

Molekylära interaktioner mellan Potatisvirus A och dess värdar: rekombination, RNA-interferens och resistens mot systemisk virustransport

Elin Gammelgård

Potatisvirus A (PVA) har en arvs massa bestående av enkelsträngat RNA och tillhör släktet *Potyvirus* (familjen *Potyviridae*). Den viktigaste värdväxten är potatis och PVA kan orsaka 40% skörde förlust om den infekterar tillsammans med Potatisvirus Y eller Potatisvirus X.

Sjukdomar orsakade av virus, bakterier, svampar, nematoder och protozoa minskar världens skördar med 10-20%. Virus är speciellt svåra att kontrollera eftersom de inte kan bekämpas med kemikalier. Det bästa sättet att kontrollera virus är genom virusfritt odlingsmaterial, virusresistenta sorter och lämpliga jordbruksåtgärder. I den här avhandlingen har vi studerat växtens immunförsvar mot virus med hjälp av PVA och dess värdar potatis och *Nicotiana benthamiana* som modellsystem. Vi har undersökt hur rekombinanter mellan två olika PVA-isolat interagerar med *N. benthamiana* jämfört med de ursprungliga PVA isolaten. I en annan studie undersöktes vilken molekylär mekanism som ger resistens mot systemisk transport av PVA i potatis och i ytterligare en studie studerades RNA interferens, som är en naturlig försvarsmekanism mot virus.

För att kunna infektera växterna under kontrollerade former gjordes cDNA kloner av PVA. En cDNA klon av isolatet PVA-B11 infekterade *N. benthamiana* systemiskt men inte potatis. Därför konstruerades en ny cDNA klon baserat på PVA-U, ett isolat som infekterar potatis systemiskt. Klonen tillverkades genom rekombination, d.v.s. att fragment av PVA-B11 gradvis ersattes av fragment av PVA-U. Rekombination är också en process som sker naturligt hos RNA virus. De rekombinanta virus som uppstod under konstruktionsprocessen användes för att studera hur rekombination mellan två väldigt lika virus kan förändra interaktionerna mellan växt och virus. Våra resultat visade att rekombination mellan två närbesläktade virus kan resultera i nya virusstammar som orsakar virusnivåer och symptom som inte liknar interaktionerna mellan ursprungsvirusen och värden. Den nya cDNA-klonen av PVA-U, pUFL, och de rekombinanta virusen infekterade potatis systemiskt och kunde användas för att studera resistens mot systemisk transport av PVA i potatis.

I potatis med resistens mot systemisk transport kan PVA förflytta sig från cell till cell i infekterade blad men det kan inte flytta sig systemiskt i växten, d.v.s. ut ur bladet genom stjälken och in i nya blad. Den mest välkända formen av resistens mot systemisk transport i virus kontrolleras av dominanta resistensgener och är associerad med nekrotiska fläckar på infekterade blad och induktion av många försvarsgener. I den resistens mot systemisk transport av PVA i potatis som vi undersökt är dock inga kända dominanta gener inblandade och ingen nekros uppkommer på infekterade blad. Det är okänt hur resistensen uppkommer, men den här typen av resistenser har ofta antagits vara passiva och uppstå på grund av misslyckade interaktioner mellan virus och värd. För att försöka förstå mekanismen som ger upphov till resistensen använde vi oss av olika metoder av funktionell genomik för att jämföra genuttrycket i resistenta och känsliga

växter. Resultaten visade att det finns en låg uppreglering av 645 gener i resistenta växter jämfört med känsliga och det kan inte uteslutas att de är involverade i resistensmekanismen. Det var dock bara en genfamilj av proteinasinhistorer som var signifikant uppreglerad i resistenta växter.

RNA-interferens innebär att dubbelsträngat RNA sätter igång en process i växten där likadant RNA bryts ned. RNA-interferens är en naturlig försvarsmekanism mot virus i växter. Viruserna har utvecklat olika metoder där deras proteiner undertrycker RNA interferens. För att kunna studera hur PVA förflyttar sig i potatis med resistens mot systemisk transport placerades genen för green fluorescent protein (GFP) i pUFL, den nya klonen kallades PVA-GFP. GFP är ett protein från en manet som lyser grönt under ultraviolettt ljus. PVA-GFP kunde inte infektera potatis men *N. benthamiana*. När PVA-GFP infekterade *N. benthamiana* som transformerats med *gfp* tystades *gfp*-genen på grund av RNA interferens trots att PVA i vanliga fall har ett protein som undertrycker RNA-interferens. PVA-GFP och 16c användes som ett nytt modellsystem för att studera hur virusinfektion och RNA-interferens sprider sig systemiskt i växten.