

Mgr inż. Barbara Wrzesińska-Krupa

„Molekularne mechanizmy odpowiedzi *Nicotiana benthamiana* na infekcję wirusem karłowatości orzecha ziemnego (Peanut stunt virus, PSV)”

STRESZCZENIE

Wirus karłowatości orzecha ziemnego (ang. *peanut stunt virus*, PSV) jest wirusem należącym do rodzaju *Cucumovirus* (rodzina *Bromoviridae*). Do jego gospodarzy należą rośliny z co najmniej czterech rodzin, w tym do bobowatych, oraz rośliny modelowe, takie jak *Nicotiana benthamiana* czy *N. tabacum*. Jego genom składa się z trzech jednoniciowych cząsteczek RNA o dodatniej polarności [ss(+)RNA] oraz dwóch subgenomowych. Dodatkowo, z niektórymi szczepami PSV mogą być zasocjowane cząsteczki satelitarnego RNA (satRNA). SatRNA towarzyszące wirusom z rodzaju *Cucumovirus* to długie niekodujące cząsteczki RNA, które wpływają na przebieg patogenezы indukowanej wirusem pomocniczym, akumulację wirusa pomocniczego i objawy infekcji. Wiele prac opisuje mechanizmy oddziaływań wirusa mozaiki ogórka (ang. *cucumber mosaic virus*, CMV), innego wirusa należącego do rodzaju *Cucumovirus*, z jego satRNA. Jednak niewiele z tych badań przedstawia globalne zmiany na różnych poziomach ekspresji genów w roślinach-gospodarzach, a także wpływ tych zmian na oddziaływanie roślinnych gospodarzy z wektorami wirusów, szczególnie w przypadku PSV.

Hipotezy rozprawy doktorskiej zakładają, że podczas infekcji PSV w roślinach *N. benthamiana* dochodzi do wielu zmian w poziomach transkryptów, małych RNA (ang. *small RNA*, sRNA), białek, oraz w poziomach fosforylacji tych białek. W konsekwencji zaburzeniom ulegają procesy związane z metabolizmem podstawowym, sygnalizacją komórkową oraz odpowiedziami obronnymi komórek roślinnych. W związku z tym, że wirus angażuje maszynę komórkową w swój cykl replikacyjny oraz obronę przeciwwirusową komórek roślinnych, zmiany te dotyczą także licznych kompartmentów komórkowych. Natomiast obecność satRNA podczas infekcji PSV, która skutkuje zmianą poziomu replikacji wirusa pomocniczego, wiąże się z dodatkowymi modyfikacjami w poziomach transkryptów, sRNA, białek oraz poziomach fosforylacji białek. W konsekwencji dochodzi do perturbacji w poziomach akumulacji czynników związanych z kompartmentami komórkowymi oraz procesami zachodzącymi w komórkach roślinnych. Założono także, że zmiany spowodowane obecnością satRNA wpływają na metabolizm rośliny

sprawiając, że może zmienić się atrakcyjność sensoryczna porażonych roślin dla wektorów wirusów. W efekcie, obecność satRNA w koinfekcji wirusowej wpłynie na rozprzestrzenianie się wirusa w środowisku.

Celem pracy było przeprowadzenie analizy porównawczej danych uzyskanych w analizach proteomu, fosfoproteomu, sRNAomu i transkryptomu między roślinami *N. benthamiana* zdrowymi, zainfekowanymi PSV-P oraz PSV-P i satRNA. Następnie na podstawie uzyskanych wyników, kolejnym celem było wskazanie kompartmentów komórkowych oraz procesów z nimi związanych, na których funkcjonowanie wpływa infekcja PSV-P oraz koinfekcja PSV-P i satRNA. Celem było również wyjaśnienie czy infekcja PSV, a także obecność satRNA, może powodować zmiany w zachowaniu orientacyjnym i żywieniowym wektora PSV – mszycy brzoskwiowej (*Myzus persicae*). Założono, że w zależności od zaostrzenia albo złagodzenia objawów w wyniku koinfekcji PSV i satRNA owady mogą zostać zniechęcone lub zachęcane do żerowania na zakażonych roślinach, co z kolei może warunkować rozprzestrzenianie się wirusa w środowisku i utrwalanie obecności satRNA razem z niektórymi szczepami wirusa pomocniczego.

Materiałem badawczym użytym do analiz były rośliny *N. benthamiana* zainfekowane PSV, PSV i satRNA oraz rośliny zdrowych. W początkowym etapie badań dokonano syntezy infekcyjnych kopii PSV-P, PSV-G oraz satRNA w celu wykorzystania ich jako wydajnego narzędzia do dostarczania wirusów do roślin. Następnie przeprowadzono globalne, analizy: transkryptomu, fosfoproteomu, sRNAomu, których wyniki wykazały, że infekcja roślin *N. benthamiana* samym wirusem (PSV-P) prowadzi do większych zmian w liczbie białek oraz transkryptów ulegających perturbacjom w poziomach ich akumulacji, czy ekspresji niż w roślinach zainfekowanych PSV-P i satRNA. Infekcja samym wirusem spowodowała zmiany w akumulacji białek i transkryptów związanych z metabolizmem podstawowym (m.in. fotosyntezą) oraz z ekspresją genów (translacją oraz transkrypcją). Co więcej, infekcja PSV-P prowadziła do znacznego obniżenia poziomów białek i transkryptów związanych z fosforylacją i transdukcją sygnału w stosunku do danych uzyskanych ze zdrowych roślin, o czym świadczyło znaczące obniżenie poziomu fosforylacji białek. Następnie, liczne transkrypty zawierające sekwencje kodujące kinazy zostały wskazane jako transkrypty docelowe dla sRNA specyficznych dla sekwencji nici genomowych PSV-P. Natomiast obecność satRNA podczas infekcji PSV-P poza zmianami w metabolizmie podstawowym obejmującymi fotosyntezę, translację oraz metabolizm RNA, przyczyniała się do wzrostu poziomu fosforylacji białek (w porównaniu z infekcją samym

wirusem). Analiza miRNA o obniżonym poziomie w roślinach zainfekowanych PSV-P i satRNA wykazała, że sekwencje docelowe dla tych miRNA stanowią transkrypty związane z odpowiedziami obronnymi i regulacją aktywności kinaz. Dodatkowo, obecność satRNA w koinfekcji z wirusem pomocniczym wiązała się z perturbacjami w regulacji szlaków kwasu jasmonowego i kwasu salicylowego, a także stresu oksydacyjnego. Zakażenie wirusem PSV-P przyczyniło się do zmian w liczebności transkryptów i białek związanych z różnymi przedziałami komórkowymi, w tym rybosomami, chloroplastami, mitochondriami, jądrem komórkowym i cytozolem. Z kolei analiza zachowań orientacyjnych i preferencji żywieniowych mszycy brzoskwiowej względem roślin *N. benthamiana* zainfekowanych PSV-G lub PSV-P, z lub bez satRNA, wykazała, że owady preferowały rośliny porażone szczepami wirusa, w wariantach, w których objawy infekcji były łagodniejsze: PSV-G bez satRNA i PSV-P z satRNA. Obserwacje te wskazują, że istnieje większe prawdopodobieństwo pobrania cząstek wirusowych w trakcie żerowania na roślinach zainfekowanych PSV-G lub PSV-P z satRNA i przeniesieniu ich na zdrowe rośliny. Wyniki te mogą także tłumaczyć występowanie tych szczepów PSV, odpowiednio bez lub z satRNA, w środowisku naturalnym i zarazem potwierdzają hipotezę dotyczącą funkcji satRNA jako bufora na styku interakcji wirusa pomocniczego i rośliny żywicielskiej. Wykazano również, że infekcja roślin wirusem prowadziła do spadku aktywności żywieniowej mszyc na porażonych roślinach i skrócenia poszczególnych modeli żerowania. Zachowanie takie może powodować, że owady zniechęcone do przedłużonego żerowania na zainfekowanych roślinach przeniosą się szybciej na kolejne rośliny, doprowadzając tym samym do szybszej transmisji wirusa i jego przetrwania w ekosystemie. Obecność satRNA dodatkowo potęgowała ten efekt, szczególnie w przypadku szczepu PSV-P.

Rezultaty uzyskane podczas pracy mogą również przysłużyć się opracowaniu działań mających na celu ograniczenie strat w produkcji roślinnej powodowanych przez wirusy należące do rodzaju *Cucumovirus*.

Poznań, 21.11.2024

Barbara Wniewińska-Kurpa