

PREIZKUŠANJE TRANSGENIH LINIJ KROMPIRJA SORTE DÉsirÉE ZA ODPORNOST PROTI KOLORADSKEMU HROŠČU (*Leptinotarsa decehlineata* [Say])

Primož ŽIGON¹, Maja GRUNDER², Anastasija PANEVSKA³, Anna COLL RIUS⁴,
Tjaša LUKAN⁵, Karmen POGAČAR⁶, Marko PETEK⁷, Jaka RAZINGER⁸, Kristina
GRUDEN⁹, Kristina SEPČIČ¹⁰

^{1,8} Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Ljubljana
^{4-7,9} Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemski biologijo,
Ljubljana
^{2,3,10} Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

IZVLEČEK

Kljub dolgoletnim izkušnjam z zatiranjem koloradskega hrošča (*Leptinotarsa
decehlineata* [Say]) (Coleoptera, Chrysomelidae), se zaradi zmanjševanja nabora
učinkovitih insekticidov in razvoja odpornosti proti aktivnim snovem njegova
problematika pri pridelavi krompirja povečuje. Biotehnološki pristopi kot so metode
genske transformacije, omogočajo izboljšavo odpornosti rastlin proti škodljivcem in
predstavljajo pomembno in okoljsko bolj sprejemljivo alternativo kemičnim
insekticidom. Nedavno dokazana specifična učinkovitost proteinskih kompleksov na
osnovi egerolizinov iz gliv rodu *Pleurotus* proti koloradskemu hrošču kaže na potencial
njihove uporabe pri razvoju odpornih rastlin krompirja. Z metodami genske
transformacije smo gene za sintezo egerolizinskih proteinov in pleurotolizina B vnesli
v krompir sorte Désirée. Insekticidni učinek na ličinke koloradskega hrošča smo
preučevali na rastlinah, ki smo jih gojili v rastlinjaku. Pri eni izmed transformiranih
linij (KISIA L1) smo ugotovili značilno povečanje smrtnosti in pri dveh linijah (KISIA
L1 in L6) slabšo vitalnost ličink, ki je bila posledica izrazitega zmanjšanja
prehranjevanja na listih. Ličinke, ki so se hranile z listnim tkivom transformiranih
rastlin posledično niso povzročile omembe vrednih poškodb na rastlinah in so bile v
povprečju 6-krat lažje od ličink v kontroli. Poleg tega je le 37 % ličink, ki so se hranile
na transformiranih rastlinah dokončalo svoj razvojni krog in se razvilo v odrasle hrošče.
Rezultati raziskave kažejo na velik potencial proteinskih kompleksov PlyA2/PlyB za

21

¹ mag. inž. agr., Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: primoz.zigon@kis.si

² dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

³ dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

⁴ dr., prav tam

⁵ dr., prav tam

⁶ mag. bioteh., prav tam

⁷ dr., prav tam

⁸ dr., Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana

⁹ prof. dr., Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

¹⁰ prof. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

razvoj gensko spremenjenega krompirja. Na podlagi rezultatov raziskave sklepamo, da bi pridelava transgenega krompirja z izražanjem insekticidnega proteinskega kompleksa PlyA2/PlyB lahko omogočila zmanjšanje uporabe insekticidov in učinkovitejši ter bolj trajnosten način varstva pred koloradskim hroščem.

Gljučne besede: gensko spremenjena rastlina, bioinsekticid, *Solanum tuberosum*, egerolizin, v rastlino vključena zaščita, zatiranje ličink

ABSTRACT

TESTING TRANSGENIC DÉSIRÉE POTATO LINES FOR RESISTANCE TO THE COLORADO POTATO BEETLE (*Leptinotarsa decemlineata* [Say])

Despite many years of experience in the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* [Say]) (Coleoptera, Chrysomelidae) control, its problem in potato production is increasing due to the reduction of the range of effective insecticides and the development of resistance to active substances. Biotechnological approaches such as genetic transformation techniques enable the improvement of plant resistance to pests and represent an important and more environmentally friendly alternative to chemical insecticides. The recently demonstrated specific efficacy of the aegerolysin-based protein complexes from fungi of the genus *Pleurotus* against the Colorado potato beetle demonstrates the potential of their use in the development of resistant potato plants. Genes for the synthesis of aegerolysin protein and pleurotolysin B were introduced into potatoes of the Désirée variety using genetic transformation methods. The insecticidal effect on the Colorado potato beetle larvae was studied on potted plants in greenhouse experiments. In one of the transformed lines (KISIA L1), we found a significant increase in mortality and a decrease in vitality of the larvae, caused by a severe reduction of feeding in two transformed lines (KISIA L1 and L6). As a result, the larvae feeding on the leaf tissue of the transformed plants caused insignificant damage to the plants and were on average 6 times lighter than the larvae in the control group. In addition, only 37 % of the larvae that fed on the transformed plants completed their life cycle and developed into adult beetles. The results suggest that cultivation of PlyA2/PlyB insecticidal protein complex-transformed potato may not only preserve savings from reduced insecticide use, but also offer better and more sustainable management of Colorado potato beetle.

Keywords: genetically modified crop, aegerolysin, biopesticide, larval toxicity, plant incorporated bioprotectant, *Solanum tuberosum*

1 UVOD

Koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera, Chrysomelidae) je eden najpomembnejših škodljivcev krompirja, ki kljub zatiranju z insekticidi povzroča velike gospodarske izgube po vsem svetu (Alyokin, 2008). Zatiranje koloradskega hrošča pretežno temelji na uporabi foliarnih sintetičnih insekticidov, ki imajo lahko škodljive učinke na okolje in zdravje ljudi. Med drugim sta eni izmed možnih okoljsko bolj sprejemljivih alternativ tudi uporaba biopesticidov ali proizvodnja in pridelava gensko spremenjenega krompirja z vnosom genov za odpornost proti koloradskemu

hrošču (Gödel in sod., 2020). Velik potencial za odkrivanje in razvoj novih, okolju in ljudem prijaznih metod zatiranja ličink koloradskega hrošča so v preteklih raziskavah potrdili tudi za proteine iz družine aegerolizinov, ki izhajajo iz užitnih gob ostrigarjev (*Pleurotus* sp.) (Berne in sod., 2009; Butala in sod., 2017; Novak in sod., 2021a). Membranski lipidni receptor z visoko afiniteto za te proteine je ceramid fosfoetanolamin (CPE) (Milijaš Jotić in sod., 2021; Panevska in sod., 2019a), ki je tudi glavni sfingolipid v celičnih membranah žuželk (Panevska in sod., 2019b). Egerolizini skupaj s proteinskim partnerjem pleurotolizinom B (PlyB), ki ga proizvajajo iste glive, tvorijo transmembranske pore in posledično delujejo toksično na žuželke, ki v svojih membranah vsebujejo CPE. Natančneje so z laboratorijskimi prehranskimi testi dokazali selektivno toksičnost egerolizinskih kompleksov OlyA6/PlyB, PlyA2/PlyB in EryA/PlyB za ličinke in imago dveh škodljivcev iz družine lepenjcev (Chrysomelidae), koloradskega in koruznega hrošča (*Diabrotica virgifera virgifera*) (Panevska in sod., 2019a), kar kaže na možnost uporabe tovrstnih citolitičnih kompleksov za razvoj gensko spremenjenih rastlin krompirja in koruze. Z uporabo metod genske transformacije je bil v sklopu te raziskave razvit transgeni krompir z izražanjem bioinsekticidnega kompleksa PlyA2/PlyB. V prispevku povzemamo rezultate prehranskih testov, ki smo jih izvedli na transgenih rastlinah krompirja za ugotavljanje toksičnega delovanja proti ličinkam koloradskega hrošča.

23

2 MATERIALI IN METODE

Genske konstrukte za izražanje ciljnih genov PlyA2 in PlyB smo optimizirali za izražanje v krompirju. Konstrukte smo testirali s prehodno transformacijo rastlin tobaka (*Nicotiana benthamiana*) in vzorčenjem listov tri dni po transformaciji s poskusom hemolize ter z analizo po Westernu. Z izbranimi konstrukti smo transformirali genotip rastline Désirée po transformacijskem protokolu, optimiziranem na Nacionalnem inštitutu za biologijo Slovenije. Glede na predhodno opravljene prehranske teste, ki smo jih izvedli *in vitro* ter glede na učinkovitost produkcije insekticidnih proteinov v listih, smo izbrali dve liniji transgenega krompirja (KISIA L1, KISIA L6). Izbrani liniji smo vključili v nadaljnja biološka preizkušanja, ki smo jih opravili na živih, rastočih rastlinah *in vivo*.

Vsako obravnavanje (KISIA L1, KISIA L6, Désirée NT - kontrola) je vključevalo tri transformirane rastline, pridobljene iz tkivnih kultur. Rastline so bile posajene v lonce in posamezno nameščene v aluminijaste kletke, prekrite s protiinsektno mrežo. Na vsako rastlino smo na zgornjo stran listov namestili 20 ličink (starost 1-2 dni). Posamezen poskus je trajal približno dva meseca. V prvem delu poskusa smo ocenjevali neposredne učinke hranjenja ličink na transgenih rastlinah (preživetje in sprememba mase ličink). V tem obdobju smo poskus dnevno opazovali in beležili število živih ličink. Osem dni po začetku poskusa se je število ličink v kontrolnem obravnavanju zmanjšalo, saj so dokončale svoj razvoj in se začele zabubljati v tleh. Podatke o preživelosti ličink smo zato analizirali le do 8. dne po izpostavitvi, da bi se izognili precenjevanju smrtnosti v kontrolnem obravnavanju. Učinek različnih obravnavanj na maso ličink smo določili 10. dan po izpostavitvi, tako da smo preživele ličinke stehtali. Poskus se je nadaljeval do 30. dne, ko so vse ličinke zaključile svoj razvojni cikel, se preselile v zemljo in zabubile. Druga faza bioloških testov je bila osredotočena na stopnjo izleganja odraslih hroščev iz bub in določanje stopnje plodnosti odraslih samic. Pojav novih hroščev smo spremljali v obdobju enega meseca po pojavu prvega hrošča pri posamezni rastlini. Na novo

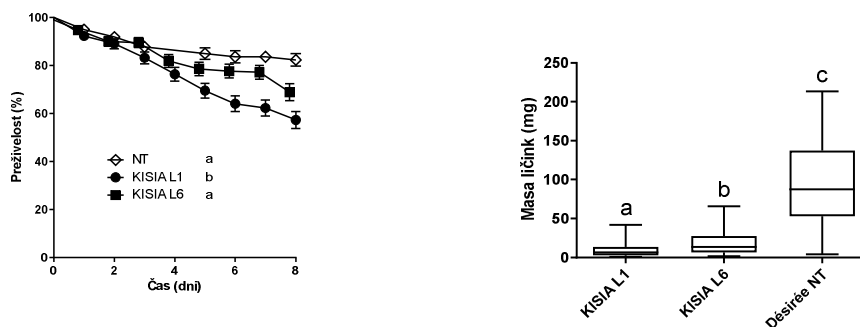
izlegle hrošče smo odstranili iz kletk z rastlinami in jih prenesli v gojitvene mrežnike s kontrolnimi (netransformiranimi) rastlinami. Za oceno plodnosti izleglih samic smo mrežnike vsak dan opazovali na prisotnost novo odloženih jajčnih legel in število jajčec v posameznem jajčnem leglu. Tovrstno biološko preizkušanje je bilo neodvisno ponovljeno štirikrat.

Podatki o preživetju ličink smo analizirali z analizo preživetja po Kaplan–Meierju z Bonfferonijevo korekcijo. Razlike v preživelosti med posameznimi obravnavami smo določili na podlagi izračuna razmerja ogroženosti (t.i. Hazard ratio), ki opisuje relativno spremembo tveganja za pojav smrtnosti. Razmerje ogroženosti smo izračunali za vsako obravnavanje posebej in ga primerjali s kontrolnim obravnavanjem. Vpliv hranjenja s transgenimi rastlinami krompirja na spremembe mase ličink, intenziteto hranjenja, število izleglih hroščev in parametre plodnosti smo v primeru normalne razporejenosti podatkov, statistično obdelali z enosmerno analizo variance ANOVA ($p < 0,05$) in Tukeyjevim testom mnogoterih primerjav. Kadar podatki niso bili normalno porazdeljeni smo jih analizirali s Kruskal–Wallisovim testom ($p < 0,05$), ki mu je sledil Dunnov post hoc-test mnogoterih primerjav. Podatke smo analizirali in grafično prikazali z uporabo programa GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, CA).

3 REZULTATI Z DISKUSIJO

24

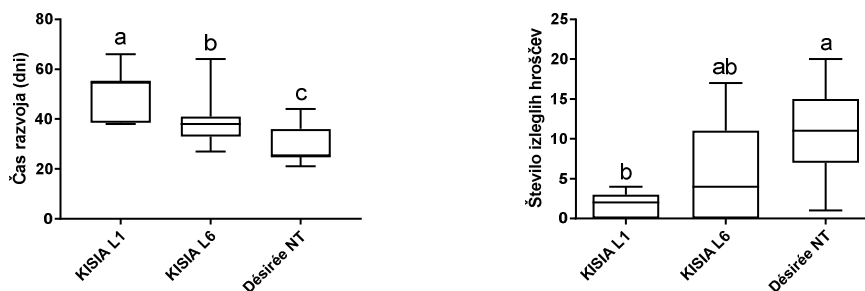
Prehranjevanje mladih ličink na rastlinah transgenih linij KISIA L1 in KISIA L6 je v prvih 8 dneh trajanja poskusa značilno vplivalo na njihovo preživetje ($\chi^2 = 29$; $P < 0,0001$) (Slika 1). Prehranjevanje ličink na listih rastlin KISIA L1 je značilno zmanjšalo preživelost ličink. Razmerje tveganja je bilo višje v obravnavanju KISIA L1 (2,61) v primerjavi s skupino KISIA L6 (1,71), vendar razlika ni bila statistično značilna. Ličinke, ki so se 10 dni hranile na transgenih rastlinah, so imele v povprečju značilno nižjo maso (Slika 1 desno) (statistika Kruskal–Wallis = 175; $P < 0,0001$), kar kaže na poslednje učinke prehranjevanja z listnim tkivom transgenih rastlin v smislu zmanjšane intenzitete prehranjevanja in morebitnih drugih fizioloških učinkov.



Slika 1: Preživelost ličink (%) \pm SN (levo) in povprečna masa ličink (mg) \pm SN po 8 dneh hranjenja na transgenih rastlinah (KISIA L1 in KISIA L6) in netransformiranih rastlinah krompirja (Désirée NT) (desno). Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji.

Razvoj ličink, ki so se prehranjevale s transgenimi rastlinami, je bil značilno počasnejši v primerjavi z ličinkami, ki so se hranile z netransformiranimi rastlinami (Kruskal–Wallisova statistika = 70,2; $P < 0,0001$, slika 2 levo). Pri kontrolnem obravnavanju je trajal celoten življenjski cikel (tj. štiri stopnje ličinke, predbuba, buba, preobrazba in pojav imaga) v povprečju 29 ± 1 dni. Po hranjenju s transgenimi rastlinami je bil razvoj upočasnen, saj smo prve hrošče v kletkah našli 20 oziroma 8 dni kasneje (trajanje življenjskega cikla pri KISIA L1 49 ± 3 oziroma 37 ± 1 dni pri KISIA L6). Hranjenje s transgenimi rastlinami je tudi značilno zmanjšalo izleganje odraslih koloradskih hroščev. V kletkah z rastlinami KISIA L1 se je namreč pojavilo petkrat manj hroščev (v odrasle hrošče se je razvilo 11 % začetnih ličink) oziroma dvakrat v KISIA L6 (v odrasle hrošče se je razvilo 37 % začetnih ličink) v primerjavi s kontrolo, kjer se je v odrasle hrošče v povprečju razvilo 65 % začetnih ličink (slika 2 desno).

25



Slika 2: Povprečen čas razvoja ličink (število dni) \pm SN (levo) in povprečno število izleglih hroščev \pm SN po hranjenju na transgenih rastlinah (KISIA L1 in KISIA L6) in netransformiranih rastlinah krompirja (Désirée NT) (desno). Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavanji.

Hranjenje ličink na rastlinah KISIA L1 in KISIA L6 ni imelo vpliva na plodnost hroščev, saj so vse izlegle samice v obeh obravnavanjih odlagale jajčeca. Prav tako ni bilo značilnih razlik v drugih plodnostih parametrih kot je število jajčec na jajčno leglo, število jajčnih legel na samico in število jajčec na samico.

4 SKLEPI

Rezultati raziskave kažejo na velik potencial proteinskih kompleksov PlyA2/PlyB za razvoj gensko spremenjenega krompirja za učinkovito obrambo pred koloradskim hroščem. Podobne insekticidne učinke gre pričakovati tudi v primeru genetske modifikacije drugih kmetijskih rastlin za odpornost proti drugim gospodarsko pomembnim škodljivcem (Panevska in sod. 2019a, Pavšič, 2021). Tak pristop bi lahko predstavljal pomemben okolju in ljudem prijazen način varstva rastlin z manjšimi možnostmi za pojav odpornosti, saj je lipidni receptor egerolizina, ceramid fosfoetanolamin, bistvena sestavina celičnih membran žuželk. Prav tako je treba omeniti, da ti proteinski kompleksi, ki izvirajo iz užitnih gob, ne kažejo ali so zelo nizko toksični za dvokrilce, metulje in druge neciljne členonožce ali vrste sesalcev (Panevska

in sod., 2019b, 2021), in – zaradi svoje beljakovinske narave in s tem nižje obstojnosti v okolju – ne predstavljajo nevarnosti za okolje. Pridelava krompirja z vsebnostjo insekticidnih proteinskih kompleksov PlyA2/PlyB bi zato poleg manjših potreb po uporabi insekticidov omogočala tudi zdravju prijazno in okoljsko bolj vzdržno pridelavo.

5 ZAHVALA

Raziskava je bila opravljena v okviru temeljnega raziskovalnega projekta »Proteinski kompleksi iz glivnega rodu *Pleurotus* kot novi biopesticidi za zatiranje koloradskega in koruznega hrošča« (J4-1772) ter programske skupine Kmetijstvo naslednje generacije (P4-0431), ki ju financira Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS). Lepo se zahvaljujemo tudi Igorju Nekrepu za morfološke analize koloradskih hroščev.

6 LITERATURA

- Alyokhin, A., Baker, M., Mota-Sanchez, D., Dively, G., Grafius, E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *Am. J. Potato. Res.* 85, 395–413.
- Berne, S., Lah, L., Sepčič, K. 2009. Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. *Protein Science*, 18(4), 694–706.
- Butala, M., Novak, M., Kraševac, N., Skočaj, M., Veranič, P., Maček, P. and Sepčič, K. 2017. Aegerolysins: lipid-binding proteins with versatile functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 72, 142–151.
- Göldel, B., Lemic, D., Bažok, R. Alternatives to Synthetic Insecticides in the Control of the Colorado Potato Beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) and Their Environmental Benefits. *Agriculture* 2020, 10, 611.
- Milijaš Jotić, M., Panevska, A., Lacovache, I., Kostanjšek, R., Mravinec, M., Skočaj, M., Zuber, B. *et al.* 2021. Dissecting out the molecular mechanism of insecticidal activity of ostreolysin A6/pleurotolysin B complexes on Western corn rootworm. *Toxins*. 13, 455.
- Novak, M., Kraševac, N., Skočaj, M., Maček, P., Anderluh, G. and Sepčič, K. 2015. Fungal aegerolysin-like proteins: distribution, activities, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 601–610.
- Panevska, A., Hodnik, V., Skočaj, M., Novak, M., Modic, Š., Pavlic, I., Podržaj, S. *et al.* 2019a. Pore-forming protein complexes from *Pleurotus* mushrooms kill Western corn rootworm and Colorado potato beetle through targeting membrane ceramide phosphoethanolamine. *Sci. Rep.* 9, 5073.
- Panevska, A., Skočaj, M., Križaj, I., Maček, P., Sepčič, K. 2019b. Ceramide phosphoethanolamine, an enigmatic cellular membrane sphingolipid. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1861, 1284–1292.
- Panevska, A., Glavan, G., Jemec Kokalj, A., Kukuljan, V., Trobec, T., Žužek, M.C., Vrecl, M. *et al.* 2021. Effects of bioinsecticidal aegerolysin-based cytolytic complexes on non-target organisms. *Toxins*. 13, 457.
- Pavšič, A. 2021. Vrednotenje toksičnosti kompleksov egerolizinov in proteinov z domeno MACPF za žitnega strgača in kapusovega bolhača. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana. 81.