

# Pochodzenie i struktura defektywnych cząsteczek RNA wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (TBRV)

**Daria Budzyńska, Julia Minicka, Agnieszka Taberska, Beata Hasiów-Jaroszewska**

Zakład Wirusologii i Bakteriologii, Instytut Ochrony Roślin – PIB w Poznaniu

[D.Budzynska@iorpib.poznan.pl](mailto:D.Budzynska@iorpib.poznan.pl)



7-8.09.2022

# WSTĘP

## Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora

- Tomato black ring virus, TBRV
- Rodzina Secoviridae, rodzaj *Nepovirus*
- Szeroki zakres gospodarzy: rośliny gospodarczo ważne, ozdobne, krzewy i drzewa
- Genom +ssRNA / subgenomowe sateliarne RNA (satRNA), defektywne RNA (D RNA)

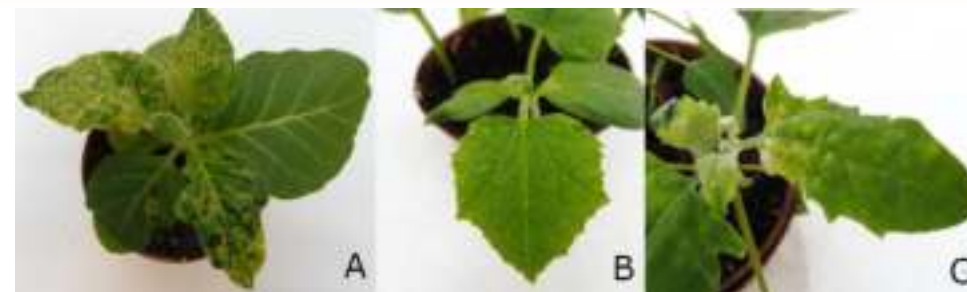


Figura 1. Rośliny A. tytoniu B. ogórka C. komosy ryżowej porażone TBRV.

## D RNA TBRV

- Długość 335-570 nt
- Powstają *de novo* podczas pasażowania wirusa w jednym gospodarzu
- Pochodzą zarówno z RNA1, jak i RNA2 TBRV
- Wpływają na akumulację HV, symptomy infekcji na porażonych wirusem roślinach oraz stopień przenoszenia TBRV z nasionami różnych gatunków roślin (Hasiów-Jaroszewska i wsp., 2018, Pospieszny i wsp., 2020)

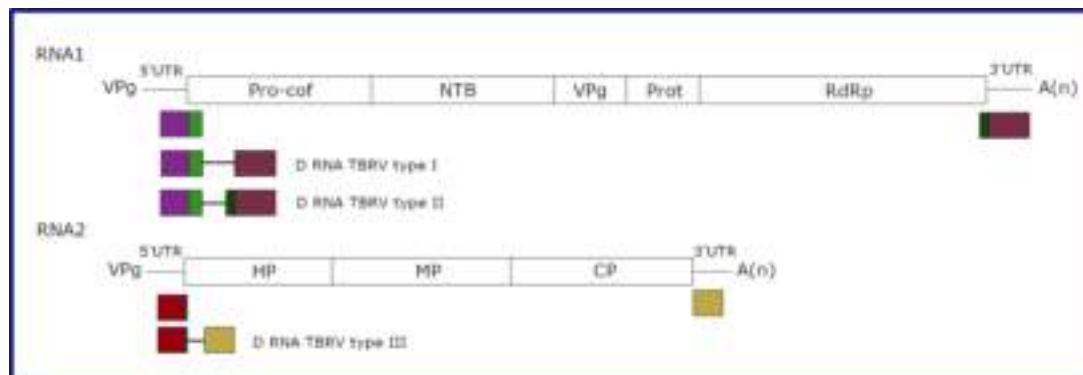


Figura 2. Struktura D RNA związanych z TBRV; Pro-cof (ang. protease cofactor), NTB (ang. nucleotide binding protein), VPg (ang. viral genome-linked protein), Prot (ang. protease), RdRp (ang. RNA dependent RNA polymerase), HP (ang. homing protein), MP (ang. movement protein), CP (ang. coat protein).

Figura 3. Przykładowe miejsca rekombinacji w genomie TBRV, które mogą mieć wpływ na powstawanie D RNA; Hasiów-Jaroszewska i wsp., 2018.

# Cel i metody

## Cel: Analiza wpływu temperatury na powstawanie D RNA

### Metody – doświadczenie nr 1

- Doświadczenie prowadzono w dwóch temperaturach: 18°C i 26°C
- Pasażowanie izolatów TBRV pochodzących z sałaty (TBRV-S1), pomidora (TBRV-P1) i robinii akacjowej (TBRV-M1) 15 razy w komosie ryżowej, tytoniu, ogórku i pomidorze
- Otrzymanie w gradiencie sacharozy preparatów oczyszczonych wirusa, izolacja RNA i analiza pod względem obecności addytywnych RNA; w przypadku obecności D RNA – amplifikacja cząsteczek

## Cel: Analiza wpływu zmiany gospodarza na powstawanie D RNA

### Metody – doświadczenie nr 2

- Pasażowanie izolatu TBRV pochodzącego z pomidora w trzech liniach ewolucyjnych zgodnie ze schematem: tytoń (5 pasaży) / komosa (5 pasaży) / tytoń (5 pasaży) / komosa (5 pasaży)
- Równoczesne pasażowanie izolatu 20 razy z uwzględnieniem losowości doboru gospodarza (każda z linii ewolucyjnych składała się z innego, zmieniającego się zestawu roślin testowych)
- Otrzymanie w gradiencie sacharozy preparatów oczyszczonych wirusa, izolacja RNA i analiza pod względem obecności addytywnych RNA

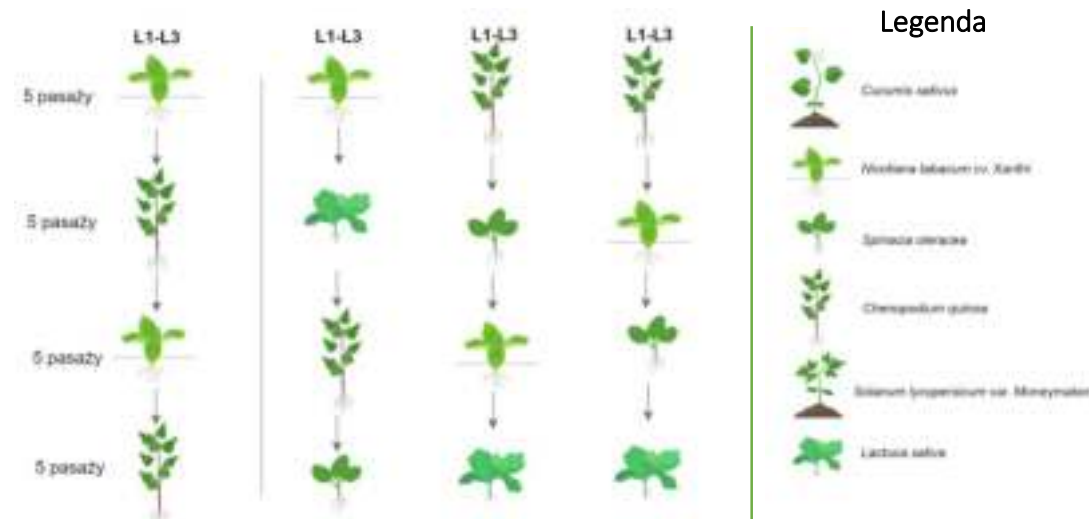


Figura 4. Schemat doświadczenia nr 2 wraz z legendą; L1-L3 – linie ewolucyjne.

# Wyniki

## Pasażowanie izolatów TBRV w różnych gospodarzach i warunkach temperaturowych

- Porównanie profili RNA izolatów TBRV-P1, TBRV-M1 i TBRV-S1 (MG458220.1, MN699700.1, MN699701.1) przed pasażowaniem z profilami RNA izolatów TBRV po pasażowaniu wykazało obecność dodatkowych RNA o długości około 500 nt w przypadku niektórych linii ewolucyjnych (Figura 5)

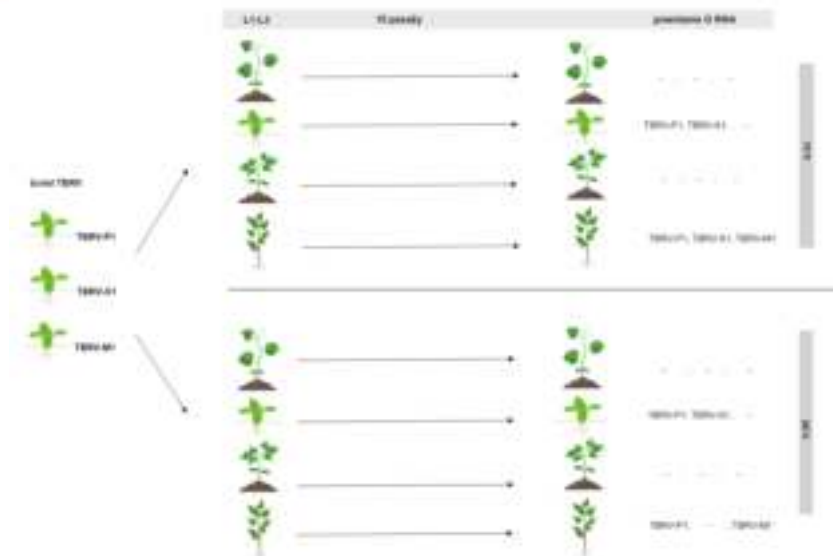


Figura 5. Schematyczne przedstawienie wyników doświadczenia polegającego na pasażowaniu izolatów TBRV w różnych gospodarzach i różnych warunkach temperaturowych. W przypadku powstania D RNA informację dodano na schemacie.

## Struktura powstałych D RNA

- W wyniku wstępnych analiz otrzymano częściowe sekwencje nukleotydów siedmiu D RNA powstałych w trakcie doświadczenia (Figura 6)
- Nowopowstałe D RNA należą do typu II D RNA TBRV i powstały z RNA1 TBRV
- Podobieństwo sekwencji nukleotydów powstałych D RNA oraz sekwencji nukleotydów innych D RNA TBRV typu II, których sekwencje zdeponowano w banku genów (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) wynosi od 90,1% do 99,7%
- Analiza końca 5' uzyskanych sekwencji pozwala stwierdzić, że w tym fragmencie występują istotne różnice między D RNA izolatów TBRV-P1 i TBRV-S1, które ewoluowały w 18°C i 26°C (Figura 7)

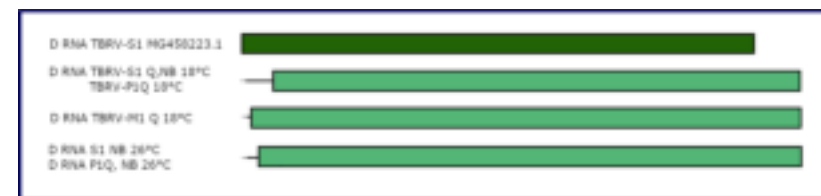
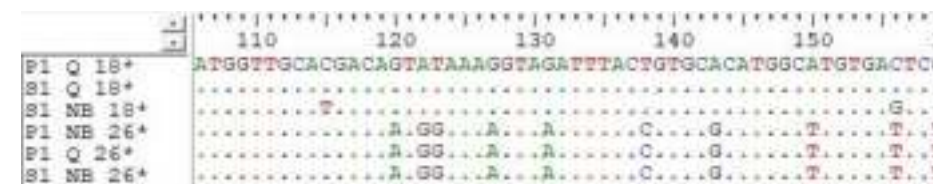


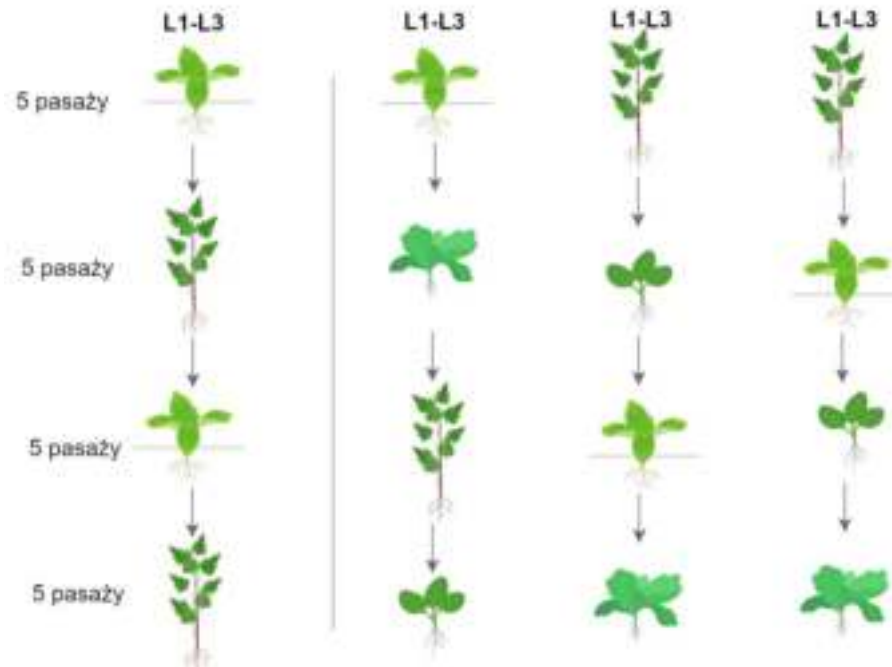
Figura 6. Schematyczne przedstawienie sekwencji D RNA TBRV uzyskanych w doświadczeniu. Otrzymane sekwencje D RNA porównano z sekwencją D RNA TBRV-S1 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Linie przedstawiają możliwe brakujące fragmenty sekwencji D RNA powstałych w doświadczeniu.

Figura 7. Różnice występujące na końcu 5' fragmentów D RNA uzyskanych w tym doświadczeniu w przypadku izolatów, które były pasażowane w 18°C i 26°C; Q – komosa ryżowa, NB – tytoń.



# Wyniki

## Wpływ zmiany gospodarza na powstawanie D RNA



W celu dokładniejszej analizy zmian w genomie izolatu TBRV-P1 powstałych w trakcie pasażowania, każdą linię ewolucyjną poddano sekwencjonowaniu NGS.



Literatura:

1. Hasiów-Jaroszewska B, Minicka J, Zarzyńska-Nowak A, Budzyńska D, Elena SF. 2018. *Virus Research* 250: 87–94.
2. Budzyńska D, Minicka J, Hasiów-Jaroszewska B, Elena SF. 2020. *Plant Pathology* 69: 1767–1776.
3. Pospieszny H, Hasiów-Jaroszewska B, Borodynko-Filas N, Elena SF. 2020. *Plant Protection Science* 56: 261–267.

**Doświadczenia finansowane z projektów Narodowego Centrum Nauki: 2017/25/B/NZ9/01715 i 2018/31/N/NZ9/02985.**

**Dziękuję za uwagę!**