Received: 15.10.2021 / Accepted: 24.11.2021

ARTYKUŁ ORYGINALNY

Supresja wyciszania ekspresji genów u *Nicotiana benthamiana* nasila patogeniczność wirusa nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV)

Suppression of post-transcriptional gene silencing intensifies pathogenicity of tomato torrado virus (ToTV) in *Nicotiana benthamiana*

Przemysław Wieczorek*

Streszczenie

Wirus nekrozy pomidora – ToTV (tomato torrado virus) poraża *Solanum lycopersicum* wywołując na roślinach nekrozy, co doprowadza do istotnych strat w produkcji pomidorów. Supresory wyciszania ekspresji genów (ang. post-transcriptional gene silencing – PTGS), hamując odpowiedź obronną rośliny, mają wpływ na patogeniczność wielu wirusów roślin. Aktualnie nie scharakteryzowano silnego supresora PTGS kodowanego przez przedstawicieli rodzaju *Torradovirus*. Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu obecności supresora PTGS na patogeniczność ToTV podczas porażenia *Nicotiana benthamiana*. Do tego celu wykorzystano rośliny *N. benthamiana* linii p19syn z nadekspresją genu p19_{TBSV} – silnego supresora PTGS kodowanego przez wirusa TBSV (tomato bushy stunt virus), które następnie inokulowano ToTV-Kra. Jednocześnie przygotowano zmodyfikowany wariant ToTV-Kra-p19 z wprowadzoną sekwencją p19_{TBSV}, którym inokulowano typ dziki *N. benthamiana*. W efekcie porażenia roślin p19syn wirusem ToTV-Kra zaobserwowano silne zaostrzenie objawów choroby (towarzyszył temu wzrost akumulacji RNA wirusa). Jednocześnie w *N. benthamiana* wariant ToTV-Kra-p19 wywoływał silniejsze objawy choroby niż te, które towarzyszą infekcji typem dzikim wirusa. Wyniki te wskazują, że w obecności p19_{TBSV} i w efekcie supresji</sub> PTGS, dochodzi do wzrostu replikacji i zaostrzenia patogeniczności ToTV w *N. benthamiana*. Z drugiej strony wskazano, że ToTV nie wymaga obecności silnego supresora wyciszania PTGS w trakcie infekcji oraz porażenia rośliny.

Słowa kluczowe: wirus nekrozy pomidora, patogeniczność, potranskrypcyjne wyciszanie ekspresji genów, supresor wyciszania

Abstract

Tomato torrado virus (ToTV) is a whitefly-transmitted emerging pathogen infecting *Solanum lycopersicum* and inducing severe necrosis. To date, it was taken for granted that all plant viruses encode suppressors of silencing – proteins that promote disease symptoms in virus-infected plants. The main feature of silencing suppressors is to counteract plant defence mechanisms during infection. Interestingly, such a protein was not described so far for any known members from *Torradovirus* genus. In this study, we asked how ToTV infection would develop in a presence of a heterologusly expressed strong suppressor of silencing. For this, two experimental approaches were chosen. On one hand, ToTV accumulation was tested in *Nicotiana benthmaniana* plants stably expressing $p19_{TBSV}$ gene was introduced into ToTV genome to produce a recombined ToTV-Kra-p19 and its accumulation was assessed in the wild type *N. benthamiana*. We observed that ToTV induced more severe disease symptoms in *N. benthamiana* in a presence of the $p19_{TBSV}$ what was accompanied by a significantly higher accumulation of viral genomic RNAs. This indicates that the $p19_{TBSV}$ boosts ToTV pathogenicity. On the other hand, it points that the ToTV infectivity does not rely strictly on a presence of a strong silencing suppressor.

Key words: tomato torrado virus, pathogenicity, post-transcriptional gene silencing, silencing suppressor

Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

^{*}corresponding author: p.wieczorek@iorpib.poznan.pl

ORCID: 0000-0002-3306-9763

Wstęp / Introduction

Wirus nekrozy pomidora - ToTV (tomato torrado virus), będący typowym przedstawicielem rodzaju Torradovirus, poraża Solanum lycopersicum wywołując na pomidorze nekrozy liści, pędu i owoców (fot. 1). Tak silne objawy choroby doprowadzają do istotnych strat w produkcji pomidorów na plantacjach porażonych przez ToTV. W Polsce ToTV zidentyfikowano w latach 2003-2004 (Pospieszny 2005; Pospieszny i wsp. 2007), a w 2008 roku scharakteryzowano sekwencję jego genomu (Budziszewska i wsp. 2008). Genom ToTV jest dwudzielny, a w jego skład wchodzą dwie poliadenylowane cząstki jednoniciowego RNA o dodatniej polarności. RNA1 (7814 nukleotydów) koduje poliproteinę, w obrębie której zidentyfikowano domeny: 11K, ProCo (kofaktor proteazy), Hel (helikaza), Prot (proteaza) oraz RdRP (replikaza, wirusowa polimeraza RNA zależna od RNA). W obrębie RNA2 (5390 nukleotydów) zlokalizowane są dwie otwarte ramki odczytu: ORF1-koduje białko o nieznanej funkcji u ToTV oraz ORF2 - koduje białko 3A związane z transportem wirusa oraz trzy podjednostki białka płaszcza ToTV: Vp35, Vp26 oraz Vp23 (rys. 1) (Budziszewska i wsp. 2008). ToTV infekuje także Nicotiana benthamiana - roślinę modelową w badaniach interakcji patogen-gospodarz (Bally i wsp. 2018). Zjadliwość wielu wirusów roślin determinowana jest przez kodowane przez nie determinanty patogeniczności, w tym także przez supresory wyciszania ekspresji genów (ang. post-transcriptional gene silencing -PTGS) - najczęściej białka wirusa, które hamują odpowiedź obronną rośliny na atak patogenu (Wieczorek i Obrępalska--Steplowska 2015). Do tej pory opisano kilka determinant patogeniczności ToTV (Wieczorek i Obrępalska-Stęplowska 2016a, 2016b; Wieczorek i wsp. 2019), jednak nadal nie scharakteryzowano silnego supresora PTGS kodowanego u wirusów z rodzaju Torradovirus. Z uwagi na wysoką



- Rys. 1. Schemat RNA1 i RNA2 wirusa nekrozy pomidora (To-TV-Kra) oraz rekombinowanego RNA2-Kra-p19 z wprowadzoną sekwencją białka p19 wirusa krzaczastej karłowatości pomidora (TBSV). 11K – domena 11K, Prot-Co – kofaktor proteazy, Hel – helikaza, Prot – proteaza, RdRP – zależna od RNA polimeraza RNA, 3A – białko transportowe, Vp – trzy podjednostki białka płaszcza
- Fig. 1. Schematic representation of tomato torrado virus genome. The recombined RNA2-Kra-p19 with additional coding sequence of p19 from TBSV was indicated. 11K – 11K domain, ProtCo – protease cofactor, Hel – helicase, Prot – protease, RdRP – RNA-dependent RNA polymerase, 3A-protein involved in movement, Vp – three coat protein subunits

zjadliwość torradowirusów, ich wydajną transmisję przez mączliki (Verbeek i wsp. 2014) oraz szeroki zakres gospodarzy, istotnym w tym kontekście jest prowadzenie badań nad biologią molekularną ToTV w relacji wirus–gospodarz. Tym bardziej, że obecność znanych torradowirusów opisywana jest w nowych lokalizacjach na świecie (Moodley i wsp. 2020), jak również stale identyfikowane są w roślinach nowe patogeny potencjalnie należące do rodzaju *Torradovirus* (Belete i wsp. 2021). Aktualnie jednym z wyzwań wirusologii molekularnej jest określenie udziału wczesnych





Photo 1. Solanum lycopersicum (A) and Nicotiana benthamiana (B) infected by tomato torrado virus (ToTV-Kra)

mechanizmów obronnych rośliny (w tym PTGS) w odpowiedzi na obecność wirusów zasiedlających floem, w tym także ToTV.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu supresji PTGS na patogeniczność wirusa nekrozy pomidora podczas porażenia *N. benthamiana*.

Materialy i metody / Materials and methods

Materiał roślinny i źródło wirusa / Plant material and virus source

Do doświadczeń wykorzystano rośliny typu dzikiego (wt) *N. benthamiana* oraz linii p19syn (Kontra i wsp. 2016) z konstytutywną ekspresją genu p19_{TBSV} Sześciotygodniowe siewki *N. benthamiana* porażano metodą agroinfiltracji wykorzystując klony agroinfekcyjne izolatu Kra ToTV (Wieczorek i wsp. 2014) oraz po pięć roślin z każdej grupy eksperymentalnej (n = 5). Rośliny utrzymywano w warunkach szklarniowych, a lustrację objawów rozpoczęto 7. dnia od infiltracji. Doświadczenia przeprowadzono dwukrotnie.

Przygotowanie rekombinowanych klonów infekcyjnych / Engineering of recombined infectious clones

Sekwencję p19_{TBSV} wprowadzono do RNA2 ToTV-Kra wykorzystując do tego jako matrycę klon pJL89-Kra2-GFP (Wieczorek i wsp. 2020), w którym otwartą ramkę odczytu kodującą białko zielonej fluorescencji (GFP – green fluorescent protein) podstawiono sekwencją genu supresora z TBSV. W tym celu sekwencję p19_{TBSV} amplifikowano metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR – polymerase chain reaction) w obecności: buforu CloneAmpTM HiFi PCR Premix (1×) (Clontech), starterów P19_TBSV_fw/ P19_TBSV_rv (0,5 µM) (tab. 1) oraz wektora pBIN61p19 (10 ng) (Voinnet i wsp. 2003). Mieszaninę reakcyjną (20 µl) inkubowano w 98°C przez 10 sekund, a następnie prowadzono 25 cykli: 98°C przez 10 sekund, 55°C przez 30 sekund oraz 72°C przez 15 sekund. Po 5 minutach inkubacji w 72°C produkty PCR rozdzielano w 1% żelu agarozowym, oczyszczano i wykorzystywano do klonowania według protokołu opisanego poprzednio (Wieczorek i wsp. 2020). Tak uzyskany rekombinowany klon pJL89-Kra2-p19 został wykorzystany do transformacji *Agrobacterium tumefaciens* (szczep GV3101), a następnie do agroinfiltracji *N. benthamiana*.

Pomiar poziomu akumulacji RNA ToTV / Assessment of virus RNA accummulation

Poziom akumulacji RNA1 i RNA2 ToTV-Kra w *N. benthamiana* linii p19syn oznaczano metodą northern blot wykorzystując sondę DNA wyznakowaną radioaktywnie (³²P) hybrydyzującą do sekwencji 3'UTR obu RNA ToTV. W tym celu całkowity RNA izolowano z pojedynczych roślin w obecności kwaśnego fenolu (pH 4,0) i wytrącano etanolem. Uzyskany osad RNA osuszano i zawieszano w wodzie wolnej od RNaz, a następnie 1 µg całkowitego RNA frakcjonowano w warunkach denaturujących w 1,2% żelu agarozowym z formaldehydem. Następnie RNA przenoszono z żelu na filtr nitrocelulozowy, utrwalano w świetle UV i inkubowano z sondą radioaktywną w buforze do hybrydyzacji w temperaturze 65°C przez noc. Sygnał aktywności izotopów na filtrze oznaczano za pomocą systemu PharosFXTM (Bio-Rad).

Poziom akumulacji RNA1 i RNA2 w typie dzikim *N. benthamiana* infekowanym ToTV-Kra-p19 oznaczano metodą ilościowego PCR (RT-qPCR). W tym celu 1 µg RNA przepisywano na cDNA w obecności losowych heksametrów (100 ng) oraz odwrotnej transkryptazy RevertAid Reverse Transcriptase (200U) (Thermo Scientific) według protokołu producenta. Następnie cDNA rozcieńczano wodą w stosunku 1 : 1 i wykorzystano do reakcji RT-qPCR, w skład której wchodziły: bufor iTaq Universal SYBR Green Supermix (1×) (Bio-Rad), mieszanina starterów specyficznych dla RNA1 lub RNA2 (0,5 µM) (tab. 1) oraz 2 µl cDNA. Mieszaninę reakcyjną (20 µl) inkubowano w 95°C przez 3 minuty, a następnie prowadzono 40 cykli: 95°C

Tabela 1. Startery wykorzystane do klonowania sekwencji p19_{TBSV} oraz reakcji ilościowego RT-qPCR **Table 1.** Primers used for p19_{TBSV} cloning and quantitaive RT-qPCR

Starter ID Primer ID	Sekwencje starterów $(5' \rightarrow 3')$ Primers' sequences $(5' \rightarrow 3')$
P19_TBSV_fw	CGTCAACGAGCTTTGCGACCATGGAACGAGCTATACAAG
P19_TBSV_rv	TGCTCTTTCGCTACGCGTTCCTCGCTTTCTTTTCGAAG
ddRNA1_RdRP_BT_F	GGAAAAGGTTTTTGGGAAGC
ddRNA1_RdRP_BT_R	CATCAGACTGGCGGAAAAAT
ddRNA2_Vp35_BT_F	TGCTGAGGTGCTATCACTGG
ddRNA2_Vp35_BT_R	ACCCATGCCGGAAATATACA
NbEFa_F	AGCTTTACCTCCCAAGTCATC
NbEF1a_R	AGAACGCCTGTCAATCTTGG

przez 15 sekund i 60°C przez 45 sekund w aparacie Light -Cycler[®] 480 (Roche). Specyficzność amplifikacji produktów RT-qPCR oceniano na podstawie krzywych topnienia wygenerowanych w zakresie temperatury 65–98°C. Poziom akumulacji RNA1/RNA2 ToTV normalizowano względem genu referencyjnego *NbEF1α* (tab. 1).

Wyniki i dyskusja / Results and discussion

ToTV-Kra wydajnie poraża N. benthamiana, a objawem infekcji sa wtedy charakterystyczne łyżkokształtne zniekształcenia blaszek szczytowych liści (fot. 1). Z czasem objawy choroby łagodnieją, a rośliny infekowane ToTV-Kra morfologicznie przypominają rośliny nieinfekowane. Ozdrowienie roślin po infekcji wirusowej (tzw. recovery phenotype) sugeruje, że patogen nie przełamuje wydajnie odpowiedzi obronnej rośliny. Wyniki prac Szittya i wsp. (2002) pokazują, że zjawisko ozdrowienia N. benthamiana w infekcji zjadliwego szczepu wirusa pierścieniowej plamistości cymbidium (CymRSV - cymbidium ringspot virus) można było uzyskać w roślinach poprzez mutację w genie białka p19 wirusa, które jest silnym supresorem PTGS. Obserwowane ozdrowienie N. benthamiana w infekcji ToTV mogłoby sugerować, że ToTV nie koduje silnego supresora wyciszania. Mimo to, wirus ToTV wydajnie poraża zarówno S. lycopersicum oraz N. benthamiana. Zatem, jeśli

ToTV-Kra nie koduje supresora wyciszania i nie hamuje PTGS, to objawy infekcji ToTV w obecności supresora byłyby istotnie silniejsze. W celu weryfikacji tej hipotezy przeprowadzono doświadczenia, w których patogeniczność ToTV monitorowano w obecności białka p19_{TBSV}. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały gwałtowny przebieg choroby we wszystkich testowanych roślinach (n = 5) N. benthamiana linii p19syn w trakcie porażenia wirusem (fot. 2) w porównaniu do kontroli (mock), wszystkie rośliny traktowane wirusem charakteryzowały się istotnie niższym pokrojem pędu (o około 40%) i silnym zniekształceniem blaszek liści. Tak ostremu przebiegowi choroby towarzyszył istotny wzrost akumulacji RNA1 i RNA2 wirusa (fot. 3). Zatem aktywność supresora wyciszania promowała akumulację materiału genetycznego ToTV i w efekcie produktów ekspresji jego RNA.

Jednocześnie chcąc potwierdzić obserwację, że w obecności p19_{TBSV} przebieg choroby wywołanej przez ToTV-Kra w tytoniu jest bardziej agresywny i związany ze wzrostem akumulacji RNA wirusa, *N. benthamiana* porażano rekombinowanym wariantem tego patogenu, ToTV-Kra-p19, z sekwencją genu p19_{TBSV} wprowadzoną do RNA2 ToTV-Kra. Na każdej z analizowanych roślin (n = 5) wariant ToTV-Kra-p19 wywoływał zdecydowanie silniejsze objawy choroby podczas infekcji na *N. benthamiana* (skarłowacenie pędu, nekrozy liści) niż typ dziki wirusa (fot. 4). Ponadto, w obecności p19_{TBSV}, zaobserwowano istotnie wyższy



Fot. 2. Objawy choroby na *Nicotiana benthamiana* (typ dziki i linia p19syn) porażonych przez wirusa nekrozy pomidora, ToTV-Kra. MOCK – rośliny kontrolne

Photo 2. Nicotiana benthamiana plants (wild type and p19syn line) infected by tomato torrado virus, ToTV-Kra. MOCK - control plants



- Fot. 3. Pomiar akumulacji RNA1 i RNA2 wirusa nekrozy pomidora (ToTV-Kra) w Nicotiana benthamiana (typ dziki – wt, linia p19syn – p19syn) 10 dni po infiltracji. rRNA – kontrola wewnętrzna ilości RNA
- Photo 3. Accumulation of RNA1 and RNA2 of tomato torrado virus in *Nicotiana benthamiana* wild-type (wt) and p19syn line (p19syn) 10 days after infiltration. rRNA – the RNA loading control



- Rys. 2. Poziom względnej akumulacji RNA1 i RNA2 wirusa nekrozy pomidora (ToTV-Kra) oraz wariantu ToTV-Krap19 w Nicotiana benthamiana. Normalizację przeprowadzono względem poziomu transkryptu NbEF1α
- Fig. 2. Accumulation of RNA1 and RNA2 of tomato torrado virus in *Nicotiana benthamiana* infected either by ToTV-Kra, or its engineered variant, ToTV-Kra-p19. Normalization was done against the *NbEF1α*

(w porównaniu z ToTV-Kra) poziom akumulacji RNA1 i RNA2 patogenu w porażonych roślinach *N. benthamiana* (rys. 2). Tak wyraźne różnice w patogeniczności ToTV-Kra oraz ToTV-Kra-p19 sugerują, że ToTV hamuje PTGS z niską wydajnością. Pomimo tego, wirus zachowuje zdolność do porażania roślin, co w efekcie doprowadza do istotnych strat w uprawie pomidora.

ToTV jest wirusem zasiedlającym wiązki przewodzące porażonych roślin. W mikroskopie elektronowym ToTV identyfikowany był w formie sferycznych cząstek tworzą-



Fot. 4. Objawy porażenia *Nicotiana benthamiana* wirusem nekrozy pomidora (ToTV-Kra) oraz jego wariantem ToTV-Kra-p19. Zdjęcia wykonano 20 dni po infiltracji. MOCK – rośliny kontrolne

Photo 4. *Nicotiana benthamiana* infected by wild-type tomato torrado virus (ToTV-Kra) and its engineered variant, ToTV-Kra-p19. The pictures were taken 20 days after infiltration. MOCK – control plants

cych struktury parakrystaliczne (Alfaro-Fernández i wsp. 2010; Zielińska i wsp. 2012) i zlokalizowanych, przede wszystkim w wiązkach przewodzących (w mniejszym zakresie w komórkach miękiszu) porażonych roślin. W takiej formie (wiriony) materiał genetyczny wirusa (RNA) jest niedostępny dla PTGS. W tym przypadku brak silnego supresora wyciszania u ToTV jest zrozumiały, a akumulacja i ekspresja materiału genetycznego wirusa utrzymywana jest na optymalnym poziomie zapewniającym replikację genomu wirusa, skutkującą odtworzeniem infekcyjnych wirionów, które są przenoszone przez mączliki na rośliny, doprowadzając do ich porażenia przez ToTV.

Wnioski / Conclusions

Przeprowadzone prace wskazują, że w obecności silnego supresora wyciszania (p 19_{TBSV}) przebieg infekcji wywołanej przez ToTV-Kra w *N. benthamiana* jest gwałtowny, czemu towarzyszy wzrost akumulacji RNA1 oraz RNA2 wirusa. Tak silny przebieg choroby nie jest obserwowany na rośli-

nach infekowanych ToTV-Kra bez p19_{TBSV}. Sugeruje to, że do wydajnego porażenia roślin ToTV nie wymaga obecności silnego supresora PTGS.

Podziękowanie / Acknowledgements

Autor pragnie podziękować dr hab. Aleksandrze Obrępalskiej-Stęplowskiej za cenne uwagi merytoryczne uzyskane podczas przygotowywania niniejszej publikacji, dr Marcie Budziszewskiej za udostępnienie zdjęć roślin porażonych przez ToTV-Kra oraz mgr. Patrykowi Frąckowiakowi za wsparcie metodyczne podczas opracowywania wyników analiz ilościowych RT-qPCR.

Finansowanie / Funding

Praca sfinansowana przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu nr 2016/21/D/NZ9/02478.

Literatura / References

- Alfaro-Fernández A., Medina V., Córdoba-Sellés M.C., Font M.I., Jornet J., Cebrián M.C., Jordá C. 2010. Ultrastructural aspects of tomato leaves infected by *Tomato torrado virus* (ToTV) and co-infected by other viruses. Plant Pathology 59 (2): 231–239. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2009.02215.x
- Bally J., Jung H., Mortimer C., Naim F., Philips J.G., Hellens R., Bombarely A., Goodin M.M., Waterhouse P.M. 2018. The rise and rise of *Nicotiana benthamiana*: a plant for all reasons. Annual Review of Phytopathology 56: 405–426. DOI: 10.1146/ annurev-phyto-080417-050141
- Belete M.T., Gudeta W.F., Kim S.E., Igori D., Moon J.S. 2021. Complete genome sequence of Codonopsis torradovirus A, a novel torradovirus infecting *Codonopsis lanceolata* in South Korea. Archives of Virology 166 (12): 3473–3476. DOI: 10.1007/ s00705-021-05244-2
- Budziszewska M., Obrepalska-Steplowska A., Wieczorek P., Pospieszny H. 2008. The nucleotide sequence of a Polish isolate of Tomato torrado virus. Virus Genes 37 (3): 400–406. DOI: 10.1007/s11262-008-0284-3
- Kontra L., Csorba T., Tavazza M., Lucioli A., Tavazza R., Moxon S., Tisza V., Medzihradszky A., Turina M., Burgyán J. 2016. Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants. PLoS Pathogens 12 (10): e1005935. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005935
- Moodley V., Gubba A., Mafongoya P.L. 2020. Emergence and full genome analysis of *Tomato torrado virus* in South Africa. Viruses 12 (10): 1167. DOI: 10.3390/v12101167
- Pospieszny H. 2005. Preliminary study on the spherical virus transmitted by greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*). s. 30. 2nd Joint Conference of the International Working Groups on Legume (IWGLV) and Vegetable Viruses (IWGVV). Fort Lauderdale, Florida, USA, April 10–14, 2005, University of Florida, 50 ss.
- Pospieszny H., Borodynko N., Obrępalska-Stęplowska A., Hasiów B. 2007. The first report of *Tomato torrado virus* in Poland. Plant Disease 91 (10): 1364. DOI: 10.1094/PDIS-91-10-1364A
- Szittya G., Molnár A., Silhavy D., Hornyik C., Burgyán J. 2002. Short defective interfering RNAs of tombusviruses are not targeted but trigger post-transcriptional gene silencing against their helper virus. Plant Cell 14 (2): 359–372. DOI: 10.1105/tpc.010366
- Verbeek M., van Bekkum P.J., Dullemans A.M., van der Vlugt R.A. 2014. Torradoviruses are transmitted in a semi-persistent and stylet-borne manner by three whitefly vectors. Virus Research 186: 55–60. DOI: 10.1016/j.virusres.2013.12.003
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. The Plant Journal 33 (5): 949–956. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2003.01676.x
- Wieczorek P., Budziszewska M., Frąckowiak P., Obrępalska-Stęplowska A. 2020. Development of a new tomato torrado virusbased vector tagged with GFP for monitoring virus movement in plants. Viruses 12 (10): 1195. DOI: 10.3390/v12101195
- Wieczorek P., Budziszewska M., Obrępalska-Stęplowska A. 2014. Construction of infectious clones of tomato torrado virus and their delivery by agroinfiltration. Archives of Virology 160 (2): 517–521. DOI: 10.1007/s00705-014-2266-1
- Wieczorek P., Obrępalska-Stęplowska A. 2015. Suppress to survive-implication of plant viruses in PTGS. Plant Molecular Biology Reporter 33 (3): 335–346. DOI: 10.1007/s11105-014-0755-8

- Wieczorek P., Obrępalska-Stęplowska A. 2016a. A single amino acid substitution in movement protein of tomato torrado virus influences ToTV infectivity in *Solanum lycopersicum*. Virus Research 213: 32–36. DOI: 10.1016/j.virusres.2015.11.008
- Wieczorek P., Obrępalska-Stęplowska A. 2016b. The N-terminal fragment of the tomato torrado virus RNA1-encoded polyprotein induces a hypersensitive response (HR)-like reaction in *Nicotiana benthamiana*. Archives of Virology 161 (7): 1849–1858. DOI: 10.1007/s00705-016-2841-8
- Wieczorek P., Wrzesińska B., Frąckowiak P., Przybylska A., Obrępalska-Stęplowska A. 2019. Contribution of tomato torrado virus Vp26 coat protein subunit to systemic necrosis induction and virus infectivity in *Solanum lycopersicum*. Virology Journal 16 (1): 1–4. DOI: 10.1186/s12985-019-1117-9
- Zielińska L., Byczyk J., Rymelska N., Borodynko N., Pospieszny H., Hasiów-Jaroszewska B. 2012. Cytopathology of *Tomato tor-rado virus* infection in tomato and *Nicotiana benthamiana*. Journal of Phytopathology 160 (11–12): 685–689. DOI: 10.1111/jph.12013