



Transgeniczne linie rzepaku odporne na infekcję wirusem mozaiki rzepy (TuMV)

Przemysław Lehmann¹

Edward Kozubek¹

Andrzej Wojciechowski²

¹Instytut Genetyki Roślin

Polska Akademia Nauk

Poznań

²Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Akademia Rolnicza

Poznań

1. Wstęp

Obserwowane od wielu lat zjawisko odporności krzyżowej, polegające na pojawianiu się u roślin zainfekowanych określonym wirusem odporności na ten wirus oraz na wirusy pokrewne, zostało w latach osiemdziesiątych wykorzystane przez biologów molekularnych do wysunięcia koncepcji wywołania odporności na infekcję wirusową na drodze transformacji komórek roślinnych genem pochodzącym z wirusa (1). Pierwsze udane doświadczenie przeprowadzono w Stanach Zjednoczonych w roku 1986 na modelu tytoń — wirus mozaiki tytoniu (TMV) (2). Od tego czasu, stosując metodę transformacji genem białka płaszczka wirusa (lub innym fragmentem genomu wirusowego),

ten rodzaj odporności został już indukowany u wielu gatunków roślin uprawnych (3-7).

Istnieją dwa typy odporności indukowanej genem wirusowym w roślinach; pierwszy związany jest z obecnością białka wirusa kodowanego przez wprowadzony gen, drugi natomiast, z obecnością kodowanego przez gen wirusowy RNA. Odporność związana z białkiem charakteryzuje się zwykle skutecznością wobec większej liczby wirusów (lub innych szczepów tego samego wirusa), przy stosunkowo niskim poziomie, natomiast ta związana z obecnością RNA, jest wysoce specyficzna i cechuje ją znacznie wyższy poziom (6).

Zaproponowano dwa modele molekularne wyjaśniające mechanizm indukowania odporności przez białko płaszcz pochodzące z transgenu w komórce rośliny transgenicznej. W przypadku pierwszego stwierdzono, że obecność białka płaszcz kodowanego przez transgen w cytoplazmie, zakłóca równowagę procesu dysocjacji białka płaszcz od wirusowego RNA (dekapsydacja), co powoduje, że nie może dojść do replikacji wirusowego materiału genetycznego (8). Drugi, stanowi na razie hipotezę, w której zakłada się istnienie jakiegoś miejsca (receptora) w komórce roślinnej, którego dostępność warunkuje inicjację procesu dekapcydacji RNA wirusa i kiedy to miejsce jest blokowane przez pochodzące z transgenu cząsteczki białka płaszcz, hamuje w ten sposób dekapcydację i wszystkie następujące potem etapy cyklu życiowego wirusa (6). Dane dotychczas zgromadzone na temat mechanizmu odporności związanej z RNA pozwalają przypuszczać, że w komórce może być aktywowany działający po transkrypcji molekularny mechanizm zdolny do wykrycia i degradacji specyficznego RNA, doprowadzając w ten sposób do eliminacji zarówno transkryptów transgenu jak i wirusowego RNA z cytoplazmy (9,10). Jego uruchomienie jest uwarunkowane osiągnięciem i przekroczeniem ściśle określonego progowego poziomu specyficznego RNA, będącego w szczególnych przypadkach sumą transkryptu transgenu i wirusowego RNA. Uruchomienie tego mechanizmu może prowadzić, gdy mamy do czynienia z roślinami transgenicznymi transformowanymi genem wirusa, do zahamowania namnażania się wirusa (11). Wykazano, że zarówno liczba transgenów, jak i poziom ich ekspresji, są istotne dla określenia stopnia skuteczności tego cytoplazmatycznego systemu degradacji RNA (12,13). Z praktycznego punktu widzenia odporność linii transgenicznych, związana z obecnością białka, może mieć większe znaczenie, niż ta związana z obecnością w komórkach roślinnych RNA (produktu transgenu). Należy pamiętać, że typ odporności związanej z RNA jest zwykle bardziej specyficzny, niż ten związany z obecnością białka i dlatego może być łatwiej pokonywany w uprawach polowych poprzez infekcje pokrewnymi populacjami wirusów. Ponadto, niższe poziomy odporności na wirusy linii transgenicznych wytwarzających białko są wystarczające aby się uchronić przed chorobą wirusową ze względu na niższe z reguły stężenie naturalnego inokulum w warunkach polowych, od tego stosowanego w testach szklarniowych.

Przedmiotem badań przedstawionych w pracy, był rzepak jary (*Brassica napus* var. *oleifera*) odmiana Westar oraz wirus mozaiki rzepy (TuMV) należący do rodziny *Potyviriidae*, rodzaju potywirusy. Areal uprawy rzepaku w świecie znacznie się poszerzył w ostatnich dwóch dekadach i obecnie gatunek ten

klasyfikowany jest na drugim miejscu ze względu na ilość pozyskiwanego oleju roślinnego (14). Ten wzrost obszaru upraw rzepaku pociągnął za sobą poważne problemy związane z zagrożeniem chorobami grzybowymi (*Phoma lingam*, *Perenospora brassicae*). Podobna sytuacja zaczyna się kształtować w przypadku zagrożeń chorobami powodowanymi przez wirusy. U niektórych gatunków *Brassica* choroby wirusowe stanowią poważny problem. Przykładowo, u kalafiorów wirus mozaiki kalafiorów (CaMV) wywołuje poważną obniżkę plonów (15). O dużym zagrożeniu ze strony chorób wirusowych dla plonów kapusty pekińskiej (*Brassica campestris* sp. *pekinensis*) donoszą również Jun i wsp. (16). Autorzy ci zaobserwowali, że główny powód spadku plonów u kapusty pekińskiej w Korei to choroby wirusowe wywoływane przede wszystkim przez wirus mozaiki rzepy (TuMV). W ostatnich latach w literaturze można spotkać coraz więcej doniesień na temat zagrożeń jakie stanowią dla rzepaku choroby wirusowe (17,18). Walsh i Tomlinson (18) dowodzą, że wirus mozaiki rzepy (TuMV) infekując rzepak powoduje znaczną obniżkę plonu. Nowsze doniesienia dotyczące zagrożenia rzepaku chorobami wirusowymi pochodzą z lat 1992-1993. Zaprezentowane przez Hardwicka i wsp. dane (17) potwierdzają wcześniejsze wyniki opublikowane przez Walsha i Tomlinsona (18). W przeprowadzonych w naszym zespole doświadczeniach wykazano znaczną podatność polskich odmian i linii hodowlanych rzepaku ozimego na infekcję wirusem TuMV, chociaż stopień podatności był różny. Skutkiem infekcji był zarówno wzrost ilości wirusa w zainfekowanej tkance, jak i pojawianie się lokalnych i systemicznych symptomów choroby wirusowej na roślinach (19). Obserwowano ponadto znaczny spadek (40-50%) plonu nasion produkowanych przez zainfekowane rośliny badanych odmian i linii hodowlanych rzepaku ozimego (P. Lehmann, dane nie zostały opublikowane).

W pracy tej zostały opisane wyniki badań otrzymane w trakcie próby uzyskania, na drodze transformacji, linii hodowlanych rzepaku jarego odpornych na infekcję wirusem mozaiki rzepy. Rzekak jest gatunkiem, u którego formy jare poddają się łatwiej różnym zabiegom przeprowadzanym w kulturach *in vitro*, w porównaniu z rzepakiem ozimym. W przyjętej strategii prac badawczych uwzględniono użycie rośliny pośredniej, którą w tym przypadku był rzepak jary odmiany Westar. Odmiana ta charakteryzuje się zarówno wysoką podatnością na infekcję wirusem TuMV, jak również ulega, z dostatecznie wysoką wydajnością, transformacji. Strategia ta na kolejnym etapie wymaga skrzyżowania otrzymanych jarych linii transgenicznych rzepaku odpornych na infekcje wirusowe z odmianami ozimymi rzepaku, które są aktualnie w uprawie i wyselekcjonowania linii hodowlanych ozimego rzepaku odpornych na wirusa TuMV.

2. Materiały i metody

Wszystkie stosowane w naszych badaniach szczepy wirusa mozaiki rzepy: UK1, CDN1 i CZE1 oraz surowicę monoklonalną EMA67, otrzymano od Johna Walsha z Międzynarodowego Instytutu Ogrodniczego z Wielkiej Brytanii (Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick, UK).

2.1. Wektory użyte do transformacji

Wyizolowany metodą RT-PCR gen białka płaszczka wirusa mozaiki rzepy (szczep UK1) został wprowadzony do wektorów plazmidowych (pBIN19) zdolnych do transformacji komórek rzepaku. Użyty plazmid pJR1 zawierał: oba regiony graniczne fragmentu T-DNA, gen neomycynowej fosfotransferazy [NTP(II)] zawierający własny promotor i region terminujący, promotor 35S umożliwiający uruchomienie transkrypcji transgeny, region terminujący 3'-NOS oraz fragment polilinkerowy umożliwiający zligowanie plazmidu z transgenem. Transformację przeprowadzono przy użyciu trzech różnych typów konstrukcji. Pierwszy konstrukcja (A) zawierał gen białka płaszczka, który zmodyfikowano poprzez dodanie kodonu inicjującego umożliwiającego w komórkach roślinnych syntezę mRNA ulegającego translacji. Drugi konstrukcja (B) zawierał gen białka płaszczka w pozycji odwróconej umożliwiający syntezę antysensownego RNA tego genu. Kontrolny konstrukcja (K) nie zawierał genu białka płaszczka.

2.2. Transformacja rzepaku

Transformację komórek rzepaku przeprowadzono za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* (szczep LAB4404) metodą opisaną przez Moloneya i wsp. (20). Docelową tkanką użytą w trakcie transformacji były odcięte końce ogonków liściennych. Komórki powierzchni cięcia, które stosunkowo łatwo indukuje się do zapoczątkowania procesu organogenezy, są również podatne na infekcję *Agrobacterium*.

2.3. Test kanamycynowy

Nasiona badanych transgenicznych linii rzepaku poddawano kiełkowaniu na pożywce Marushige-Skooga (MS). Wówczas gdy liścienie osiągały właściwe rozmiary (tj. po około pięciu dniach) umieszczano je na nowej pożywce (4,71 g MS/litr, 3% sacharozy 0,7% agaru, 4,5 mg benzyloaminopuryny/litr) zawierającej 15 mg kanamycyny w litrze pożywki. Proces kalusowania zapoczątkowywały tylko te eksplantanty, których genom zawierał gen odporności na kanamycynę [NTP(II)]. Również tylko one wytwarzały zielone pędy umożliwiające jednoznaczne odróżnienie liścieni odpornych i podatnych na kanamycynę.

2.4. Test ELISA

Stopień rozwoju choroby wirusowej roślin transgenicznych był oceniany na podstawie ilości wirusa TuMV w liściach określonej metodą ELISA. Pośredni test ELISA wykonywano stosując monoklonalną surowicę EMA67.

3. Wyniki i dyskusja

Transformacja komórek rzepaku odmiany Westar za pomocą wektora B (synteza w komórkach roślinnych antysensowego RNA) umożliwiła wytworzenie 26 linii transgenicznych, wywodzących się z 26 niezależnych przypadków transformacyjnych. Rośliny pokolenia T1 wytwarzały niewielką liczbę niewykształconych prawidłowo nasion (zmieniony kształt, niska siła kiełkowania). Dlatego linii tych nie użyto do dalszych badań. Transformacja podczas której zastosowano konstrukt A (synteza prawidłowego mRNA białka płaszczka) doprowadziła do wytworzenia 42 linii transgenicznych wywodzących się z 42 niezależnych przypadków transformacyjnych. Produktem transgenu w roślinach w tym przypadku był mRNA ulegający translacji, w wyniku której w komórkach rośliny pojawiło się białko płaszczka wirusa. Otrzymane transgeniczne linie rzepaku (rośliny pokolenia T2) poddano testowi kanamycynowemu w celu określenia liczby kopii transgeny zintegrowanych w ich genomach. Zastosowana metoda umożliwiła pośrednią ocenę liczby kopii transgeny na podstawie stosunku segregacji genu odporności na kanamycynę [NTP(II)] w potomstwie. Gen ten jest ulokowany razem z genem białka płaszczka we fragmencie T-DNA i w tym układzie został wprowadzony do genomu rośliny. Z dużym prawdopodobieństwem można przyjąć, że ich transkrypcja w komórkach roślin transgenicznych zachodzi równocześnie. Poza tym z uwagi na bardzo małą odległość między nimi szansa zajścia rekombinacji jest znikoma. Liczbę kopii transgeny w poszczególnych liniach transgenicznych otrzymaną za pomocą testu kanamycynowego potwierdzono przeprowadzając hybrydyzację *Southern* (wyniki hybrydyzacji nie zostały tu przedstawione). Przyjmując te założenia możemy stwierdzić, że otrzymane linie transgeniczne zawierały; jedną, dwie, trzy i więcej kopii genu białka płaszczka wirusa TuMV w genomie.

Wyjaśnienie molekularnego mechanizmu leżącego u podłoża indukowanej odporności rzepaku na wirusa TuMV, jak i planowane prace zmierzające do przeniesienia nabytej odporności na wirus TuMV do ozimych odmian rzepaku, wymagają zastosowania w tych doświadczeniach linii transgenicznych zawierających pojedyncze kopie genu białka płaszczka, jak również homozygotycznych w odniesieniu do tego genu. Aby takie linie wyselekcjonować wykonano kolejny test kanamycynowy linii pokolenia T3 posiadających pojedynczą kopię transgeny w genomie. Wyniki obu testów przedstawiono w tabeli 1.

TABELA 1
OKREŚLENIE LICZBY KOPII TRANSGENU I STOPNIA HOMOZYGOTYCZNOŚCI LINII TRANSGENICZNYCH
RZEPAKU JAREGO W ODNIESIENIU DO GENU BIAŁKA PŁASZCZA WIRUSA TuMV

Wyselekcjonowane linie pokolenia T2	Segregacja transgeny w pokoleniu T2	Liczba kopii transgeny w genomie roślin w pokoleniu T2	Wyselekcjonowane linie pokolenia T3	Segregacja transgeny w pokoleniu T3	Homozygotyczność roślin w odniesieniu do transgeny
A28	3:1	1	A28/1	3:1	hemizygota
-	-	-	A28/3	3:1	hemizygota
-	-	-	A28/4	nie segreguje	homozygota
A29	3:1	1	A29/1	3:1	hemizygota
A31	nie segreguje	3*	A31/2	nie segreguje	-
A32	15:1	2	A32/1	15:1	-
-	-	-	A32/4	15:1	-
A33	15:1	2	A33/1	15:1	-
A34	3:1	1	A34/1	nie segreguje	homozygota
-	-	-	A34/2	nie segreguje	homozygota
A37	15:1	2	A37/1	nie segreguje	-
-	-	-	A37/2	nie segreguje	-
A39	nie segreguje	3*	A39/2	nie segreguje	-

*zawiera trzy lub więcej kopii transgeny w genomie.

Z danych zamieszczonych w tabeli 1 wynika, że uzyskane linie transgeniczne można podzielić pod kątem liczby kopii transgeny w genomie rzepaku na trzy grupy. Pierwsza, zawierała linie z jedną kopią transgeny, druga z dwiema, a trzecia z trzema lub z większą liczbą kopii genu białka płaszczka wirusa. Do dalszych badań wybrano po trzy linie z każdej grupy. Testując na pożywkach z kanamycyną rośliny pokolenia T3 wybranych linii transgenicznych zawierających jedną kopię transgeny, stwierdzono, że linie: A28/4, A34/1, i A34/2 są homozygotami w odniesieniu do transgeny, natomiast: A28/1, A28/3 i A29/1 — to linie hemizygotyczne tzn. posiadające tylko pojedyncze geny zamiast par alleli (tab. 1).

Wyselekcjonowane linie transgeniczne zawierające jedną, dwie i trzy kopie genów białka płaszczka inokulowano mechanicznie dwoma izolatami wirusa TuMV (CDN1 i CZE1). Stosowano dwa różne stężenia inokulum (stężenie podstawowe i inokulum 10-krotnie rozcieńczone). Poziom zaawansowania choroby wirusowej oceniano na podstawie pojawiania się (lub nie) symptomów lokalnych i systemicznych oraz poprzez określanie stężenia wirusa TuMV w zainfekowanych liściach rzepaku za pomocą testu ELISA. Wyniki przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2

OCENA PODATNOŚCI NA INFEKCJĘ WIRUSEM TuMV WYBRANYCH LINII TRANSGENICZNYCH RZEPAKU (POKOLENIE T3)

Linia w T3	Izolat CDN1				Izolat CZE1			
	Inokulum podstawowe		Inokulum rozcieńczone 10x		Inokulum podstawowe		Inokulum rozcieńczone 10x	
	*	ELISA	*	ELISA	*	ELISA	*	ELISA
A28/1	4/5	0,603	4/5	0,034	5/5	0,021	5/5	0,001
A28/3	5/5	0,010	3/5	0,478	5/5	0,009	5/5	0,019
A28/4	3/7	0,278	4/7	0,078	0/7	1,240	3/7	0,102
A29/1	1/6	1,840	3/6	0,482	4/6	0,140	4/6	0,283
A31/2	0/6	0,722	2/5	0,257	3/5	0,111	4/5	0,404
A32/1	4/7	0,861	3/6	0,327	6/7	0,285	5/6	0,202
A32/4	2/7	1,530	2/7	1,250	2/7	1,110	3/6	1,430
A34/1	0/7	2,300	2/7	0,924	2/7	1,670	4/7	0,498
A34/2	1/6	2,070	0/6	2,120	3/6	0,918	1/6	1,190
A37/1	3/3	0,014	1/3	0,694	2/3	0,055	3/3	0,019
A37/2	5/6	0,072	5/5	0,012	6/6	0,007	5/5	0,018
A39/2	6/7	0,087	6/7	0,167	7/7	0,017	7/7	0,002

*liczba odpornych roślin w stosunku do ogólnej liczby roślin użytych w teście dla poszczególnych linii transgenicznych; ELISA — średnie stężenie wirusa TuMV w liściach wyrażone poprzez gęstość optyczną (OD₄₀₅) dla poszczególnych linii transgenicznych.

W badaniach przeprowadzonych pod kątem zdolności hamowania namnażania się wirusa TuMV, wyselekcjonowanych linii transgenicznych ujawniono zróżnicowaną reakcję na inokulację tym wirusem. Rośliny części linii (A28/1, A28/3, A37/1, A37/2 i A39/2) wykazywały wysoką odporność, rośliny linii A28/4 i A32/1 były zdolne częściowo opóźnić namnażanie się wirusa i pojawianie się symptomów choroby wirusowej, a rośliny części linii (A29/1, A32/4, A34/1 i A34/2) charakteryzowały się podatnością na chorobę wirusową. Oba zastosowane podczas inokulacji izolaty wirusa TuMV (CDN1 i CZE1) wywołują lokalną i systemiczną infekcję rzepaku odmiany Westar, która została poddana transformacji.

W przedstawionych w tabeli 2 wynikach wskazuje się na całkowity brak korelacji pomiędzy liczbą kopii transgenów (ustaloną na podstawie testu kanamycynowego) w genomie wyselekcjonowanych linii, a zdolnością do odparcia ataku wirusa. Trzy linie z pojedynczą kopią transgeny (A29/1, A34/1 i A34/2) są podatne na infekcję, natomiast rośliny dwóch linii: A28/1 i A28/3, posiadających również jedną kopię transgeny wykazują najwyższą odporność. Podobnie przedstawia się to w przypadku linii z dwoma kopiami genu białka płaszczka. Linie A32/1 i A32/4 są podatne, przy równoczesnej wysokiej odporności linii A37/1 i A37/2. To samo obserwuje się dla linii z trzema i większą liczbą kopii (A31/2 i A39/2), choć w tym przypadku nie jest to takie wyraźne. Z danych zamieszczonych w tabeli 1 i 2 wynika, że spośród linii transgenicznych z jedną kopią transgeny na najbardziej obiecujące wyglądają linie A28/1

i A28/3. Obie te linie są hemizygotami w odniesieniu do transgeny. W związku z tym, że głównym celem opisywanych badań jest uzyskanie ozimych hodowlanych linii rzepaku odpornych na infekcje wirusem TuMV, jest bardzo istotne aby uzyskane pośrednie linie transgeniczne rzepaku odmiany Westar, które będą zastosowane podczas krzyżowań, były liniami homozygotycznymi w odniesieniu do transgeny. Aby uzyskać linie homozygotyczne wykonano kolejny test kanamycynowy dla tych linii. Na podstawie wyników testu wyselekcjonowano dwie linie homozygotyczne: A28/1/37 i A28/1/45 oraz dwie pozabawione transgeny (A28/1/39 i A28/1/40), które użyto w teście wirusologicznym jako linii kontrolnych.

Podczas inokulacji zastosowano dwa izolaty wirusa TuMV (CDN1 i CZE1). Rośliny inokulowano w stadium „4-liścia”, stosując dwa różne stężenia inokulum (podstawowe i 50-krotnie rozcieńczone). Lokalne symptomy oceniano po 14, a symptomy systemiczne po 28 dniach po inokulacji. Obecność i stężenie wirusa TuMV oceniano w liściach inokulowanych (po 21 dniach) i nie inokulowanych (po 32 dniach) za pomocą testu ELISA. Jako kontrolę stosowano: rzepak odmiany Westar, linie transgeniczne transformowane wektorem nie zawierającym genu białka płaszczka (wektor K), oraz dwie wyselekcjonowane linie kontrolne (A28/1/39 i A28/1/40). Analiza wirusologiczna obejmowała dwie linie homozygotyczne z pojedynczą kopią transgeny: A28/1/37 i A28/1/45 oraz jedną z dwoma kopiami transgeny A37/2/4 i jedną linię z trzema kopiami A39/2/2. Wyniki testu przedstawiono w tabeli 3.

TABELA 3
ODPORNOŚĆ WYSELEKCJONOWANYCH LINII TRANSGENICZNYCH RZEPAKU
NA INFEKCJĘ WIRUSEM TuMV (POKOLENIE T4)

Linie	Liczba roślin odpornych w stosunku do ogólnej liczby roślin użytych w teście	Liczba roślin podatnych w stosunku do ogólnej liczby roślin użytych w teście
kontrolne		
Westar	0/40	40/40
linie K	0/40	40/40
A28/1/39	0/40	40/40
A28/1/40	0/40	40/40
testowane		
A28/1/37	2/40 (5,0%)	38/40
A28/1/45	31/40 (77,5%)	9/40
A37/2/4	29/40 (72,5%)	11/40
A39/2/2	20/40 (50,0%)	20/40

Z danych zamieszczonych w tabeli 3 wynika, że rośliny transgeniczne (pokolenie T4) badanych linii reagowały na inokulację wirusem TuMV w zróżnicowany sposób. Najwyższy poziom odporności na infekcję wirusem TuMV (31 roślin odpornych na 40 użytych w teście) ujawnił się w przypadku linii A28/1/45 (pojedyncza kopia transgeny). Druga użyta w badaniach linia homozygotyczna z jedną kopią transgeny — A28/1/37, wykazała niemal całkowity brak odporności na atak wirusa TuMV (2 rośliny odporne na 40 użytych w teście). Linia posiadająca dwie kopie transgeny (A37/2/4) charakteryzowała się wysokim poziomem odporności na infekcję wirusa TuMV (29 roślin odpornych na 40 zastosowanych w teście), natomiast linia A39/2/2 posiadająca co najmniej trzy kopie transgeny w genomie wykazała średni poziom odporności na atak wirusowy (20 roślin odpornych na 40 zastosowanych w teście). Z danych przedstawionych w tabeli 3 wynika, że brak jest korelacji pomiędzy poziomem odporności na atak wirusa a liczbą kopii transgeny (ustaloną na podstawie testu kanamycynowego), zintegrowanego w genomach linii transgenicznych rzepaku. Nie znaleziono roślin odpornych w liniach kontrolnych. Dowodzi to, że obserwowana odporność linii transgenicznych nie jest przypadkowa, jak również, że jest ściśle związana z obecnością genu białka płaszczka w genomie transgenicznego rzepaku.

W sezonie wegetacyjnym 1996/1997 podjęto próbę przeniesienia odporności na wirusa TuMV z rzepaku jarego do rzepaku ozimego. W tym celu wykonano krzyżowania zwrotne pomiędzy czterema genotypami rzepaku ozimego podatnymi na chorobę wirusową (19), tj. odmianami Leo i Mar oraz rodami Mah 789 i Mah 1690, a trzema liniami transformowanymi A28/1/45 (linia odporna — tab. 3), A28/1/37 (linia podatna — tab. 3), A28/1/46 (linia kontrolna — podobnie jak ujęte w tab. 3 linie A28/1/39 i A28/1/40) i odmianą Westar. Liczby wykonanych krzyżowań oraz liczby otrzymanych nasion zestawiono w tabeli 4.

Efektywność krzyżowania wyrażona procentowym stosunkiem liczby otrzymanych nasion w odniesieniu do liczby zapylnych kwiatów była różna w zależności od tego, które z roślin stanowiły formę maticzną. Można zauważyć (tab. 4), że ogólnie wyższą efektywność krzyżowania obserwowano w kombinacjach, w których formę maticzną stanowiły rośliny jare. W większości tych przypadków efektywność krzyżowania wyniosła około lub znacznie powyżej 1500%. Odwrotne kombinacje krzyżowań, tj. te, w których formę maticzną stanowiły genotypy ozime dawały wyraźnie mniejszą efektywność krzyżowań w porównaniu z kombinacjami odwrotnymi, która w większości oscylowała około 500%, a w kilku przypadkach kształtowała się nawet poniżej 100%. Tak zmienne wyniki uzyskane z poszczególnych kombinacji krzyżowań świadczą o występowaniu jednostronnej zgodności krzyżowania, na co również zwracają uwagę inni autorzy (21-24).

Wybrane na podstawie wyników planowanego testu wirusologicznego linie mieszańcowe rzepaku odporne na chorobę wirusową będą następnie oceniane pod kątem ich ozimości, jak również zachowania innych korzystnych cech agronomicznych na przykład plonu oleju czy jego składu.

TABELA 4

WYNIKI KRZYŻOWAŃ ZWROTNYCH CZTERECH GENOTYPÓW RZEPAKU OZIMEGO (LEO, MAR, MAH 789 I 1690)
Z TRZEMA TRANSGENICZNYMI LINIAMI RZEPAKU JAREGO

Kombinacja krzyżowania	Liczba wykonanych krzyżowań	Liczba otrzymanych łuszczyń	Liczba otrzymanych nasion	Efektywność krzyżowania (%)*
A28/1/45 x Leo	12	11	196	1633,3
A28/1/45 x Mar	10	9	153	1530,0
A28/1/45 x Mah789	20	14	298	1490,0
A28/1/46 x Mar	11	10	183	1663,6
A28/1/46 x Mah 789	8	5	117	1462,5
A28/1/46 x Mah 1690	15	11	234	1560,0
A28/1/37 x Leo	13	11	202	1553,8
A28/1/37 x Mar	11	10	274	2490,9
A28/1/37 x Mah 789	10	9	182	1820,0
A28/1/37 x Mah 1690	7	7	152	2171,4
Westar x Mar	16	11	280	1750,0
Westar x Mah 789	3	2	26	866,7
Leo x A28/1/45	11	0	0	0,0
Leo x A28/1/46	15	5	12	80,0
Leo x A28/1/37	20	5	44	220,0
Leo x Westar	24	8	34	141,7
Mar x A28/1/45	14	4	9	64,3
Mar x A28/1/46	12	6	53	441,7
Mar x A28/1/37	18	17	84	466,7
Mar x Westar	9	5	38	422,2
Mah 789 x A28/1/45	16	13	62	387,5
Mah 789 x A28/1/46	15	10	79	526,7
Mah 789 x A28/1/37	32	18	31	96,9
Mah 789 x Westar	38	16	72	189,5
Mah 1690 x A28/1/45	14	3	32	228,6
Mah 1690 x A28/1/46	18	3	3	16,7
Mah 1690 x A28/1/37	10	5	74	740,0
Mah 1690 x Westar	9	4	45	500,0

* procent zawiązanych nasion w stosunku do liczby zapylonych kwiatów.

Badania opisane w pracy zostały sfinansowane przez Komitet Badań Naukowych (Grant nr 5 P06A/001/11).

Literatura

1. Sanford J. C., Johnston S. A., (1985), *J. Theor. Biol.*, 113, 395-405.
2. Powell-Abel P. P., Nelson R. S., De B., Hoffman N., Rogers S. G., Fraley R. T., Beachy R.N., (1986), *Science*, 232, 738-743.
3. Beachy R. N., (1997), *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 215-220.
4. Beachy R. N., Loesch-Fries S., Tumer N. E., (1990), *Ann. Rev. Phytopathol.*, 28, 451-474.
5. Fitchen J. H., Beachy R. N. (1993), *Ann. Rev. Microbiol.*, 47, 739-763.
6. Lomonosoff G. P., (1995), *Ann. Rev. Phytopathol.*, 33, 323-343.
7. Wilson T. M. A., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 3134-3141.
8. Reimann-Philipp U., Beachy R. N., (1993), *Virology*, 4, 349-356.
9. Dougherty W. G., Parks T. D., (1995), *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7, 399-405.
10. Lindbo J. A., Silva-Rosales L., Proebsting W. M., Dougherty W. G., (1993), *Plant Cell*, 5, 1749-1759.
11. Smith H. A., Swaney S. L., Parks T. D., Wernsman E. A., Dougherty W. G., (1994), *Plant Cell*, 6, 1441-1453.
12. Baulcombe D. C., (1996), *Plant Cell*, 8, 1833-1844.
13. Goodwin J., Chapman K., Swaney S., Parks T. D., Wernsman E. A., Dougherty W. G., (1996), *Plant Cell*, 8, 95-105.
14. Poulsen G. B., (1996), *Plant Breeding*, 115, 209-223.
15. Passaliegue E., Kerlan C., (1996), *Plant Sci.*, 113, 79-89.
16. Jun S. I., Kwon S. Y. M., Paek K. Y., Paek K. H., (1995), *Plant Cell Rep.*, 14, 620-625.
17. Hardwick N. V., Davies J. M. L., Wright D. M., (1994), *Plant Pathol.*, 43, 1045-1049.
18. Walsh J. A., Tomlinson J. A., (1985), *Ann. Appl. Biol.*, 107, 485-495.
19. Ostrówka K., Lehmann P., Walsh J. A., Kozubek E., (1993), *Genet. Polon.*, 34, 153-157.
20. Moloney M. M., Walker J. M., Sharma K. K., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 238-242.
21. Batra V., Prakash S., Shivanna K. R., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 80, 537-541.
22. Gundimeda H. R., Prakash S., Shivanna K. R., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 83, 655-662.
23. Nanda Kumar P. B. A., Shivanna K. R., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 770-776.
24. Wojciechowski A., (1985), *Genet. Polon.*, 26, 423-436.

Transgenic lines of rape resistant to infection of turnip mosaic virus (TuMV)

Summary

Transgenic *Brassica napus* var. *oleifera* cv. Westar plants that express the coat protein gene of the turnip mosaic virus (TuMV) were generated. The transgenic plant lines that contained one, two and at least three transgenes inserts in both homozygous and hemizygous conditions were produced and examined. Twelve different transgenic plant lines (in T3 generation) were analysed for resistance to TuMV. Three different responses were observed when the transgenic plant lines were inoculated with TuMV: 1) some were highly resistant, 2) some were medium resistant and, 3) some were susceptible to TuMV infection. We did not find any correlation between the number of copies of the transgene and virus resistance. The most promising transgenic line was used to breed a few winter cultivars of rape to induce the pathogen-mediated virus resistance in these cultivars.

Key words:

pathogen-mediated resistance, transgenic plants, oilseed rape, turnip mosaic virus, TuMV, transgenes, coat protein gene.

Adres do korespondencji:

Przemysław Lehmann, Pracownia Inżynierii Genetycznej, Instytut Genetyki Roślin, PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, e-mail: pleh@igr.poznan.pl.