

Wykorzystanie nowoczesnych metod biologii molekularnej do określenia patogeniczności torradowirusów

Przemysław Wieczorek, Marta Budziszewska, Barbara Wrzesińska, Arnika Przybylska, Patryk Frąckowiak, Aleksandra Obrępańska-Stęplowska

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biologii Molekularnej i Biotechnologii, ul. W. Węgorzka 20, 60-318 Poznań

e-mail: p.wieczorek@iorpib.poznan.pl

Torradowirusy (rodzaj *Torradovirus*, rodzina *Secoviridae*) to grupa patogenów, które porażają rośliny z rodziny *Apiaceae*, *Astraceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Lamiaceae*, *Fabaceae*. Z uwagi na szeroki zakres gospodarzy oraz na identyfikowane nowe przypadki porażenia wywoływanych przez tę grupę wirusów, istotne jest prowadzenie badań nad zmiennością genetyczną oraz ustaleniem ich determinant patogeniczności. Typowymi przedstawicielami rodzaju są przenoszone przez mączliki: wirus nekrozy pomidora – *Tomato torrado virus*, ToTV, oraz *Tomato marchitez virus* (ToMarV), które porażają *Solanum lycopersicum* L. (*Solanaceae*). Określając zmienność genetyczną ToTV oraz innych torradowirusów opracowano czułe testy diagnostyczne, które wykorzystano do identyfikacji tych patogenów w roślinach. Istotnym osiągnięciem w badaniach biologii molekularnej torradowirusów było skonstruowanie klonów infekcyjnych ToTV oraz ToMarV. W tym zakresie kopie RNA1 oraz RNA2 tych wirusów umieszczano pod kontrolą promotora 35S CaMV w ekspresyjnym wektorze binarnym pJL89. Procedurę tworzenia plazmidów rekombinowanych wykonano w oparciu o klonowanie metodą Gibsona (*Gibson Assembly*) [1]. Co więcej, istotnym osiągnięciem w zakresie badań patogeniczności torradowirusów było skonstruowanie wariantu RNA2 ToTV z wprowadzoną sekwencją genu kodującego białko zielonej fluorescencji – GFP. Uzyskany wirus rekombinowany, ToTV-GFP, wykorzystano do przyżyciowego monitorowania przebiegu procesu infekcji w roślinie [2]. Wykorzystując infekcyjny klon ToTV określono m.in. zaangażowanie białka 3A wirusa w różnicowym porażeniu pomidora i tytoniu (*Nicotiana benthamiana*) [3].

Przeprowadzone doświadczenia poszerzyły zakres metod badawczych oraz wiedzę z obszaru mechanizmów molekularnych determinujących chorobotwórczość torradowirusów.

Prace prowadzono w ramach projektu NCN nr 2016/21/D/NZ9/02478

Literatura

1. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6(5): 343-5.
2. Wieczorek P, Budziszewska M, Frąckowiak P, Obrępańska-Stęplowska A (2020) Development of a new tomato torrado virus-based vector tagged with GFP for monitoring virus movement in plants. *Viruses* 12(10): 1195.
3. Wieczorek P, Obrępańska-Stęplowska A (2016) A single amino acid substitution in movement protein of tomato torrado virus influences ToTV infectivity in *Solanum lycopersicum*. *Virus Res* 213: 32-36.

Utilizing molecular biology techniques to identify the pathogenicity of torradoviruses

Przemysław Wieczorek, Marta Budziszewska, Barbara Wrzesińska, Arnika Przybylska, Patryk Frąckowiak, Aleksandra Obrępańska-Stęplowska

Institute of Plant Protection – National Research Institute, Department of Molecular Biology and Biotechnology, W. Wegorka 20, 60-318 Poznań

e-mail: p.wieczorek@iorpib.poznan.pl

Torradoviruses (genus *Torradovirus*, family *Secoviridae*) are a group of pathogens that infect plants of the Apiaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, and Fabaceae families. Due to the wide range of hosts and the identification of new cases of infections caused by this group of viruses, it is important to conduct research focusing on their genetic variability and to establish their pathogenicity determinants. Typical members of the genus are the tomato torrado virus (ToTV) and tomato marchitez virus (ToMarV) transmitted by whiteflies, which infects *Solanum lycopersicum* L. (*Solanaceae*). By determining the genetic variability of ToTV, and other torradoviruses, it was possible to develop sensitive diagnostic protocols to identify these pathogens in plants. The construction of ToTV and ToMarV infectious clones was an important achievement in the study of the molecular biology of torradoviruses. In this regard, RNA1 and RNA2 copies of these viruses were placed under the control of the CaMV 35S promoter in the expression binary vector pJL89. The procedure for creating recombinant plasmids was performed based on the Gibson assembly method [1]. Moreover, the construction of the RNA2 ToTV variant with the introduced sequence of the gene encoding the green fluorescence protein – GFP was a significant achievement in the field of research on the pathogenicity of torradoviruses. The obtained recombinant virus, ToTV-GFP, was used to monitor the infection process in the infected plant [2]. Using the ToTV infectious clone, it was possible to analyze the involvement of the virus 3A protein in the process of infection of tomato and tobacco (*Nicotiana benthamiana*) [3].

The conducted experiments improved the research methods and the knowledge in the field of molecular mechanisms determining the pathogenicity of torradoviruses.

The work was supported by grant from National Research Centre no 2016/21/D/NZ9/02478

References

1. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA 3rd, Smith HO (2009) Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6(5): 343-5.
2. Wieczorek P, Budziszewska M, Frąckowiak P, Obrępańska-Stęplowska A (2020) Development of a new tomato torrado virus-based vector tagged with GFP for monitoring virus movement in plants. *Viruses* 12(10): 1195.
3. Wieczorek P, Obrępańska-Stęplowska A (2016) A single amino acid substitution in movement protein of tomato torrado virus influences ToTV infectivity in *Solanum lycopersicum*. *Virus Res* 213: 32-36.