

FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Institute for Special Crop Cultivation and Crop Physiology
University of Hohenheim
PD Dr. Goetz Reustle

**Development of a strategy to induce RNA-silencing in squash against virus
diseases by genetic transformation**

Dissertation

Submitted in fulfilment of the requirements for the degree “Doktor der Agrarwissenschaften”
(Dr.sc.agr. / Ph.D. in Agricultural Sciences)

to the

Faculty of Agricultural Sciences

presented by

Yehia Khidr

Egypt

2007

5 Summary

Viral diseases of Cucurbits are an important limitation in the production of the crop. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) and *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2) are the most important squash (*Cucurbita pepo* L.) infecting viruses. Mixed infections with these viruses are deleterious for cucurbitaceous plants leading annually to significant yield losses world wide. All varieties of economical importance are susceptible for these viruses and classical breeding did not yield resistance. Therefore, a transgenic approach was chosen to induce resistance against both viruses by post-transcriptional gene silencing (PTGS).

Highly conserved regions in the coat protein genes of ZYMV and WMV-2 were chosen to establish an inverted repeat construct. This construct was cloned into binary vector under control of the 35S promoter.

Embryogenic callus was induced from different organs of three squash cultivars as target tissues for *Agrobacterium* transformation. The embryogenic callus was developed within 13-20 weeks incubation on MS medium containing different plant growth regulator combinations of auxin and cytokinin. Induction of embryogenesis in different explants ranged from 5 to 100 % depending on the organ and genotype used. Efficiency of embryo maturation, conversion and germination into entire plants from squash embryogenic callus was found to be callus age depended. Regeneration with young (2 months old) material was efficient, whereas regeneration of material maintained under in vitro conditions for more than 2 years was not possible.

Agrobacterium-mediated transformation of squash embryogenic callus was established using transient GUS-gene expression. The highest transformation efficiency was obtained with the supervirulent ATHV strain, bacterial density of 0.85, washing procedure of the embryogenic material prior to *Agrobacterium* co-culture, application of 1 mM Acetosyringone in induction medium and sub-culturing of embryogenic callus on fresh MS medium 5-9 days prior co-culturing with the *Agrobacterium*.

Selection strategy was optimized using GFP as reporter gene. For the genotype CX3006 300 mg/l Kanamycin showed the highest number of green areas but most efficient selection agent was Paromomycin 150 mg/l. For the genotype Dundoo 200 mg/l Paromomycin was the

effective selection agent and showed the highest number of green areas. Selection of transformed calli could be efficient with the used selection agents but regeneration of transgenic plant was not possible because the old material was only one to be used for transformation experiments. It seems that these old materials may have lost their competency when they were maintained for long term in tissue culture. Therefore, the functionality of the inverted repeat construct was evaluated in *Nicotiana benthamiana* as a model plant. Transgenic lines were analyzed by PCR, Southern blot analysis and segregation analysis of T1 offspring.

The transgene-induced PTGS in transgenic lines was confirmed by infiltration of GFP-sensor constructs containing viral derived sequences as silencing target and /or a construct containing the p19 silencing suppressor. In all transgenic lines tested, GFP fluorescence in infiltrated leaves was extinguished three days post-infection with GFP-sensor constructs. In contrast, all transgenic lines showed GFP fluorescence in infiltrated leaves when GFP-sensor constructs were co-infiltrated with a binary vector containing the viral silencing suppressor p19.

With this work, tools have been developed to engineer virus resistance in squash. Using the optimized *Agrobacterium*-mediated transformation procedure together with the efficient RNA-silencing of the inverted inverted repeat construct and freshly induced embryogenic material it is quite possible to establish virus resistance in squash.

6 Zusammenfassung

Virusbefall verursacht beim Zucchini-Anbau weltweit einen großen wirtschaftlichen Schaden. Früchte von virusinfizierten Pflanzen weisen mosaikähnliche Verfärbungen und schwerwiegende Deformationen auf, Pflanzen sind gestauch und Blätter deformiert. Von den verschiedenen Viren, die weltweit für den Befall von Zucchini und anderen Cucurbitaceae verantwortlich sind, gehören ZYMV und WMV-2 zu den bedeutendsten. Die konventionelle Züchtung konnte zwar bereits virustolerante Sorten hervorbringen, diese können jedoch Mischinfektionen oder der Befall von aggressiven Stämmen der o. g. Viren auf dem Felde nicht standhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein transgene Strategie gewählt, um mittels ‚Post Transkriptionales Gen Silencing‘ Resistenzen gegen ZYMV und WMV-2 in Zucchini zu induzieren.

Für die Herstellung eines ‚Inverted Repeat‘-Konstrukts wurden hochkonservierte Sequenzbereiche aus den Hüllproteinen des ZYMV und des WMV-2 verwendet. Das Konstrukt wurde unter Kontrolle des 35S Promotors in einen binären Vektor kloniert.

Als Ausgangsmaterial für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Zucchini wurde somatisch embryogener Kallus ausgewählt. Nach 13 bis 20 Wochen Inkubation auf hormonhaltigem Medium konnte an verschiedenen Explantaten bei allen 3 verwendeten Zucchini Genotypen embryogener Kallus induziert werden. Je nach verwendetem Explantat und Genotypen wurde eine Effizienz der Embryogenese von 5 bis 100% festgestellt. Die Reifung der somatischen Embryonen und ihre Konversion zu Pflanzen zeigten sich als stark abhängig vom Alter des embryogenen Kallus. Die Reifung und Konversion von frisch induziertem embryogenem Material war sehr effizient. Nach einer 2 jährigen Erhaltungsphase unter *in vitro* –Bedingungen war eine Reifung und Konversion jedoch nicht mehr möglich.

Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von embryogenem Kallus wurde mit Hilfe der transienten Expression des GUS-Gens etabliert. Die höchste transiente Expression konnte bei Anwendung folgender Parameter erreicht werden: Verwendung des supervirulenten *Agrobacterium*-Stamms ATHV, optische Dichte von 0,85 der Bakteriensuspension, Waschbehandlung des embryogenen Materials vor der Cokultur, die Applikation von 1 mM Acetosyringon während der Cokultur und einer Vorkulturphase von 5-9 Tagen vor der

Cokultur. Die Optimierung der Selektion von transformierten Zellen wurde mit Hilfe des GFP-Reportergens durchgeführt. Für den Genotypen CX3006 zeigte eine Kanamycin-Konzentration von 300 mg/l die größte Zahl von GFP-positiven Bereichen, jedoch war die Selektion mit Paramomycin am effizientesten, da nur eine Konzentration von 150 mg/l benötigt wurde. Für den Genotypen Dundoo erwies sich Paramomycin in einer Konzentration von 200 mg/l als effizientestes Selektionsmittel. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Selektion von transformierten embryogenen Zellen möglich ist, konnte während dieser Arbeit keine transgenen Zucchiniplanzen regeneriert werden, da für die Transformationsexperimente bedauerlicherweise nur auf altes embryogenes Kallusmaterial zurückgegriffen werden konnte, das während der langen Erhaltungskulturphase die Kompetenz zur Regeneration verloren hat.

Die Funktionalität des ‚Inverted Repeat‘-Konstrukts wurde in der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* nachgewiesen. Transgene *N. benthamiana*-Pflanzen wurde mit PCR, Southern Blot Analyse untersucht und die Aufspaltung in der T1-Generation überprüft. Bei allen untersuchten Linien konnte PTGS in Infiltrationsexperimenten gezeigt werden. Hierbei wurden GFP-Sensorkonstrukte allein bzw. in Kombination mit einem P19-Konstrukt infiltriert. In allen Linien konnte nach Infiltration der Sensorkonstrukte keine GFP-Fluoreszenz beobachtet werden, hingegen führte eine kombinierte Infiltration der Sensorkonstrukte mit dem P19 Supressor bei allen Linien zu einer starken GFP-Fluoreszenz.

Mit dieser Arbeit konnte die Voraussetzung für die Herstellung von virusresistentem Zuchtinmaterial geschaffen werden. Mit Hilfe des etablierten Protokoll für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von embryogenen Zuchzinizellen und dem funktionellen ‚Inverted Repeat‘-Konstrukt besteht die Möglichkeit, in Zukunft ausgehend von frisch induziertem embryogenem Kallus transgene virusresistente Zucchiniplanzen erzeugt zu erzeugen.