

Infekcyjne kopie TBRV zasocjowane z białkiem GFP narzędziem do analiz oddziaływań patogen-gospodarz

dr Aleksandra Zarzyńska-Nowak

dr Julia Minicka

dr Przemysław Wieczorek

prof. dr hab. Beata Hasiów-Jaroszewska



Konferencja Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego
„Nowoczesne spojrzenie na fitopatologię” Poznań (online), 7-8 września 2022 r.



Wstęp

- Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (TBRV) jest powszechnie występującym patogenem porażającym szeroki zakres gospodarzy (ok. 100 gatunków roślin gospodarczo-ważnych, zielnych, drzew i krzewów) [1,2].
- Powoduje nekrotyczne i chlorotyczne mozaiki na liściach oraz charakterystyczne nekrotyczne pierścionki na owocach i liściach porażonych roślin.
- Genom wirusa zbudowany jest z dwóch pojedynczych, pozytywnie sensownych nici RNA (Fig. 1) i w przypadku niektórych izolatów może być zasocjowany z defektywną cząsteczką RNA (D RNA) oraz subwirusową cząsteczką RNA (satRNA)[3].

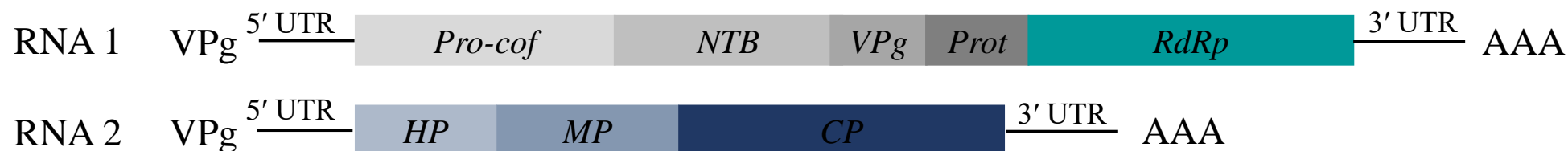


Figura 1. Schemat przedstawiający strukturę genomu TBRV. Poszczególne prostokąty reprezentują odpowiednie białka.

- **CEL PRACY:** Zrozumienie mechanizmów, które wpływają na zdolność porażania różnych gospodarzy przez ten sam gatunek wirusa i czynników biorących udział w tym procesie zarówno po stronie rośliny, jak i gospodarza stanowi jedno z podstawowych wyzwań w ochronie roślin. W związku z tym skonstruowano 11 genetycznie różnych infekcyjne kopii cDNA TBRV sprzężonych z białkiem zielonej fluorescencji (ang. green-fluorescence protein, GFP) dla trzech izolatów TBRV pochodzących z różnych gospodarzy. Spośród nich **wybrano jedną (TBRV-2A-GFP)**, która zostanie wykorzystana do badań dotyczących biologii, replikacji oraz oddziaływań z gospodarzem na poszczególnych etapach rozwoju choroby.

Konstrukcja infekcyjnej kopii cDNA TBRV-2A-GFP

- Do badań użyto wcześniej skonstruowaną dla izolatu pochodzącego z rośliny pomidora (TBRV-P1) infekcyjną kopię cDNA umożliwiającą dowolną manipulację genomem wirusa [4]. Za pomocą metody In-Fusion (TakaraBio) na 3' końcu RNA2 wprowadzono otwartą ramkę odczytu kodującą białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescence protein, GFP), poprzedzoną genem kodującym białko 2A (Fig. 2).



Figura 2. Schemat przedstawiający strukturę konstruktów TBRV-2A-GFP.

- Następnie, otrzymane konstrukty TBRV-2A-GFP wprowadzono do bakterii *Agrobacterium tumefaciens* i agroinokulowano rośliny ogórka i tytoniu. Obecność insercji genu oraz powstawanie białka GFP potwierdzono za pomocą metody RT-PCR i Western blot (Fig. 3).

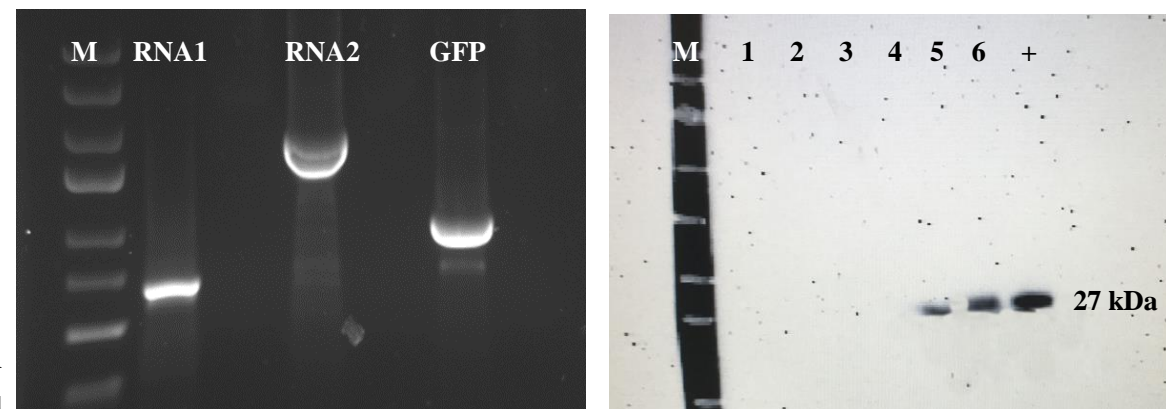


Figura 3. Potwierdzenie obecności RNA wirusa oraz insertu *gfp* w agroinokulowanych liściach. A. Rozdział elektroforetyczny produktów RNA1, RNA2 i GFP na 1% żelu agarozowym. M-Gene Ruler 1Kb Plus Ladder (ThermoFisher Scientific).

B. Analiza Western blot z agroinokulowanych roślin ogórka (1, 3, 5) i re-inokulowanych roślin tytoniu (2,4,6) różnymi konstrukcjami TBRV-GFP. 5 i 6 konstrukty TBRV-2A-GFP, + kontrola pozytywna GFP, M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific).

Wyniki

- Objawy typowe dla porażenia TBRV, na apikalnych liściach agroinokulowanych roślin ogórka obserwowano po ok. 21 dniach. Re-inokulowane rośliny testowe tytoniu, komosy i ogórka chorowały po ok. 7 dniach od inokulacji (Fig. 4A). Ekspresję genu *gfp* obserwowano w świetle UV (Fig. 4B), świetlnego mikroskopu fluorescencyjnego (Fig. 4C, 4D) oraz mikroskopu konfokalnego (Fig. 4E).

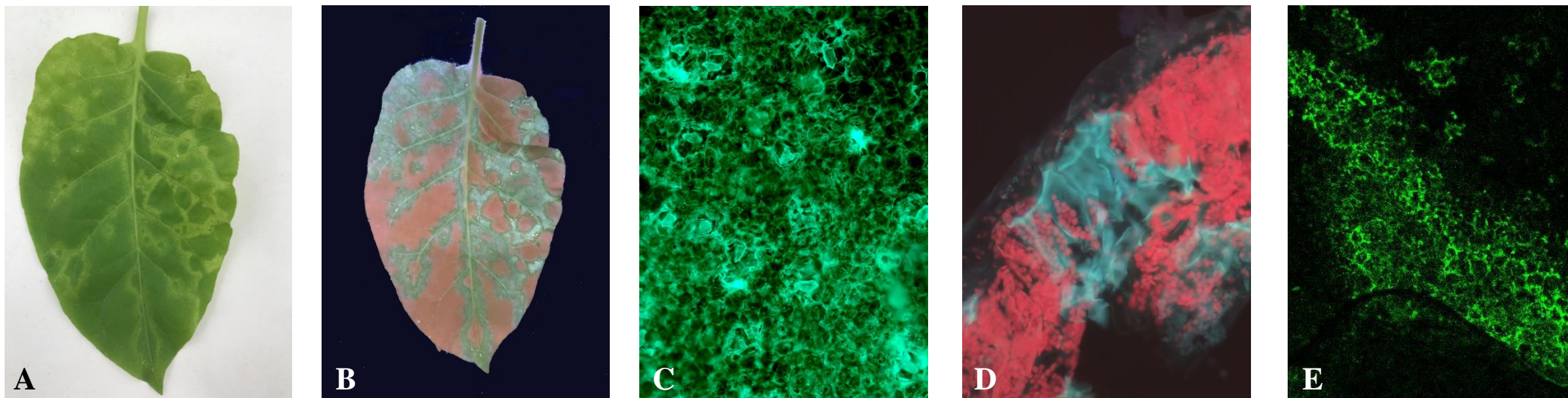


Figura 4. Objawy oraz ekspresja genu *gfp* obserwowane na liściach re-inokulowanej rośliny tytoniu konstruktem TBRV-2A-GFP. A – pierścieniowa mozaika charakterystyczna dla porażenia TBRV. B – ekspresja genu *gfp* obserwowana w świetle lampy UV. C – ekspresja genu *gfp* obserwowana za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego. D – ekspresja genu *gfp* obserwowana za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego po utrwaleniu liści w formaldehydzie i glutaraldehydzie oraz krojeniu za pomocą wibratomu. E – ekspresja genu *gfp* obserwowana za pomocą mikroskopu konfokalnego.

Podsumowanie

- Uzyskany konstrukt TBRV-2A-GFP stanowi zoptymalizowane narzędzie do przeprowadzenia przyszłych badań oddziaływań pomiędzy patogenem a gospodarzem z wykorzystaniem ukierunkowanej mutagenezy, obserwacji wpływu pojedynczych mutacji na replikację, przebiegu infekcji na poziomie komórkowym czy badań ekspresji poszczególnych genów.
- Otrzymane wyniki pozwolą na opracowanie odpowiednich strategii prowadzących do ograniczania strat plonów powodowanych przez TBRV jak również inne gatunki wirusów z rodzaju nepovirus.



Badania finansowane były z projektu NCN Preludium 2016/23/N/NZ9/02160

Literatura:

- [1] EPPO Global Database, Tomato black ring virus (TBRV00). Available at: <https://gd.eppo.int/taxon/TBRV00/distribution> [Accessed 2022-08-30]
- [2] CABI Datasheet. Tomato black ring virus. Available at: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/54060> [Accessed 2022-08-30]
- [3] Digiaro MD, Yahyaoui E, Martelli T, Elbeaino T. 2015. The sequencing of the complete genome of Tomato black ring virus (TBRV) and of the RNA2 of three Grapevine chrome mosaic virus (GCMV) isolates from grapevine reveals the possible recombinant origin of GCMV." *Virus Genes* 50.1 (2015): 165-171
- [4] Zarzyńska-Nowak A, Ferriol I, Falk BW, Borodynko-Filas N, Hasiów-Jaroszewska B. 2017. Construction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Tomato black ring virus infectious cDNA clones. *Virus Research* 230: 59-62