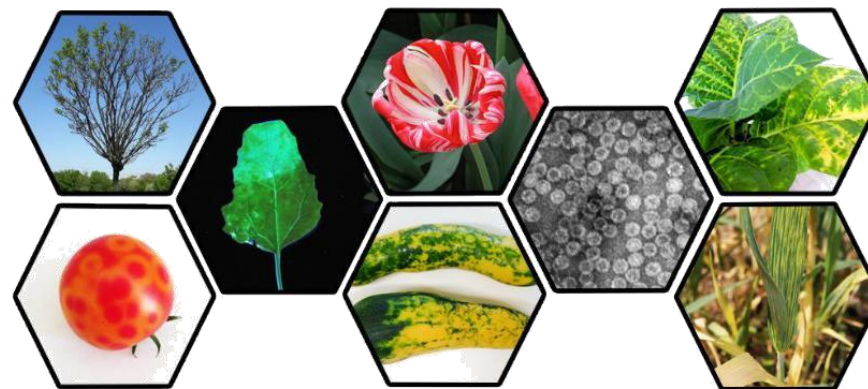


XVIII Sympozjum Sekcji Wirusologicznej Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego



MATERIAŁY KONFERENCYJNE



04.09.2019

**Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy
ul. Węgorzka 20 60-318 Poznań**

**XVIII Sympozjum Sekcji Wirusologicznej
Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego**

MATERIAŁY KONFERENCYJNE
Poznań, 04.09.2019

Komitet Organizacyjny:

Prof. dr hab. Marek Szyndel

Dr hab. Natasza Borodynko-Filas, prof. IOR-PIB

Dr Julia Minicka

PROGRAM SPOTKANIA:

10:00-10:15	Powitanie		
10:15-10:30	Biologia i diagnostyka wirusa Y ziemniaka Krzysztof Treder		
10:30-10:45	Wewnątrzgatunkowe interakcje między izolatami wirusa Y ziemniaka (<i>Potato virus Y</i> , PVY) i wirusa M ziemniaka (<i>Potato virus M</i> , PVM) w infekcjach mieszanych. Anna Grupa-Urbańska		
10:45-11:00	Dynamika zmian apoplastu w efekcie interakcji zgodnej i niezgodnej PVY ^{NTN} - <i>Solanum tuberosum</i> Katarzyna Otulak-Kozieł, Edmund Kozieł		
11:00-11:15	Analiza ultrastrukturalna transportu międzykomórkowego i patogenezы wirusa karłowatości śliwy <i>Prunus dwarf virus</i> (PDV). Edmund Kozieł, Katarzyna Otulak-Kozieł		
11:15-11:30	Wykrywanie i identyfikacja nepowirusów w roślinach z rodzaju <i>Rubus</i> Elżbieta Dąbrowska, Elżbieta Paduch-Cichal		
11:30-11:45	Wirusy i wiroidy roślin w badaniach prowadzonych w Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach Grażyna Korbecka-Glinka, Urszula Skomra, Teresa Doroszevska		
11:45-12:00	Pierwsze wykrycie sprawcy mozaiki borówki wysokiej (<i>Blueberry mosaic associated virus</i> , BIMA ^V) w Polsce Cieślińska Mirosława		
12:00-12:15	Pierwsze wykrycie kwarantannowego patogena ‘ <i>Candidatus phytoplasma ulmi</i> ’ zagrażającego wiązom w Polsce Cieślińska Mirosława, Klaudia Krajcziczek, Anna Pałka		
12:15-12:45	dyskusja i przerwa kawowa		
12:45-13:00	Polimorfizmy operonu 16S rDNA w genomach fitoplazm ‘ <i>Candidatus Phytoplasma asteris</i> ’ podgrupy 16SrI-B infekujących rośliny uprawne w Polsce Agnieszka Zwolińska, Henryk Pospieszny, Natasza Borodynko-		
		13:00-13:15	Filas Wykrywanie i charakterystyka molekularna nowych linii genetycznych fitoplazm podgrupy 16Sr V-C infekujących olchę czarną (<i>Alnus glutinosa</i> L. Gaertn.) i bylicę (<i>Artemisia vulgaris</i> L.) w Polsce Agnieszka Zwolińska
		13:15-13:30	Charakterystyka oddziaływań wirus-gospodarz na przykładzie patogeniczności wirusa nekrozy pomidora na <i>Solanum lycopersicum</i> Przemysław Wieczorek, Marta Budziszewska, Barbara Wrześcińska, Arnika Przybylska, Patryk Frąckowiak, Aleksandra Obrępałska-Stepłowska
		13:30-13:45	Wpływ infekcji wirusem karłowatości orzecha ziemnego (PSV) na regulację ekspresji genów <i>Nicotiana benthamiana</i> powiązanych z procesem fosforylacji Barbara Wrześcińska, Agnieszka Zmienko, Lam Dai Vu, Ive De Smet, Aleksandra Obrępałska-Stepłowska
		13:45-14:00	Metoda sekwencjonowania nowej generacji narzędziem do identyfikacji wirusów roślin Aleksandra Zarzyńska-Nowak, Beata Hasiów-Jaroszewska, Daria Budzyńska, Denis Kutjak
		14:00-14:15	Analiza zmienności genetycznej polskich izolatów wirusa mozaiki kupkówki (<i>Brome mosaic virus</i> , BMV) Katarzyna Trzmiel
		14:15-14:30	Charakterystyka molekularna i dynamika ewolucyjna wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (<i>Tomato black ring virus</i> , TBRV) Daria Budzyńska, Beata Hasiów-Jaroszewska, Santiago F. Elena
		14:30-14:45	Propozycje polskich nazw gatunków wirusów roślin i wiroidów uznanych przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV) Marek S. Szyndel, Selim Kryczyński
		14:45	Zakończenie i podsumowanie

BIOLOGIA I DIAGNOSTYKA WIRUSA Y ZIEMNIAKA

Krzysztof Treder

*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB, Oddział w Boninie,
Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii, Bonin 3, 76-015 Manowo*

Wirus Y ziemniaka (ang. *Potato virus Y*, PVY) jest typowym przedstawicielem rodzaju *Potyvirus*, należącego do rodziny *Potyviriidae*. Wirus przenoszony jest głównie przez mszyce w sposób nietrwały i niekrażeniowy, choć może rozprzestrzeniać się wraz z sokiem przez uszkodzenia mechaniczne, przez szczepienie oraz wraz z wodą. PVY jest obecnie najważniejszym wirusem infekującym ziemniaki. Stanowi poważny problem również w uprawach pomidora, papryki i tytoniu. Od kilku dekad populacja wirusa ulega dynamicznym zmianom. Pojawiają się nowe, rekombinowane szczepy, które wywołują łagodne, trudne do wykrycia objawy na roślinach lub występują bezobjawowo. Jednocześnie często indukują nekrozy bulw, przyczyniając się do dyskwalifikacji plonu. Dlatego z praktycznego punktu widzenia istotne jest nie tylko czułe wykrywanie wirusa, ale również identyfikowanie szczepów powodujących nekrozy bulw. Tradycyjnie do tego celu stosuje się test biologiczny na roślinach wskaźnikowych, uzupełniony o test immunologiczny różnicujący serotypy O i N wirusa. Metody molekularne oparte o RT-PCR umożliwiają bardziej specyficzną identyfikację szczepów genetycznych. Jednoczesne wykrycie wirusa i rozróżnienie jego serotypów umożliwia test oparty o izotermiczną amplifikację kwasów nukleinowych techniką RT-LAMP.

WEWNĄTRZGATUNKOWE INTERAKCJE MIĘDZY IZOLATAMI WIRUSA Y ZIEMNIAKA (*POTATO VIRUS Y*, PVY) I WIRUSA M ZIEMNIAKA (*POTATO VIRUS M*, PVM) W INFEKCJACH MIESZANYCH

Anna Grupa-Urbańska

*Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB, Oddział MŁOCHÓW,
Pracownia Fitopatologii, Ul. Platanowa 15, 05-831 Młochów*

Wzajemne oddziaływanie wirusów niespokrewnionych ze sobą ma zwykle charakter synergistyczny lub obojętny. Natomiast w przypadku wirusów blisko ze sobą spokrewnionych, w szczególności szczepów/izolatów tego samego gatunku, dominują oddziaływania o charakterze antagonistycznym.

Celem badań było scharakteryzowanie interakcji między różnymi genetycznie izolatami wirusa Y ziemniaka (*Potato virus Y*, PVY) w infekcjach mieszanych w roślinach ziemniaka i tytoniu z wykorzystaniem metod biologicznych, serologicznych, molekularnych i immunofluorescencyjnych. Ponadto, oceniano zdolność mszycy brzoskwiniowo-ziemniaczanej *Myzus persicae* do jednoczesnego przenoszenia dwóch izolatów PVY. Celem badań była również analiza interakcji między różnymi izolatami wirusa M ziemniaka (*Potato virus M*, PVM) w infekcjach mieszanych w roślinach gatunku bieleń surmikwiat (*Datura metel* L).

Wykazano, że wewnątrzgatunkowe interakcje między różnymi genetycznie izolatami PVY i PVM w infekcjach mieszanych mają charakter antagonistyczny. Za pomocą zróżnicowanych metod diagnostycznych dowiedziono istnienia silnej konkurencji między izolatami PVY. Efekt rywalizacji zależał od kondycji/zdolności przystosowawczej izolatu, a także od terminu zaistnienia infekcji lub wykonania inokulacji każdym z pary izolatów PVY. Pojedyncze mszyce gatunku *M. persicae* były zdolne do równoczesnego nabywania i przenoszenia dwóch izolatów PVY. Wykazano, że infekcja łagodnym izolatem PVM całkowicie lub częściowo chroniła rośliny *D. metel* przed infekcją bardziej wirulentnym izolatem tego wirusa.

**DYNAMIKA ZMIAN APOPLASTU W EFEKCIE
INTERAKCJI ZGODNEJ I NIEZGODNEJ PVY^{NTN}.
*SOLANUM TUBEROSUM***

Katarzyna Otulak-Koziół, Edmund Koziół

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa
i Biologii,
Katedra Botaniki, ul Nowoursynowska 159, 02- 776 Warszawa*

Jednym z elementów systemu monitorującego stan komórki roślinnej jest ściana komórkowa, intensywnie zmieniająca się podczas oddziałujących biotycznych czynników stresowych. Brak jednak informacji jakie i na ile istotne zmiany towarzyszą interakcjom roślina - wirus. Dynamika zmian towarzyszących interakcjom roślina-patogen koncentruje się w dużej mierze na analizach efektów działania patogenów aktywnie penetrujących i wywołujących destrukcję ściany komórkowej, jako „pierwszego punktu kontaktowego” patogena z infekowaną rośliną (jak grzyby, nicienie czy bakterie). Jednakże najnowsze dane literaturowe na podstawie analizy transkryptomu wskazują na aktywację metabolizmu ściany komórkowej podczas infekcji wirusowej. Pozostaje dotychczas niezgłębione, czy procesy związane ze wzmacnianiem struktury ściany, czy też z jej rozluźnianiem są skutkiem silnej przebudowy apoplastu w efekcie infekcji wirusowej. Wydaje się, że są to procesy ściśle skorelowane z typem interakcji roślina – wirus. Prezentowane wyniki koncentrują się na porównaniu charakteru i dynamiki zmian ściany komórkowej indukowanych w efekcie interakcji zgodnej oraz reakcji nadwrażliwości ziemniak- nekrotyczny szczep wirusa Y ziemniaka PVY^{NTN}. Lokalizacja i dystrybucja kluczowych białek związanych ze strukturą ściany komórkowej, takich jak: β -1,3 glukanaza (PR-2), czy katalityczna podjednostka celulazy A4 (CesA4) oraz wpływających na aktywną rearanżację ściany komórkowej, jak ekstensyny HRGP pozwoliły wnioskować o aktywnej wymianie komponentów pomiędzy apoplastem i symplastem podczas stresu biotycznego infekcji wirusowej i ścisłej korelacji z typem odpowiedzi rośliny na patogena. Dynamika zmian apoplastu w efekcie interakcji ziemniak - PVY^{NTN} może być postrzegana

jako element zjawiska zwanego ‘SignWALLing’ angażującego aktywną wymianę informacji pomiędzy symplastem i apoplastem.

Badania finansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki, numer decyzji:
2018/02/X/NZ9/00832.

ANALIZA ULTRASTRUKTURALNA TRANSPORTU MIĘDZYKOMÓRKOWEGO I PATOGENEZY WIRUSA KARŁOWATOŚCI ŚLIWY (*PRUNUS DWARF VIRUS* (PDV))

Edmund Kozieł, Katarzyna Otulak-Kozieł

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Rolnictwa
i Biologii,
Katedra Botaniki, ul Nowoursynowska 159, 02- 776 Warszawa*

Wirus karłowatości śliwy (*Prune dwarf virus*, PDV) to groźny patogen atakujący drzewa owocowe –śliwy, wiśnie, brzoskwinie, a także wiele roślin zielnych. Pomimo, iż PDV jest intensywnie badany pod względem zależności filogenetycznych, funkcji genów czy też białek wirusa, nadal jak dotąd brakowało informacji na temat mechanizmów transportu międzykomórkowego i patogenezy tego wirusa na poziomie ultrastrukturalnym. Niniejsze badania wskazują na złożony charakter patogenezy podczas infekcji indukowanej przez PDV. Analiza kolokalizacji białek uczestniczących w transporcie międzykomórkowym (MP) wraz z białkiem kapsydu (CP) oraz zaangażowanie organelli komórki roślinnej w procesie patogenezy pozwoliły na wskazanie szlaku transportu lokalnego tego wirusa. PDV może być transportowany w postaci cząstek dzięki strukturom tubularnym, udział w tym procesie białka MP warunkuje transport przez plazmodesmy. Modelowanie struktury 3D białek transportowych wirusa PDV oraz wirusa mozaiki lucerny (AMV), również z grupy *Bromoviridae*, pozwoliło na wskazanie istotnych podobieństw w mechanizmie transportu lokalnego pomiędzy PDV a AMV.

WYKRYWANIE I IDENTYFIKACJA NEPOWIRUSÓW W ROŚLINACH Z RODZAJU *RUBUS*

Elżbieta Dąbrowska, Elżbieta Paduch-Cichal

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Ogrodnictwa,
Biotechnologii i Architektury Krajobrazu,
Samodzielny Zakład Fitopatologii, ul Nowoursynowska 159, 02- 776 Warszawa*

Wirusy należące do rodzaju *Nepovirus* są patogenami polifagicznymi. Wiadomo, że sześć spośród nich poraża rośliny należące do rodzaju *Rubus* (Martin i in. 2013). Są to: wirus mozaiki gęsiówki (*Arabis mosaic virus*, ArMV), wirus liściozwoju czereśni (*Cherry leaf roll virus*, CLRV), wirus pierścieniowej plamistości maliny (*Raspberry ringspot virus*, RpRSV), wirus pierścieniowej plamistości tytoniu (*Tobacco ringspot virus*, TRSV), wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*, TBRV), wirus pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato ringspot virus*, ToRSV). Materiał badawczy stanowiły liście malin oraz jeżyn pobrane w kwietniu i maju 2019 r. z czterech lokalizacji w województwie mazowieckim. Celem badań było ustalenie stanu porażenia roślin przez nepowirusy przy użyciu testu immunoenzymatycznego – ELISA. RpRSV oraz TRSV wykryto w 2/460 prób, ArMV wykryto w 3/460 prób, TBRV wykryto w 9/460 prób. CLRV oraz ToRSV nie zostały wykryte. Planowane są dalsze badania: potwierdzenie pozytywnych wyników testu ELISA przy użyciu techniki RT-PCR, przeprowadzenie testów biologicznych oraz obserwacja cząstek wirusów dzięki technice immunoelektronomikroskopowej. Wykonana zostanie również analiza filogenetyczna uzyskanych izolatów oraz izolatów zdeponowanych w Banku Genów.

WIRUSY I WIROIDY ROŚLIN W BADANIACH PROWADZONYCH W INSTYTUCIE UPRAWY NAWOŻENIA I GLEBOZNAWSTWA W PUŁAWACH

Grażyna Korbecka-Glinka, Urszula Skomra, Teresa Doroszevska

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa,
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin, ul. Krańcowa 8, 24-100 Puławy*

W Instytucie Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa (IUNG-PIB) od blisko 100 lat prowadzone są prace w zakresie hodowli chmielu i tytoniu. Natomiast badania nad wirusami i wiroidami roślin wynikają przede wszystkim ze znaczenia jakie te patogeny mają dla uprawy obu gatunków.

Tytoń w warunkach polowych porażany jest głównie przez wirus Y ziemniaka (PVY), wirus brązowej plamistości pomidora (TSWV) oraz wirus mozaiki tytoniowej (TMV). Prace dotyczące charakterystyki odporności na te patogeny w kolekcji odmian tytoniu oraz dzikich gatunków z rodzaju *Nicotiana* doprowadziły do identyfikacji źródeł odporności, które są lub mogą być wykorzystywane w hodowli odpornościowej (Depta et al. 2018; Doroszevska and Depta 2011; Laskowska et al. 2013). W ramach hodowli ukierunkowanej na odporność na TSWV otrzymano linie hodowlane tytoniu z introgresją pochodzącą od odpornego gatunku *N. alata*, przy czym aktualnie prowadzone są prace nad lokalizacją tej introgresji w genomie oraz poprawą fenotypu w celu otrzymania odmiany odpornej.

Zróznicowanie genetyczne PVY daje możliwość porównania efektywności różnych źródeł odporności/tolerancji na tego wirusa w testach inokulacji izolatami PVY, które reprezentują różne szczepy tego wirusa. Okazuje się, że najbardziej zjadliwe szczepy PVY (PVY^{NTN}) są w stanie przełamać odporność większości odmian tytoniu z odpornością typu *va*, ale nie wywołują natomiast objawów nekrotycznych na tolerancyjnej linii hodowlanej tytoniu BPA (Korbecka-Glinka et al. 2017). Do otrzymania tej linii wykorzystano odporny gatunek *N. africana* (Doroszevska 2010).

Chmiel jest często porażany przez wirusy i wiroidy, które mogą powodować obniżenie plonu oraz niekorzystne zmiany chemiczne surowca. Kumulację tych

patogenów w roślinach ułatwia wieloletni charakter uprawy oraz zabiegi agrotechniczne, które często prowadzą do mechanicznych uszkodzeń roślin. W Polsce chmiel najczęściej porażają: wirus mozaiki chmielu (HpMV), wirus mozaiki jabłoni (ApMV) oraz wiroid utajony chmielu (HpLVd) (Skomra 2001). Najlepszą metodą na ograniczenie występowania tych patogenów jest zakładanie plantacji przy użyciu zdrowych sadzonek. W IUNG-PIB udoskonalono i wdrożono metodę eliminacji tych patogenów poprzez regenerację merystemów wierzchołkowych. Uzyskane w ten sposób zdrowe rośliny są obecnie wykorzystywane do produkcji sadzonek wolnych od wirusów i wiroidów.

Poza wyżej wymienionymi patogenami chmiel może być porażany również przez inne wirusy i wiroidy. Aktualnie monitorowane jest występowanie dwóch wirusów (HpLV, ArMV) i trzech wiroidów (HSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach na terenie Polski, które są zlokalizowane w głównych rejonach uprawy tego gatunku. Prowadzona będzie też identyfikacja patogenów chmielu na drodze sekwencjonowania RNA metodą NGS.

Literatura:

- Depta, A., K. Kurska, T. Doroszevska, D. Laskowska and A. Trojak-Goluch (2018) Reaction of *Nicotiana* species and cultivars of tobacco to Tobacco mosaic virus and detection of the N gene that confers hypersensitive resistance. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 54: 143-146.
- Doroszevska, T. (2010) Transfer of tolerance to different *Potato virus Y* (PVY) isolates from *Nicotiana africana* Merxm. to *Nicotiana tabacum* L. *Plant Breeding* 129: 76-81.
- Doroszevska, T. and A. Depta (2011) Resistance of wild *Nicotiana* species to different PVY isolates. *Phytopathologia* 59: 9-24.
- Korbecka-Glinka, G., A. Czubačka, M. Przybys and T. Doroszevska (2017) Resistance vs. tolerance to *Potato virus Y* in tobacco - comparing effectiveness using virus isolates from Central Europe. *Breeding Science*. 67: 459-465.
- Laskowska, D., T. Doroszevska, A. Depta, K. Kurska, H. Olszak-Przybys and A. Czubačka (2013) A survey of *Nicotiana* germplasm for resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). *Euphytica* 193: 207-219.
- Skomra, U. (2001) Występowanie wirusów w roślinach chmielu na Lubelszczyźnie. *Pamiętnik Puławski* 126: 107-124.

PIERWSZE WYKRYCIE SPRAWCY MOZAIKI BORÓWKI WYSOKIEJ (*BLUEBERRY MOSAIC ASSOCIATED VIRUS*, BLMAV) W POLSCE

Mirosława Cieślińska

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Wirus wywołujący mozaikę borówki wysokiej (*Blueberry mosaic associated virus*, BIMaV) należy do rodziny *Aspiviridae*, rodzaju *Ophiovirus*. Jego genom składa się z trzech antysensownych cząsteczek jednoniciowego RNA (RNA1, RNA2 i RNA3).

Mozaika borówki wysokiej występuje w USA, rzadziej w Kanadzie, Nowej Zelandii, Europie, Afryce Południowej, Argentynie i Chile. Charakterystycznym objawem choroby są plamy i mozaikowe wzory na liściach koloru jasnożółtego, a w późniejszym okresie wegetacji - różowego do czerwono-karminowego. Przebarwienia te mogą występować tylko na niektórych pędach, a niekiedy wirus nie wywołuje widocznych objawów. BIMaV powoduje zmniejszenie plonu (np. o 15% u odm. Bluecrop), obniżenie jakości owoców i opóźnienie ich dojrzewania.

Celem badań była identyfikacja i charakterystyka molekularna izolatów wirusa wykrytego w roślinach kilku odmian borówki wysokiej. Próby liści pobrano z czterech roślin borówki wysokiej odmian: Rubel (woj. podlaskie), Goldtraube (woj. łódzkie) wykazujących objawy mozaiki oraz Goldtraube (woj. małopolskie) i Huron (woj. łódzkie), na których nie obserwowano zmian chorobowych.

RNA wirusa izolowano z liści metodą adsorpcji na żelu krzemionkowym (ang. *silica capture*, SC), a następnie fragment RNA1 amplifikowano w reakcji RT-PCR. We wszystkich próbach wykryto BIMaV, a uzyskane izolaty oznaczono: BIMaV: WIL (z odm. Rubel), BOT (z odm. Goldtraube, woj. łódzkie), KUS (z odm. Goldtraube, woj. małopolskie) i CIEP (z odm. Huron, woj. łódzkie). W celu określenia właściwości genetycznych badanych izolatów, w firmie Genomed S.A przeprowadzono sekwencjonowanie fragmentów RNA1 (przypuszczalnie kodujący białko polimerazy RNA zależnej od polimerazy),

RNA2 (przypuszczalnie kodujący białko transportowe) i RNA3 (przypuszczalnie kodujący nukleoproteinę). Do analizy sekwencji uzyskanych fragmentów genomu wykorzystano oprogramowanie pakietu Lasergene 7.1 (DNASTAR), a analizę filogenetyczną przeprowadzono metodą największej wiarygodności (MEGA 5.2).

Podobieństwo sekwencji fragmentów izolatów WIL, BOT, KUS i CIEP w obrębie RNA1 wynosiło - 90,6-99,4%, RNA2 - 95,5-98,9% i RNA3 -94,4-99,8%. Największe zróżnicowanie w sekwencji nukleotydów stwierdzono dla izolatu BOT. Przeprowadzono analizę filogenetyczną badanych sekwencji oraz analogicznych sekwencji szczepów BIMaV zamieszczonych w bazie GenBank. Dwa badane izolaty wirusa – CIEP i WIL grupowały się na wspólnych gałęziach drzew filogenetycznych RNA1, RNA2 i RNA3 wraz ze szczepem Arkansas5 z USA, co świadczyło o ich bliskim pokrewieństwie. Izolat BOT znacznie różnił się pod względem właściwości molekularnych od pozostałych analizowanych izolatów wirusa i znajdował się na odrębnych gałęziach drzew filogenetycznych razem ze szczepem referencyjnym Jat8 z Japonii. Z kolei, pozycja filogenetyczna izolatu KUS zależała od analizowanego fragmentu genomu. Analiza sekwencji nukleotydów RNA1 izolatu KUS wskazywała na jego bliższe pokrewieństwo z izolatem BOT i szczepem Jat8 z Japonii, podczas gdy, ze względu na duże różnice w sekwencji RNA2, izolat ten był wydzielony od pozostałych. Z kolei, analiza fragmentu RNA3 wykazała, że izolat KUS grupował się wraz z izolatami CIEP i WIL oraz amerykańskim szczepem Arkansas5 na tej samej gałęzi drzewa filogenetycznego.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, iż badane izolaty różniły się pod względem genetycznym. Izolaty WIL i CIEP były blisko spokrewnione ze szczepem Arkansas5 z USA, zaś BOT - ze szczepem Jat8 z Japonii. W zależności od analizowanego fragmentu genomu, izolat KUS wykazywał właściwości charakterystyczne dla szczepu z USA lub szczepu japońskiego.

Badania były prowadzone w ramach zadania 2.1 „Aktualizacja i opracowanie metodyk integrowanej ochrony roślin i Integrowanej Produkcji Roślin oraz analiza zagrożenia fitosanitarnego ze strony organizmów szkodliwych dla roślin” Programu Wieloletniego Instytutu Ogrodnictwa (2015-2020).

PIERWSZE WYKRYCIE KWARANTANOWEGO PATOGENA ‘*CANDIDATUS PHYTOPLASMA ULMI*’ ZAGRAŻAJĄCEGO WIĄZOM W POLSCE

Mirosława Cieślińska¹, Klaudia Krajciczek², Anna Pałka²

¹*Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice*

²*Wojewódzki Inspektorat Ochrony Roślin i
Nasiennictwa, Oddziału w Raciborzu, Katowice*

‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ (‘*Ca. P. ulmi*’) jest kwarantannową fitoplazmą wywołującą żółtaczkę wiązu (*Ulmus* sp.) w USA i w Europie m.in. we Włoszech, Francji, w Niemczech, Czechach, Serbii i Chorwacji. Celem pracy było określenie przyczyny żółknięcia liści i zamierania wiązów rosnących na terenie kilku leśnictw w południowej części województwa śląskiego. Lustracje prowadzono w rejonie Bielska-Białej, Cieszyna, Raciborza i Pszczyny. Z łyka pędów pobranych z drzew wiązu pospolitego oraz wiązu górskiego wyizolowano DNA, z którego następnie amplifikowano fragment genu 16S rRNA w reakcji PCR. Fitoplazmę wykryto w sześciu próbach z chorych drzew wiązu pospolitego rosnących na terenie leśnictwa Nędza. Profile restrykcyjne uzyskane po trawieniu enzymem *Bfa*I fragmentu 16S rDNA fitoplazmy z wiązów różnił się od wzoru uzyskanego dla szczepu ‘*Ca. P. ulmi*’ (16SrV-A) i był identyczny, jak dla wzorcowego szczepu ‘*Ca. P. rubi*’ (16SrV-E). Analiza sekwencji wykazała, że mutacja punktowa skutkowała dodatkowym miejscem restrykcyjnym po trawieniu enzymem *Bfa*I, które nie występowało w referencyjnych szczepach ‘*Ca. P. ulmi*’. Sekwencja genu 16S rRNA polskich izolatów i szczepu EYCZ1 ‘*Ca. P. ulmi*’ z Czech (nr dostępu GenBank: EU184021) była identyczna. Najniższe podobieństwo (99,7%) w obrębie tego regionu było pomiędzy sekwencjami polskich izolatów i szczepu fitoplazmy z USA (AF122911). Pozycja filogenetyczna 16S rRNA polskich izolatów była niejednoznaczna i lokowała się na granicy podgrupy 16SrV-A (‘*Ca. ulmi*’) oraz 16SrV-C (fitoplazmy wywołujące: flavescence dorée, żółtaczkę olchy i miotłastość żarnowca). W celu przeprowadzenia dokładniejszej charakterystyki molekularnej wykrytych izolatów fitoplazm, zamplifikowano również fragmenty genów białka

rybosomalnego (*rpl22*, *rps3*) i translokazy białkowej (*secY*), a następnie przeprowadzono analizę sekwencji nukleotydów uzyskanych fragmentów DNA. Porównując sekwencje tych fragmentów genomu wykazano większe zróżnicowanie genetyczne między badanymi izolatami ‘*Ca. P. ulmi*’ i szczepami tej fitoplazmy wykrytymi w innych krajach. Analiza filogenetyczna genów *rpl22*, *rps3* i *secY* wykazała pokrewieństwo fitoplazmy z wiązów odpowiednio z podgrupami rpV-A i secYV-A (‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’). Polskie izolaty były spokrewnione ze szczepami EY1_SRB i EY10_SRB z Serbii oraz EYCZ1 z Czech. Rezerwuarem fitoplazmy były prawdopodobnie wiązy rosnące w Czechach, z których patogen ten mógł zostać przeniesiony przez skoczki na drzewa rosnące w obrębie leśnictwa Nędza położonego w rejonie przygranicznym. Jest to pierwsze doniesienie o wykryciu fitoplazmy żółtaczkę wiązu w naszym kraju.

POLIMORFIZMY OPERONU 16S RDNA W GENOMACH FITOPLAZM ‘*CANDIDATUS PHYTOPLASMA ASTERIS*’ PODGRUPY 16SrI-B INFEKUJĄCYCH ROŚLINY UPRAWNE W POLSCE

Agnieszka Zwolińska¹, Henryk Pospieszny¹, Natasza Borodynko-Filas²

¹*Instytut Ochrony Roślin-PIB, Zakład Wirusologii i Bakteriologii, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań*

²*Instytut Ochrony Roślin-PIB, Klinika Chorób Roślin i Bank Patogenów, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań*

Fitoplazmy są bakteriami fitopatogenicznymi, które namnażają się w łyku roślin. Patogeny te zasiedlają również organy wewnętrzne piewików (*Auchenorrhyncha*) - owadów, które są odpowiedzialne za ich przenoszenie. W hemolimfie owada (wektora) fitoplazma wydajnie się namnaża, a z czasem przenika do ślinianek skąd wraz ze śliną może zostać przeniesiona na kolejną roślinę. Objawy wywoływane przez fitoplazmy, takie jak: żółtaczka, miotlastość, deformacja kwiatów (np. formy liściopodobne, tzw. fyllochia) czy karłowacenie, prowadzą do obniżenia zdrowotności roślin, a w przypadku roślin uprawnych, do obniżenia jakości i ilości plonu. Doniesienia o nasileniu występowania chorób fitoplazmatycznych w Europie południowej i zachodniej oraz przypadki infekcji obserwowane na grochu i rzepaku w Polsce, były przesłanką do podjęcia dalszych badań nad rozpowszechnieniem fitoplazm w polskim środowisku rolniczym, a także nad ich zróżnicowaniem oraz przynależnością taksonomiczną. W latach 2012-2016 przeprowadzono lustrację wybranych roślin uprawnych i ozdobnych. Materiał badawczy stanowiły rośliny rolnicze z objawami wskazującymi na infekcję fitoplazmatyczną. Analiza molekularna próbek zebranych w zachodniej i centralnej Polsce oraz roślin otrzymanych od producentów wykazała zakażenie fitoplazmami dziewięciu gatunków roślin. Szczepy '*Candidatus (Ca.) Phytoplasma asteris*' zidentyfikowano na marchwi, buraku cukrowym, łubinie, grochu, kalafiorze, gorzycy, pszenicy, kukurydzy oraz na jałowcu i aksamitce rozpierschłej. Na podstawie analizy sekwencji 16S

rDNA zaklasyfikowano izolaty fitoplazm do podgrupy rybosomalnej 16SrI-B i blisko spokrewnionych linii genetycznych (podgrupy: -L, -B/L). Badania ujawniły występowanie trzech miejsc polimorficznych w sekwencji genu 16S rRNA wśród części badanych izolatów fitoplazm wskazując na heterogeniczność dwóch operonów rybosomalnych. Analiza pojedynczych kopii genu 16S rRNA wykazała, że istnieją więcej niż dwa warianty sekwencji 16S rDNA w izolatach fitoplazm pochodzących z pojedynczych roślin. Sytuacja taka może być następstwem infekcji dwoma lub więcej szczepami fitoplazm lub obecnością szczególnego szczepu fitoplazmy, który posiada więcej niż dwie kopie operonu rybosomalnego. Filogeneza molekularna oparta na dwóch markerach genetycznych tj. genach 16S rRNA oraz *tuf* pokazała jednoznacznie, że wszystkie badane izolaty fitoplazm należały do gatunku '*Ca. Phytoplasma asteris*' i plasowały się na drzewachrazem z innymi przedstawicielami podgrupy rybosomalnej 16SrI-B. Na podstawie uzyskanych wyników badań wykazano po raz pierwszy na świecie, że fitoplazmy z podgrupy 16SrI-B mogą porażać takie rośliny jak: burak cukrowy, łubin, groch uprawny, kalafior i gorzycę uprawną oraz że fitoplazmy z podgrupy 16SrI-L mogą infekować buraka cukrowego, kukurydzę i groch uprawny. Ponadto opisano zmienność w sekwencji genów 16S rRNA w obrębie genomu fitoplazm 16SrI-B i pokrewnych (paralogów), oraz w sekwencji genów 16S rRNA poszczególnych szczepów fitoplazm 16SrI-B i pokrewnych (ortologów).

Część badań sfinansowano z grantu HFSP RGP0024/2015. Pierwsza autorka otrzymała stypendium doktorskie ETIUDA 4 ufundowane przez Narodowe Centrum Nauki (UMO-2016/20/T/NZ9/00571).

WYKRYWANIE I CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA NOWYCH LINII GENETYCZNYCH FITOPLAZM PODGRUPY 16SR V-C INFEKUJĄCYCH OLCHĘ CZARNĄ (*ALNUS GLUTINOSA* L. GAERTN.) I BYLICĘ (*ARTEMISIA VULGARIS* L.) W POLSCE

Marta Jurga, Agnieszka Zwolińska

*Instytut Ochrony Roślin-PIB, Zakład Wirusologii i Bakteriologii,
ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań*

Fitoplazmy infekują wiele gatunków roślin uprawnych, a także dziko rosnących np. drzew i krzewów, które mogą pełnić rolę rezerwuaru tych patogenów w środowisku. Fitoplazm nie można hodować *in vitro*, a ich klasyfikacja oparta jest o zróżnicowanie sekwencji 16S rDNA.

Na olszy czarnej (*A. glutinosa*) rosnącej w południowym rejonie Polski (okolice Raciborza) zaobserwowano w 2018 roku zwarty pokrój części pędów bocznych. Pojedyncze pędy miały skrócone międzywęzła oraz jaśniejszą barwę liści w porównaniu z resztą korony. Do badań włączono również rosnącą nieopodal bylicę pospolitą (*A. vulgaris*) z objawami licznych zniekształceń morfologicznych. Pędy bylicy uległy silnemu zwężeniu i poskręcaniu, przypominając wąsy czepne roślin strączkowych. Obserwowano również nadmierną proliferację skutkującą powstawaniem tzw. czarcich mioteł.

Do badań pobrano nadziemne, zdeformowane części roślin, z których wyizolowano DNA. Próby przetestowano pod kątem obecności fitoplazm za pomocą zagnieżdżonego PCR (ang. nested-PCR) z użyciem zestawu specyficznych starterów hybrydujących do genów 16S rRNA oraz operonu białek rybosomalnych (geny *rp*). Uzyskane fragmenty obu loci o pożądanej długości ~ 1,2 kilo par zasad (kz) poddano sekwencjonowaniu. Analizę izolatu fitoplazm z olszy poszerzono o gen *secY* (~ 1,1 kz). Uzyskane sekwencje umieszczono w bazie GenBank pod następującymi nr akcesyjnymi: MK440303, MK806438, MK992916 (olsza) oraz MK440304, MK814810 (bylica).

Przynależność badanych fitoplazm do grupy 16S rRNA określono za pomocą wirtualnego trawienia restrykcyjnego fragmentu genu 16S rRNA (1,2 kz) w

programie *iPhyClassifier*. Na podstawie otrzymanego profilu restrykcyjnego fitoplazmy z olchy i bylicy zostały zaklasyfikowane do podgrupy 16SrV-C.

Pokrewieństwo szczepów określono przeszukując bazę danych GenBank narzędziem BLASTn oraz konstruuując drzewa filogenetyczne wraz z sekwencjami poszczególnych gatunków fitoplazm. Analizy powiązań ewolucyjnych przeprowadzone na podstawie badanych genów wskazały, że fitoplazmy infekujące olszę i bylicę są ze sobą blisko spokrewnione i dzielą wspólnego przodka z fitoplazmami z podgrup 16SrV-C i 16SrV-D. Sekwencjonowanie genów *rp* wykazało, że szczepy z olchy i bylicy różnią się synonimiczną mutacją punktową w obrębie genu kodującego białko rybosomalne S3 (gen *rps3*). Ta pojedyncza zmiana jednonukleotydowa wytyczyła nową linię genetyczną fitoplazm 16SrV-C i pozwoliła na rozróżnienie obu szczepów.

Jest to pierwsze wykrycie fitoplazmy 16SrV-C w Polsce na olszy czarnej oraz pierwsze na świecie wykrycie tej fitoplazmy na bylicy pospolitej. Porażenia olszy czarnej fitoplazmami z podgrupy 16SrV-C odnotowano dotychczas we Francji, Niemczech, Szwajcarii, Austrii, Włochach, Serbii oraz Czarnogórze. Fitoplazmy z grupy 16SrV takie jak ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ (16SrV-A) oraz ‘*Grapevine flavescence dorée phytoplasma*’ (16SrV-C i 16SrV-D) są sprawcami groźnych chorób wierzchołkowych oraz winorośli, i wpisane są na listę organizmów kwarantannowych. Potwierdzenie obecności patogenu na olszy oraz bylicy świadczy o tym, że oba gatunki mogą stanowić rezerwuariat fitoplazmy 16SrV-C i odgrywać znaczącą rolę w jej rozprzestrzenianiu się na winorośl w Polsce.

Badania zostały sfinansowane przez Human Frontier Science Program (HFSP) z grantu badawczego nr. RGP0024/2015 oraz z tematu statutowego (WIB-02) przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Instytutu Ochrony Roślin - PIB.

CHARAKTERYSTYKA ODDZIAŁYWAŃ WIRUS-GOSPODARZ NA PRZYKŁADZIE PATOGENICZNOŚCI WIRUSA NEKROZY POMIDORA NA *SOLANUM LYCOPERSICUM*

Przemysław Wieczorek, Marta Budziszewska, Barbara Wrzesińska, Arnika Przybylska, Patryk Frąckowiak, Aleksandra Obrepalska-Stepłowska

Instytut Ochrony Roślin-PIB, Zakład Biologii Molekularnej i Biotechnologii, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

Wirus nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV), wywołujący nekrozy na podatnych odmianach *Solanum lycopersicum*, jest typowym przedstawicielem torradowirusów. Ponadto, torradowirusy to patogeny porażające pomidory, sałatę, marchew, dynię piżmową, czy koniczynę.

Zastosowanie innowacyjnej, wysoce czulej metody diagnostycznej, jaką jest reakcja cyfrowego PCR (ang. *digital PCR*), umożliwia wykrycie nawet pojedynczych kopii RNA wirusa ToTV w zainfekowanych roślinach oraz w jego wektorze. Określenie determinant patogeniczności ToTV przeprowadzono techniką ekspresji przejściowej genów/białek (lokalnej oraz systemicznej) w pomidorze oraz *Nicotiana benthamiana*. Przypuszcza się, że co najmniej trzy geny ToTV mogą determinować patogeniczność tego wirusa: domena 11K w obrębie poliproteiny kodowanej przez RNA1, białko 3A uczestniczące w transporcie oraz podjednostki białka płaszczu Vp26/Vp23. Białko 3A determinuje specyficzność ToTV do porażania *S. lycopersicum* lub *N. benthamiana*. Natomiast podjednostki białka płaszczu Vp26 oraz Vp23 mogą mieć wpływ na nekrotyczny charakter infekcji ToTV na pomidorze. Biorąc pod uwagę odpowiedź rośliny na atak wirusa, wyniki badań pokazują, że pomimo braku silnego supresora potranskrypcyjnego wyciszania genów kodowanego przez ToTV, wirus ten przełamuje tą odpowiedź obronną gospodarza i w efekcie wydajnie przemieszcza się w jego tkankach. Potwierdzają to wyniki badań, w których ToTV porażał mutanty *N. benthamiana*, w których wyciszano geny szlaków potranskrypcyjnego wyciszania genów. Dzięki zastosowaniu

nowoczesnych metod badawczych możliwe było zbadanie wzajemnych relacji ToTV-gospodarz-wektor, w tym określenie domen patogeniczności (3A, Vp26/Vp23 oraz 11K) oraz wskazanie determinant RNA uczestniczących w oddziaływaniu wirusa z wektorem.

Badania prowadzono w ramach projektów NCN nr: 2016/21/D/NZ9/02478 i 2016/21/D/NZ9/02468 oraz stypendium EMBO Short-Term Fellowship 7022.

WPLYW INFEKCJI WIRUSEM KARŁOWATOŚCI ORZECHA ZIEMNEGO (PSV) NA REGULACJĘ EKSPRESJI GENÓW *NICOTIANA BENTHAMIANA* POWIĄZANYCH Z PROCESEM FOSFORYLACJI

Barbara Wrzesińska¹, Agnieszka Zmienko^{2,3}, Lam Dai Vu^{4,5,6,7}, Ive De Smet^{4,5}, Aleksandra Obrepalska-Stęplowska¹

¹ Zakład Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Instytut Ochrony Roślin, Poznań, Polska

² Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań, Polska

³ Instytut Informatyki, Wydział Informatyki, Politechnika Poznańska, Poznań, Polska

⁴ Zakład Biotechnologii Roślin i Bioinformatyki, Uniwersytet w Gandawie, Belgia

⁵ Zakład Biologii Systemów Roślinnych, VIB, Gandawa, Belgia

⁶ Zakład Medycyny Biomolekularnej, Uniwersytet w Gandawie, Belgia

⁷ Centrum Biotechnologii Medycznej VIB, Gandawa, Belgia

Modyfikacje potranslacyjne białek wpływają na zmiany strukturalne białek i ich aktywności, lokalizację komórkową, stabilność oraz oddziaływania z innymi białkami lub cząsteczkami. Jedną z nich jest fosforylacja, polegająca na przyłączeniu reszty fosforanowej najczęściej do seryny, treoniny lub tyrozyny, mająca odwracalny charakter. Fosforylacja stanowi główny mechanizm kontrolny aktywności białek w oddziaływaniach patogen-gospodarz, czy główny mechanizm przekazywania sygnału w warunkach stresowych. W wyniku analizy małych niekodujących RNA (sRNA) roślin *N. benthamiana* zainfekowanych PSV w obecności lub braku satelitarnego RNA (satRNA) zidentyfikowano sRNA mogące regulować zarówno geny *N. benthamiana*, jak również uczestniczyć w procesie wyciszania genomowych RNA PSV. Nie wykazano obecności sRNA, których celem jest satRNA PSV. Analiza funkcjonalna transkryptów *N. benthamiana* będących miejscem działania sRNA skierowanych także przeciwko genomowym RNA PSV wykazała, iż duża liczba transkryptów związanych z biologicznymi procesami powiązana jest z fosforylacją. Co więcej, w wyniku analizy fosfoproteomu roślin *N. benthamiana* zainfekowanych PSV i

PSV z satRNA otrzymano dane świadczące o znacznym spadku poziomu fosforylacji białek w obecności PSV (bez satRNA). Także dane transkryptomyczne wskazują na silny wpływ infekcji samym wirusem na fosforylację. Zebrane wielopoziomowe dane świadczą o znaczącym wpływie obecności PSV na proces fosforylacji w roślinach *N. benthamiana*, której regulacja związana jest procesem wyciszania genów. Obecność satRNA w obecności PSV powoduje natomiast wzrost poziomu fosforylacji białek podczas infekcji wirusowej, jednakże nie zidentyfikowano sRNA związanych z sekwencją satRNA.

Badania finansowane z grantu Narodowego Centrum Nauki OPUS: UMO-2014/13/B/NZ9/02002.

METODA SEKWENCJONOWANIA NOWEJ GENERACJI NARZĘDZIEM DO IDENTYFIKACJI WIRUSÓW ROŚLIN

Aleksandra Zarzyńska-Nowak¹, Beata Hasiów-Jaroszewska¹, Daria
Budzyńska¹, Denis Kutjak²

¹*Instytut Ochrony Roślin-PIB, Zakład Wirusologii i
Bakteriologii, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań*

²*Department of Biotechnology and Systems Biology, National Institute of Biology,
Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia*

Metoda sekwencjonowania nowej generacji (NGS) jest coraz bardziej powszechną techniką wykorzystywaną w badaniach biologicznych. Opiera się o równoległe, masowe sekwencjonowanie od kilku tysięcy do kilkuset milionów matryc, dzięki czemu uzyskuje się znaczne ilości danych w stosunkowo krótkim czasie. Odpowiednio przeprowadzona analiza bioinformatyczna umożliwia m. in. identyfikację wirusów poprzez mapowanie otrzymanych sekwencji do genomów referencyjnych, wykrywanie wariantów genetycznych czy nawet nowych gatunków.

Zakład Wirusologii i Bakteriologii IOR-PIB w Poznaniu posiada obszerną kolekcję wirusów porażających wiele różnych gatunków roślin gospodarczo-ważnych, ozdobnych, drzew, krzewów i chwastów. Od wielu lat kolekcja ta jest wzbogacana poprzez prowadzenie corocznych monitoringów upraw oraz działalność Kliniki Chorób Roślin. Jednakże w ciągu ostatnich lat w kolekcji zwiększa się liczba próbek, w których nie udało się określić gatunku wirusa za pomocą konwencjonalnych technik identyfikacji patogenów roślin. Celem prowadzonych badań była analiza wybranych próbek za pomocą techniki NGS. Do badań wybrano 12 próbek pochodzących z następujących gatunków roślin: bobik, cukinia, lepnica biała, ogórek, ostróżka belladonna, robinia akacjowa i werbena. Z roślin izolowano całkowity RNA, usunięto rybosomalny RNA, a następnie skonstruowano biblioteki. Sekwencjonowanie testowe wykonano z użyciem sekwenatora MiSeq (Illumina), w technologii sparowanych końców 2x250 nt. Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie właściwe z użyciem sekwenatora NextSeq500 (Illumina), w technologii sparowanych końców 2x36

nt. Analizę bioinformatyczną otrzymanych danych przeprowadzono za pomocą programów CLC Genomics (Qiagen), MEGAN6, FastQC oraz algorytmów Bowtie2 i Spades.

Wykorzystanie techniki NGS umożliwiło identyfikację i otrzymanie pełnych sekwencji genomów następujących wirusów: afidorodnego wirusa żółtaczki dyniowatych w roślinie cukinii, wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora w roślinie werbeny, wirusa karłowatości orzeszka ziemnego w roślinie robinii akacjowej, wirusa mozaiki arbuza w roślinie cukinii, wirusa mozaiki gęsiówki w roślinie ostróżki belladonna, wirusa mozaiki ogórka w roślinie ogórka, wirusa żółtej centkowatości melandrium w roślinie lepnicy białej, wirusa w roślinie ogórka, żółtej mozaiki cukinii w roślinie cukinii, wirusa żółtej mozaiki fasoli w roślinie bobiku, wirusa żółtej mozaiki koniczyny w roślinie werbeny, oraz *Chenopodium quinoa mitovirus 1* w roślinie komosy ryżowej. W wielu przypadkach wirusy identyfikowano w postaci infekcji mieszanych. Badania potwierdzają wysoką skuteczność techniki NGS w diagnostyce wirusów roślin. Niezwykle istotna jest też możliwość wykrycia nowych, dotąd nienotowanych w Polsce wirusów np. *Chenopodium quinoa mitovirus 1*.

ANALIZA ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ POLSKICH IZOLATÓW WIRUSA MOZAIKI STOKŁOSY (*BROME MOSAIC VIRUS, BMV*)

Katarzyna Trzmiel

*Instytut Ochrony Roślin-PIB, Zakład Wirusologii i
Bakteriologii, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań*

Wirus mozaiki stokłosa (*Brome mosaic virus, BMV*) jest typowym przedstawicielem rodzaju *Bromovirus* w rodzinie *Bromoviridae*. *BMV* poraża szeroki zakres roślin żywicielskich i jest przenoszony przez wektory owadzie, głównie przez skrzypionki z rodzaju *Oulema* i *Phylotrella*. Jego występowanie potwierdzono w USA, Europie oraz południowej części Afryki. W Polsce wirus wykryto po raz pierwszy w porażonych roślinach pszenicy, w 1999 r. Pomimo tego, że *BMV* zaliczono do dziesiątki najważniejszych wirusów roślin i jest wykorzystywany jako model molekularny do badań nad ekspresją genów wirusów, replikacją i rekombinacją RNA oraz interakcjami wirus – gospodarz, to jednak wiedza o zróżnicowaniu genetycznym populacji tego wirusa jest nadal ograniczona. W bazie NCBI GenBank zdeponowano jak dotąd tylko 5 kompletnych sekwencji genomu *BMV*.

W wyniku prac prowadzonych w latach 2013-2018, w IOR-PIB stworzono unikalną kolekcję *BMV*. Izolaty wirusa pochodzą z porażonych roślin, zarówno gospodarczo-ważnych (kukurydza i pszenżyto) oraz dziko rosnących traw (kupkówka pospolita, jęczmień płonny, wiechlina roczna, stokłosa miękka). Rośliny zbierano w różnych lokalizacjach na terenie Wielkopolski i Śląska. Ponadto, po raz pierwszy na świecie, wykryto infekcyjne izolaty *BMV* w wodach pobranych z rowów melioracyjnych i kanałów otaczających pola. Zgromadzone izolaty charakteryzuje duża zmienność właściwości biologicznych, wyrażająca się szeroką gamą objawów wywoływanych na porażonych roślinach jęczmienia, począwszy od bardzo silnego ograniczenia wzrostu roślin (*BMV* - Sosn) poprzez mozaikę liści (*BMV* - Sze, - Sr, - Choj, - N, - ML-1, - ML2, - S, - DBS, - R), aż do bezobjawowych infekcji utajonych (*BMV* - Ch).

Pierwsze wyniki badań doprowadziły do poznania sekwencji nukleotydów fragmentów genomu, w tym genu kodującego białko płaszczka (CP) poszczególnych izolatów wirusa. Wstępna analiza tych danych wykazała występowanie zmienności

genetycznej pomiędzy badanymi izolatami *BMV*, która może warunkować ich odmienne właściwości biologiczne. Podobieństwo sekwencji nukleotydów w obrębie genu CP kształtowało się na poziomie od 96,4% do 100%. Obecnie trwają prace nad uzyskaniem sekwencji nukleotydów kompletnego genomu badanych izolatów z zastosowaniem techniki sekwencjonowania następnej generacji (next-generation sequencing, NGS). Uzyskane wyniki w znaczący sposób poszerzą wiedzę na temat filodynamiki *BMV* i jego zdolności adaptacji do różnych gospodarzy. Zgromadzone dane umożliwią poszerzenie ogólnoswiatowej wiedzy na temat ewolucji tego wirusa, a także pozwolą na określenie relacji filogenetycznych pomiędzy badanymi i dotychczas opisanymi izolatami *BMV*, zarówno z naturalnych gospodarzy, jak i tych pozyskanych z próbek wody.

Prowadzone badania były finansowane z NCN w ramach projektu Nr 2018/02/X/NZ9/02474, w konkursie MINIATURA2.

CHARAKTERYSTYKA MOLEKULARNA I DYNAMIKA EWOLUCYJNA WIRUSA CZARNEJ PIERŚCIENIOWEJ PLAMISTOŚCI POMIDORA (*TOMATO BLACK RING VIRUS, TBRV*)

Daria Budzyńska¹, Beata Hasiów-Jaroszewska¹, Santiago F. Elena²

¹*Institut Ochrony Roślin-PIB, Zakład Wirusologii i
Bakteriologii, ul. Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań*

²*Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (CSIC-UV) Parc Científic UVCL.
Catedrático Agustín Escardino 9, Paterna 46980 València, Hiszpania*

Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus, TBRV*) należy do grupy B w rodzaju *Nepovirus* (rodzina *Secoviridae*). TBRV poraża rośliny gospodarczo-ważne (pomidory, ziemniaki, truskawki, maliny), gatunki ozdobne (flokse, aksamitka) oraz drzewa i krzewy (robinia akacjowa, bez czarny). Wirus ten może powodować duże straty w uprawach roślin. W Polsce na roślinach z rodzaju *Fragaria* L. oraz *Rubus* L. ma on status organizmu kwarantannowego.

W skład kolekcji Zakładu Wirusologii i Bakteriologii IOR-PIB wchodzi 47 izolatów TBRV pochodzących z różnych gospodarzy, zebranych w różnych regionach Polski. W ramach prowadzonych badań amplifikowano i sekwencjonowano gen kodujący białko płaszczka (CP) polskich izolatów TBRV. Uzyskane sekwencje porównano z innymi zdeponowanymi w Banku Genów, a następnie analizowano strukturę, zróżnicowanie i dynamikę ewolucyjną populacji TBRV. Sekwencje sprawdzano pod względem występowania zjawiska rekombinacji przy wykorzystaniu takich programów jak SplitsTree4, RDP4 oraz algorytmu GARD (serwer Datamonkey). W celu określenia presji selekcyjnej działającej na poszczególne kodony sekwencje analizowano za pomocą algorytmów: FEL, FUBAR, SLAC i MEME. Ponadto określono relacje filogenetyczne występujące pomiędzy poszczególnymi izolatami oraz przeprowadzono analizę dynamiki ewolucyjnej populacji TBRV wykorzystując pakiet BEAST 2 opierający się na wnioskowaniu bayesowskim. Badania wykazały, że populacja TBRV jest bardzo zróżnicowana,

a podobieństwo pomiędzy sekwencjami poszczególnych izolatów waha się od 76,9% do 99,8%. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym izolatów, ich pochodzeniem, gospodarzem i pozycją zajmowaną na drzewie filogenetycznym. Wśród analizowanych izolatów stwierdzono obecność rekombinantów, a miejsce przeskoku rekombinacyjnego określono na 475 nukleotyd w sekwencji genu CP. Ponadto, zastosowanie algorytmów: FEL, FUBAR, SLAC i MEME pozwoliło wykryć kodony znajdujące się pod negatywną jak i pozytywną presją selekcyjną. Uzyskane wyniki wskazują, że zarówno zjawisko rekombinacji, jak i pozytywna presja selekcyjna wpływają na dynamikę ewolucji i strukturę populacji wirusa.

Badania zostały wykonane w ramach projektu badawczego Opus 2015/17/B/NZ8/02407 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

**PROPOZYCJE POLSKICH NAZW GATUNKÓW
WIRUSÓW ROŚLIN I WIROIDÓW UZNANYCH PRZEZ
MIĘDZYNARODOWY KOMITET TAKSONOMII
WIRUSÓW (ICTV)**

Marek S. Szyndel, Selim Kryczyński

*Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Ogrodnictwa,
Biotechnologii i Architektury Krajobrazu,
Samodzielny Zakład Fitopatologii, ul Nowoursynowska 159, 02- 776 Warszawa*

Zgodnie z sugestiami Polskiego Towarzystwa Fitopatologicznego opracowano i wydano w Zeszytach Problemowych Postępów Nauk Rolniczych (zeszyty nr 591-594) propozycje polskich nazw gatunków wirusów roślin, wiroidów oraz grzybów. Zestaw czterech prac pod wspólnym tytułem "Wirusy roślin w aktualnym (2017) układzie taksonomicznym ICTV z propozycjami polskich nazw gatunków" obejmował w części 1. Wirusy o genomie w postaci DNA, w części 2. Wirusy o genomie w postaci dsRNA, ssRNA o antysensownej (-) lub ambisensownej (+/-) orientacji oraz nietypowe wirusy o genomie w postaci (+)ssRNA i wiroidy, w części 3. Wirusy o izometrycznych wirionach oraz genomie (+)ssRNA a w części 4. Wirusy o nitkowatych lub pałeczkowatych wirionach i genomie (+)ssRNA. W sumie zaproponowano 1435 polskich nazw. W pracach znajdują się również komentarze dotyczące zmian w zasadach klasyfikacji i nazewnictwa wirusów oraz bardzo krótkie charakterystyki głównych taksonów. Ponieważ corocznie opisywane i klasyfikowane są nowe wirusy oraz modyfikowane ich nazwy, dlatego kolejne propozycje polskich nazw gatunków zostaną przygotowane.