykazać ekspresji genu BP PLRV w transgenicznych roślinach odpornych na infekcje tym wirusem (15-17). Biorąc pod uwagę trudności wykrycia BP w roślinie i to, że linia RA7a-2 wykazuje tak wysoką odporność, nie przeprowadzono prób stwierdzenia obecności BP w transgenicznych liniach.

Mechanizm odporności zależny od białka płaszczka nie jest dokładnie poznany i jest różny dla poszczególnych wirusów. Na podstawie dotychczasowych hipotez przypuszcza się, że obecne w komórce transgenicznej rośliny białko interferuje z mechanizmem odpłaszczania wirusa we wczesnych stadiach infekcji (23). W przeprowadzonych doświadczeniach podtrzymujących tę hipotezę wykazuje się, że poziom odporności rośliny transgenicznej zależy od obecności i poziomu ekspresji białka płaszczka, a nie od ilości mRNA tego genu (23,24). Ponadto wykazano, że inokulacja rośliny za pomocą RNA przełamuje odporność zależną od BP (13,25,26). Nieco odmienne wyniki otrzymała Hemenway (27) dla roślin zawierających gen BP wirusa X ziemniaka (PVX), w przypadku którego odporność pozostawała niezależna od stężenia inokulum RNA wirusowego.

Na podstawie uzyskanych przez nas wyników wskazujemy, że odporność na infekcje PLRV wywołana jest raczej obecnością transkryptu genu BP niż jego produktu. W tym przypadku, bez przeprowadzenia dokładniejszych analiz nie można całkowicie wykluczyć roli BP w uzyskanej przez roślinę odporności, jednak bardziej prawdopodobna jest sytuacja, w której obecny w roślinie transkrypt genu interferuje z procesem namnażania wirusa. W przy-

padku wirusa PLRV nie można też wykluczyć wpływu produktu ORF5 zawartego w genie BP na zjawisko odporności. Dopiero konstrukcja roślin transgenicznych zawierających cDNA tych genów ze zmutowanymi kodonami inicjującymi translację, jak się wydaje, pomoże wyjaśnić problem odporności na infekcje PLRV zależnej od genu BP.

Szeroko jest opisywane zastosowanie strategii antysensowych RNA (asRNA) wirusowych w celu otrzymania transgenicznych roślin odpornych na infekcje. Osiągane poziomy odporności nie są jednak wysokie. W niektórych przypadkach odporność obserwowano jedynie przy infekcji niskimi inokulami wirusa, i prowadziła ona jedynie do opóźnienia występowania objawów zakażenia oraz do zredukowanej akumulacji wirusa w komórkach analizowanych roślin transgenicznych (12,16,28-30). W większości przypadków odporność wywołana ekspresją asRNA BP była dużo niższa niż ta spowodowana ekspresją białka tego genu (12,27,31,32).

Bardziej obiecujące wyniki osiągnięto stosując ekspresję asRNA obszarów regulatorowych wirusów. Huntley i Hall (33) wykazali, że ekspresja asRNA do międzygenowego regionu RNA3 wirusa mozaiki stokłosa w sposób znaczący redukuje replikację wirusa w protoplastach, do których jednocześnie wprowadzano asRNA i transkrypty RNA wirusowego. Użyty w tych doświadczeniach RNA antysensowy zawierał sekwencję obecnego we wszystkich RNA wirusowych na nici ujemnej promotora transkrypcji wirusa. Powodowało to redukcję replikacji koinfekowanego wirusa (34). Hammond i Kamo (35) donoszą ostatnio o konstrukcji transgenicznego tytoniu zawierającego 3' koniec genu białka płaszczka, wraz z końcowym odcinkiem niekodującym oraz z krótką sekwencją poli (A) wirusa żółtej mozaiki fasoli (ang. *bean yellow mosaic virus*, BYMV) w orientacji antysensowej. Jedna z dziesięciu badanych linii odznaczała się ekstremalnie wysoką odpornością na mechaniczne inokulacje wirusem BYMV.

Transgeniczna linia RA7a-2 zawiera pełnej długości sekwencję liderową, gen BP oraz fragment ORF6 w orientacji antysensowej. Wspominano już, że na końcach 5' genomowego i subgenomowego RNA PLRV znajduje się sekwencja ACAAAGAA (8). Komplementarna do niej sekwencja UUCUUUUGU nici ujemnej jest postulowanym miejscem wiązania replikazy wirusowej. Obecność takiego sygnału w komórce rośliny transgenicznej może w skuteczny sposób interferować z wczesnymi etapami infekcji wirusowej przez kompetytywne wiązanie replikazy i uniemożliwienie w ten sposób syntezy nici ujemnej. Dodatkowo, fragment ten może reagować jak klasyczne asRNA i nie dopuszczać do translacji genów wirusowych z subgenomowego RNA przez blokowanie kodonów inicjujących syntezę białka. Tworzenie dwuniciowych struktur rozpoznawanych i degradowanych przez RNA-zy roślinne może być dodatkowym czynnikiem wpływającym na nabytą odporność transgenicznej linii.

Nie wiadomo, który z mechanizmów przeważa w odporności ujawnionej przez roślinę RA7a-2. W przyszłych pracach, mających na celu ich wyjaśnienie, należałoby otrzymać transgeniczne rośliny wyrażające jedynie sekwencje RNA przypuszczalnie rozpoznawane przez replikazę bez elementów strukturalnych.



Wstępne wyniki pracy świadczą o tym, że konstrukcja transgenicznych roślin zawierających geny wirusowe może być skuteczną metodą pozyskiwania roślin uprawnych, odpornych na infekcje.

Praca finansowana była z grantu KBN nr 5PO6A 04010p03.

Charakterystyka dwóch silnie odpornych linii transgenicznego ziemniaka została przesłana w formie artykułu do redakcji „European Journal of Plant Pathology”.

## Literatura

1. Matthews R. R. E. F., (1991), *Plant Virology*, Academic Press, New York.
2. Mayo M. A., Barker H., Robinson D. J., Tamada T., Harrison B. D., (1982), *J. Gen. Virol.*, 59, 163-167.
3. Harrison B. D., (1984), *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, 291.
4. Keese P., Martin R. R., Kawchuk L. M., Waterhouse P. M., Gerlach W. L., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 719-724.
5. Mayo M. A., Robinson D. J., Jolly C. A., Hyman L., (1989), *J. Gen. Virol.*, 70, 1037-1051.
6. Pałucha A., Sadowy E., Kujawa A., Juszczyk M., Zagórski W., Hulanicka D., (1994), *Acta Bioch Polon.*, 41, 405-414.
7. van der Wilk F., Huisman M., Cornelissen B. J. C., Huttinga H., Goldbach R., (1989), *FEBS Lett.*, 245, 51-56.
8. Miller J. S., Mayo M. A., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72, 2633-2638.
9. Tacke E., Pruffer D., Salamini F., Rhode W., (1990), *J. Gen. Virol.*, 71, 2265-2272.
10. Powell P. A., de Nelson R. S. B., Hoffman N., Roger S. G., Fraley R. T., Beachy R. N., (1986), *Science*, 232, 738-743.
11. Beachy R. N., Loesch-Fries S., Tumer N. E., (1990), *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28, 451-474.
12. Cuzzo M., O'Connell K. M., Kaniewski W., Fang R. X., Chua N-H., Rumer N. E., (1988), *Bio/Technology*, 6, 549-557.
13. Nelson R. S., Powell P. A., Beachy R. N., (1987), *Virology*, 158, 126-132.
14. Kawchuk L. M., Martin R. R., McPherson J., (1990), *Mol. Plant Microbe Interact*, 3, 301-307.
15. Barker H., Reavy B., Kumar A., Webster K. D., Mayo M. A., (1992), *Ann. Appl. Biol.*, 120, 55-64.
16. Kawchuk L. M., Martin R. R., McPherson J., (1991), *Mol. Plant Microbe Interact*, 4, 247-253.
17. van der Wilk F., Posthumus-Lutke Willink D., Huisman M. J., Huttinga H., Goldbach R., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 17, 431-439.
18. Doyle J. J., Doyle J. L., (1987), *Phytochemical Bulletin*, 19(1), 11-15.
19. Verwoerd T. C., Dekker B. M. M., Hoekema A., (1989), *Nucl. Acid Res.*, 17, 2632.
20. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J., (1990), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA.
21. Fitch J. H., Beachy R. N., (1993), *Annu. Rev. Microbiol.*, 47, 739-63.
22. Wilson T. M. A., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3134-3141.
23. Powell P. A., Sanders P. R., Tumer N., Fraley R. T., Beachy R. N., (1990), *Virology*, 175, 124-130.
24. van Dun C. M. P., Overduin B., van Vloten-Doting L., Bol J. F., (1988), *Virology*, 164, 383-389.
25. Loesch Fries L. S., Merlo D., Zinnen T., Burhop L., Hill K., (1987), *Embo J.*, 6, 1845-1851.
26. van Dun C. M. P., Bol J. F., van Vloten-Doting L., (1987), *Virology*, 159, 299-305.
27. Hemenway C., Fang R. X., Kaniewski W., Chua N-H., Tumer N. E., (1988), *EMBO J.*, 7, 1273-1280.

28. Nelson A., Don A. R., Johnson J. D., (1993), *Gene*, 127, 227-232.
29. Powell P. A., Stark D. M., Sanders P. R., Beachy R. N., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6949-6952.
30. Rezaian M. A., Skene K. G. M., Ellis J. G., (1988), *Plant Mol. Biol.*, 11, 463-471.
31. Fang G., Grumet R., (1993), *Mol. Plant Microbe Interact*, 6, 358-367.
32. Farinelli L., Malnoe P., (1993), *Mol. Plant Microbe Interact*, 6, 284-292.
33. Huntley C., Hall T. C., (1993a), *Virology*, 192, 290-297.
34. Huntley C., Hall T. C., (1993b), *J. Gen. Virol.*, 74, 2445-2452.
35. Hammond J., Kamo K. K., (1995), *Mol. Plant Microbe Interact*, 8, 674-682.

## Genetically engineered potato resistant to potato leafroll virus infection

### Summary

Binary plasmids carrying different fragments of the coat protein gene of potato leafroll virus were constructed for transformation of commercial potato cultivar Bzura. Several transgenic plant lines were obtained and characterised. The resistance of transgenic plants to the virus was tested by inoculation with aphids or grafting. Selected transformants expressing viral RNA were resistant to virus challenge by viruliferous aphids. Expression of the antisense RNA prevented virus infection even after grafting with scions from infected plants.

### Key words:

antisense, PLRV, transgenic plant.

### *Adres do korespondencji:*

Danuta Hulanicka, Zakład Biochemii Drobnoustrojów, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, ul. Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa, fax: 022 658 46 36.