

Diss. ETH No. 11582

**Genetic Transformation of Rice (*Oryza sativa* L.)
to confer resistance to
Rice Tungro Bacilliform Virus (RTBV)**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Andreas Stefan Klöti
Dipl. natw. ETH

born May 20 1967
citizen of Zürich

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. I. Potrykus, examiner
Prof. Dr. K. Apel, co-examiner
Dr. J. Fütterer, co-examiner

March 1996

Summary

Rice tungro disease (RTD) is caused by the combination of two different viruses, rice tungro bacilliform virus (RTBV); [a doublestranded (ds)DNA virus] and rice tungro spherical virus (RTSV); [a singlestranded (ss)RNA virus], which are transmitted by insects. RTD is the most important viral disease of rice and causes average annual losses estimated in the range of 1.5 billion US\$ in South and South-East Asia. It is mainly RTBV that is responsible for the severe disease symptoms, causing yield reductions up to 100%. No natural resistance to the viruses could be transferred to commercial rice varieties by classical breeding, and resistances to the vector have been overcome by the insects.

The aim of this work was to induce resistance to RTBV in rice, using the newly developed methods of plant genetic engineering. To evaluate an efficient method, suitable for the transfer of many constructs to rice, the methods of tissue electroporation and particle bombardment were compared. By tissue electroporation, plasmids were transferred to the scutella of wheat embryos and to rice suspension cells. By particle bombardment, plasmids were transferred to rice scutella and rice suspension cells. With both methods, fertile transgenic rice plants could be produced. In terms of transformation efficiency, particle bombardment was superior to tissue electroporation and was chosen for the transfer of 32 different plasmids to rice.

The strategies for conferring RTBV resistance included expression or production of different RTBV components within the rice plant: expression of the putative viral coat protein, expression of the viral replicase including (mutated) subfragments and production of antisense RNA against an important part of the viral transcript. The expression of the transgenes, controlled by the Cauliflower mosaic virus 35S or the RTBV promoter, enhanced by an RTBV-derived intron, was localized in sections of leaf sheaths and blades with the help of a visual marker gene.

A total of 514 transgenic plants of the japonica cultivars Taipei 309 and Kinuhikari were regenerated and most were analysed in Southern analysis. Selected lines were analysed for the expression of the transgenes. In different lines, mRNA or protein from the transgenes could be detected. A total of 52 independent, transgenic lines were tested for virus resistance by inoculation by the natural vector in greenhouse tests at the International Rice Research Institute (IRRI). So far, no resistant line could be identified.

Zusammenfassung

Die Reis Tungro Krankheit wird durch ein Zusammenspiel von zwei verschiedenen Viren verursacht. Reis Tungro Bacilliform Virus (RTBV) besitzt ein doppelsträngiges DNS-Genom und Reis Tungro Spherical Virus (RTSV) hat ein einzelsträngiges RNS-Genom. Beide Viren werden durch Insekten übertragen. Die Reis Tungro Krankheit ist die schlimmste aller Reis-Virenkrankheiten und verursacht einen jährlichen Schaden in der Größenordnung von 1.5 Milliarden US\$. Für die Symptome der Krankheit ist hauptsächlich RTBV verantwortlich. Die Ernteauffälle können bis 100% betragen. Keine natürlichen Resistenzen gegen die Viren konnten bisher durch die Methoden der klassischen Züchtung in gebräuchliche Sorten übertragen werden. Natürliche Resistenzen gegen die Überträger der Viren wurden von den Insekten jeweils in kurzer Zeit überwunden.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels der neu entwickelten Methoden der Genübertragung auf Pflanzen, Resistenz gegen RTBV in Reis zu erzeugen. Um eine effiziente Methode für die Übertragung von vielen Gen-Konstrukten in Reis zu evaluieren, wurden zwei Methoden, die Gewebe-Elektroporation und der Partikel Beschuss, miteinander verglichen. Mit Hilfe der Gewebe-Elektroporation konnten Plasmide in die Scutellumzellen von Weizenembryonen und in Reis-Gewebekulturzellen übertragen werden. Durch Partikel Beschuss konnten Plasmide in die Scutellumzellen von Reiseumbrionen sowie in Reis-Gewebekulturzellen transferiert werden. Mit beiden Methoden konnten fertile, transgene Reispflanzen produziert werden. Wegen der höheren Effizienz der Genübertragung durch Partikel Beschuss, wurde diese Methode für den Transfer von 32 verschiedenen Gen-Konstrukten eingesetzt.

Um Resistenz gegen RTBV zu erzeugen, wurden die Reispflanzen dazu veranlasst, verschiedene Teile des Virus selbst zu synthetisieren. Dazu gehören das Hüllprotein, (mutierte) Teile oder die gesamte Replikase und Antisense-RNS-Moleküle, welche gegen eine wichtige Region im Virus-Transkript gerichtet sind. Um die Expression der Transgene in der Reispflanze zu lokalisieren, wurden Genkonstrukte, in welchen die Expression eines visuellen Markergens entweder vom Cauliflower Mosaik Virus 35S- oder vom RTBV Promoter gesteuert und von einer Kurzform des RTBV Introns verstärkt wird, in Reis übertragen.

Insgesamt 514 transgene Pflanzen der Japonica-Sorten Taipei 309 und Kinuhikari wurden regeneriert. Die Integration der Gen-Konstrukte ins Pflanzengenom wurde bei den meisten Pflanzen durch Southern-Analyse geprüft. Die Expression der Transgene wurde in ausgewählten Linien getestet und in einigen der getesteten Pflanzen konnte Boten-RNS oder Protein nachgewiesen werden. Insgesamt 52 der transgenen Linien wurden am Internationalen Reisforschungsinstitut (IRRI) durch Infizierung mit den natürlichen Virusüberträgern auf Resistenz getestet. Bis jetzt konnten keine resistenten Linien gefunden werden.