

Streszczenie

Wirus nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV) jest groźnym patogenem należącym do rodzaju *Torradovirus* w rodzinie *Secoviridae* porażającym rośliny z rodziny *Solanaceae*, głównie *Solanum lycopersicum* L. Tematyka badań podjętych w ramach pracy doktorskiej skupia się na analizie właściwości biologicznych, a przede wszystkim na charakterystyce genetycznej ToTV.

Na podstawie doświadczeń szklarniowych wskazano zakres roślin żywicielskich, do których należą m.in. pomidor, psianka podłużna i ziemniak. Określono typowe objawy choroby powodowanej ToTV, takie jak zahamowanie wzrostu rośliny, deformacje liści, nekrozy blaszek liściowych obejmujące w następstwie całą roślinę, prowadząc do jej obumierania.

Poznano i scharakteryzowano pełne genomy izolatów ToTV występujących w Polsce: Wal'03, Kra i Ros. Przeprowadzono analizy porównawcze znanych sekwencji RNA ToTV, nici genomowych, regionów kodujących i niekodujących, wskazując na bardzo wysoki poziom identyczności sekwencji RNA (97-100%) wewnątrz gatunku ToTV i niższy pomiędzy gatunkami rodzaju *Torradovirus*. Największe zróżnicowanie genetyczne obserwowano pomiędzy ToTV a wirusem *Lettuce necrotic leaf curl virus* (LNLCV) oraz niedawno zidentyfikowanym potencjalnym przedstawicielem torradowirusów - Motherwort yellow mottle virus (MyMoV). W kolejnym etapie badań podjęto analizy filogenetyczne. Na podstawie uzyskanych dendrogramów rodzaj *Torradovirus* został podzielony na trzy kłady. Pierwszy grupuje izolaty wirusa ToTV, drugi, najbardziej pokrewny filogenetycznie stanowią *Tomato marchitez virus* (ToMarV), *Tomato chocolate virus* (ToChV), *Tomato chocolate spot virus* (ToChSV), zaś najbardziej odległą grupę reprezentują LNLCV i MyMoV.

Obserwacje symptomów chorobowych na pomidorze (a później na ziemniaku) wywołanych zakażeniem izolatami Wal'03 oraz Kra wskazywały na różnice w ich wirulencji, stąd podjęto badania nad określeniem poziomu akumulacji RNA izolatów ToTV u roślin pomidora i tytoniu. Wykazano znacznie wyższy poziom akumulacji

RNA izolatu Kra niż RNA izolatu Wal'03 w komórkach obu gospodarzy, co może być determinowane różnicami w genomie pomiędzy izolatami, w tym, w regionie niekodującym 3'-UTR.

Największe zróżnicowanie sekwencji RNA pomiędzy izolatami ToTV, jak również w puli RNA należących do pojedynczych izolatów stwierdzono w regionie 3'-UTR RNA1, w którym odnotowano obecność charakterystycznych delecji (od kilku do stu kilkudziesięciu nukleotydów). W celu monitorowania zmienności w 3'-UTR ToTV opracowano protokół reakcji HRM real-time PCR. Przebieg uzyskanych krzywych dysocjacji i profil punktów topnienia potwierdza znaczną heterogenność badanego regionu wewnątrz analizowanych izolatów. Tego typu zjawisko opisano po raz pierwszy dla wirusów roślinnych. W obrębie 3'-UTR RNA1 wykazano istnienie minimum pięciu wariantów genetycznych dla izolatu Kra, oraz trzech wariantów i dwóch subwariantów dla izolatu Ros. Stwierdzono też charakterystyczną dla ToTV organizację regionu 3'-UTR, wskazując na obecność powtórzeń (duplikacji) fragmentów sekwencji tzw. *direct repeats*. Taka heterogenność regionu UTR u wirusa ToTV może mieć wpływ na przebieg patogenezы, dla replikacji wirusa w komórkach gospodarza, jak również jego transmisji (jak np. u alfawirusów) przez wektory.

Wykorzystując drożdżowy system dwuhybrydowy podjęto także badania nad analizą oddziaływań białko-białko na poziomie wirusa, nie wykazując jednak istnienia bezpośrednich interakcji między jego białkami. Dodatkowo, opracowano metodę uzyskania podjednostek białka płaszcza wirusa ToTV w systemie prokariotycznym, co może znaleźć zastosowanie w jego diagnostyce oraz stanowić podstawę badań krystalograficznych.

Prace prowadzone nad charakterystyką ToTV mające na celu poznanie biologii wirusa jego genomu, poznawania mechanizmów infekcji są istotne z punktu widzenia diagnostyki wirusa, metod ograniczania i zwalczania tego patogenu w uprawach pomidora i innych gospodarczo ważnych gatunków roślin.

16.06.2015

M. Budziszewski