

Evaluation of different strategies to engineer cassava brown streak virus (potyviridae) resistance in cassava (manihot esculenta)

Doctoral Thesis

Author(s):

Cabrera Moreno, Martha Isabel

Publication date:

2013

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009764805>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

DISS. ETH No.20690

Evaluation of different strategies to engineer *Cassava Brown Streak Virus* (Potyviridae) resistance in cassava (*Manihot esculenta*).

A dissertation submitted to

ETH ZURICH

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

Martha Isabel Moreno Cabrera

Microbiologist, Catholic University, Colombia

Master on Biological Sciences, University of Valle, Colombia

08.09.1973

Citizen of Colombia

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Wilhelm Gruissem

Dr. Herve Vanderschuren

Prof. Dr. Holger Jeske

2013

Abstract

Cassava brown streak disease (CBSD) has emerged as a factor causing important losses in cassava field in eastern and central Africa. The disease is associated with two virus species *Cassava brown streak virus* (CBSV) and *Ugandan cassava brown streak virus* (UCBSV) [picorna-like (+) ssRNA viruses; genus *Ipomovirus*; family *Potyviridae*]. The virus genome encodes for ten proteins and the 3' coat protein (CP) is the most conserved sequence amongst the different viruses and isolates. Classical symptoms include feathery chlorosis of the veins, leaf chlorosis, brown streaks on the stems and corky necrosis in the roots.

In order to engineer resistance against cassava brown streak viruses a selection of RNA-based strategies were designed and evaluated in the cassava-CBSV and cassava-UCBSV pathosystems. The complete sequence of the CBSV coat protein (CP) as well as its partial 3' end sequence were used to produce T-DNA cassettes for the expression of antisense CP transcripts and double-stranded CP hairpin in transgenic plants.

The model cassava cultivar cv. 60444 was used to produce transgenic lines and test the aforementioned RNA-based strategies. Independent transgenic cassava lines were selected based on transgene copy number, transcript expression levels and small RNA analysis. The selected transgenic lines were subsequently propagated and evaluated for resistance to cassava brown streak viruses. Virus resistance assessment procedure was developed using grafting transgenic scions on wild-type cassava rootstock infected with single viral species. Molecular methods based on RT-qPCR were developed to perform reliable virus load quantification in rootstock and scion cassava plant material. Assessment of the transgenic cassava lines revealed high level of virus resistance in transgenic lines expressing hairpin CP RNAs. The resistant lines displayed high level of resistance to both CBSV and UCBSV isolates. Subsequent propagation of scions initially grafted onto virus-infected rootstock demonstrated that viral infection does not develop at latter propagation stages.

The most promising T-DNA expression cassette was subsequently used to transform a farmer-preferred landrace. A Nigerian farmer-preferred landrace named Oko-iyawo, also referred to as TME7, was selected because of its reported resistance to cassava mosaic disease (CMD). Several independent transgenic TME7 lines were generated and selected based on their hairpin-derived small RNAs load. Their resistance to both CBSV and UCBSV were confirmed by visual and molecular assessment of the transgenic scions grafted onto virus-infected rootstock. The TME7 transgenic lines generated in the present study represent a promising source of resistance to the two major viral diseases affecting the cassava production in Africa (i.e. CBSD and CMD).

Zusammenfassung

Cassava Brown streak disease (CBSD) verursacht grosse Ertragsverluste im Maniokanbau in Ost- und Zentralafrika. Die Krankheit wird durch zwei Virenarten verursacht, *Cassava brown streak virus* (CBSV) und *Ugandan cassava brown streak virus* (UCBSV) [Picornaähnliche (+) ssRNA Viren; Gattung *Ipomovirus*; Familie *Potyviridae*]. Die Symptome umfassen sich vergilbende Blattadern, die dem Blatt ein federartiges Aussehen verleihen, Blattchlorosen, braune Streifen an den Stängeln sowie verkorkte Wurzeln mit nekrotischen Flecken.

Die Genome der beiden Viren codieren für zehn Proteine. Das 3' Huellprotein (coat protein, CP) ist die konservierteste Gensequenz beider Viren und ihrer Isolate. Um Resistenz gegen Cassava brown streak disease zu entwickeln, wurden zwei transgene RNA-Strategien entwickelt und sowohl im Maniok-CBSV wie auch im Maniok-UCBSV Pathosystem getestet. Sowohl die komplette Sequenz des CBSV coat proteins (CP) sowie deren 3' Endsequenz wurden in transgenen Pflanzen für T-DNA Kassetten zur Expression von Antisense CP Transkripten sowie doppelsträngigen CP-hairpins verwendet.

Die Modellsorte cv.60444 wurde verwendet um transgene Maniok-Linien zu produzieren und damit die oben genannten RNA-basierten Strategien zu testen.

Unabhängige transgene Maniok Linien wurden aufgrund ihrer Anzahl Transgenkopien, dem Grad der Expression ihrer Transkripte sowie der Analyse der kurzen RNA Sequenzen ausgewählt. Diese transgenen Linien wurden anschliessend vermehrt und ihre Resistenz gegen Cassava brown streak Virus abgeschätzt. Dazu wurde ein Testsystem entwickelt um die Virusresistenz zuverlässig zu beurteilen. Das Testsystem bestand aus transgenen Sprossen die auf Wild-Typ Maniok Wurzelstockunterlagen gepfropft wurden, welche zuvor mit einer der beiden Virenarten infiziert worden war. Molekulare Methoden, welche auf RT-qPCR basieren, wurden entwickelt, um die Viruslast sowohl im Wurzelstock als auch im aufgepfropften Spross zu quantifizieren.

Von den transgenen Maniok Linien, welche CP RNA exprimierten, waren diejenigen Linien virusresistent, welche mit "hairpin" CP RNA transformiert worden waren. Diese Linien zeigten eine hohe Resistenz gegenüber einer Infektion mit CBSV- und UCBSV-Isolaten. Sprosse, welche weitervermehrt wurden, nachdem sie auf vireninfierte Wurzelstücke gepfropft worden waren, zeigten keine Virenbefallssymptome.

Die vielversprechendste T-DNA-Kassetten wurden anschliessend verwendet um eine bei den Landwirten bevorzugte Sorte zu transformieren. Dazu wurde eine Nigerianische Sorte, Oko-iyawo oder TME7, ausgewählt, weil sie gegen das Cassava Mosaik Virus (CMD) resistent ist. Verschiedene transgene TME7 Linien wurden erzeugt und aufgrund der Menge von kurzen "hairpin" RNA ausgewählt. Ihre Resistenz gegenüber CBSV und UCBSV wurde visuell und mittels molekularer Methoden überprüft, indem die transgenen Sprosse auf vireninfierte Unterlagen gepfropft wurden. Die transgenen TME7 Linien, welche in der vorliegenden Studie erzeugt wurden, zeigen vielversprechende Resistenzeigenschaften gegenüber den beiden wichtigen Viruserkrankungen, welche die Maniokproduktion in Afrika beeinträchtigen, der CBSD und CMD.