

BADANIE RÓŻNIC W AKUMULACJI IZOLATÓW KRA I WAL'03 WIRUSA NEKROZY POMIDORA W ROŚLINIE GOSPODARZA

MARTA BUDZISZEWSKA, PRZEMYSŁAW WIECZOREK,
ALEKSANDRA OBREPALSKA-STEPLOWSKA

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Międzyzakładowa Pracownia Biologii Molekularnej
Władysława Węgorka 20, 60-318 Poznań
m.budziszewska@iorpib.poznan.pl

I. WSTĘP

Wirus nekrozy pomidora (*Tomato torrado virus*, ToTV) jest bardzo groźnym patogenem roślin z rodziny psiankowatych. Symptomy choroby przejawiają się początkowo lokalnymi nekrozami liści i owoców, następnie obejmują całe pędy roślin, doprowadzając do jej obumierania (Verbeek 2007; Pospieszny i wsp. 2009).

W Polsce, w ciągu ostatnich siedmiu lat zidentyfikowano trzy izolaty (Wal'03, Kra i Ros) różniące się stopniem agresywności. Najbardziej skrajne wydają się dwa spośród nich: izolat Kra i Wal'03 (Pospieszny i wsp. 2009). Obserwacje symptomów wskazują, iż izolat Kra wywołuje znacznie silniejsze nekrozy w porównaniu do izolatu Wal'03.

Celem badań było sprawdzenie, czy różnice w porażeniu wynikają z różnej akumulacji obu izolatów w tkance rośliny, na przykładzie dwóch gospodarzy: *Solanum lycopersicum* oraz *Nicotiana benthamiana*.

II. MATERIAŁ I METODY

Izolaty wirusa

Materiał do badań stanowiły rośliny pomidora oraz tytoniu porażone odpowiednio izolatami Kra i Wal'03 wirusa nekrozy pomidora, ToTV.

Izolacja całkowitego RNA

Materiał roślinny homogenizowano z dodatkiem TRI-reagent, wirowano w temperaturze 4°C, a następnie prowadzono ekstrakcję z użyciem chloroformu. Totalne RNA wytrącano w 2-propanolu, wirowano, osad suszono i zawieszano w 30 µl wody wolnej od RNaz.

Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z użyciem zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems), starterów przypadkowych (metoda random hexamer priming), stosując się do zaleceń producenta. Matrycę stanowiło totalne RNA wyizolowane z chorych roślin tytoniu i pomidora.

Real-time PCR (polymerase chain reaction)

Reakcję real-time PCR prowadzono z użyciem zestawu Dynamo SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes) ze starterami specyficznymi dla poliproteiny RNA2 ToTV (qR2Tof AAAGTTCGCAGTGAGCTAG, qR2Tor GAATGAGGTGGATGGTATTTTC) oraz dla genu referencyjnego beta-aktyny u tytoniu (startery zaprojektowano w oparciu o sekwencje zdeponowane w bazie banku genów NCBI), matryce stanowiło uprzednio zsintetyzowane cDNA. Produkty reakcji analizowano w żelu agarozowym z barwnikiem Midori Green DNA Stain (Nippon).

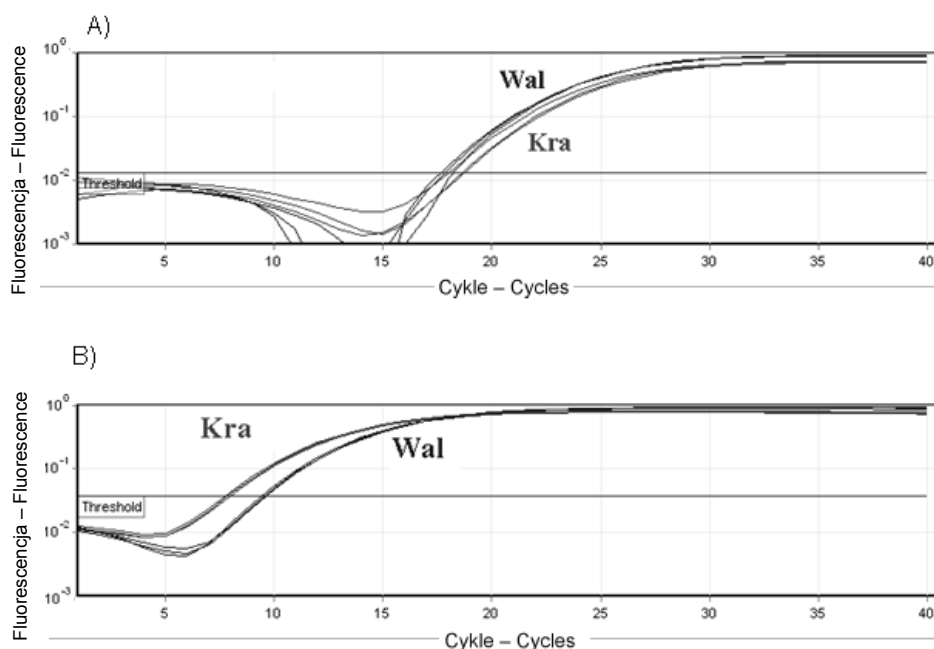
U tytoniu wyznaczono ekspresję względem genu referencyjnego z użyciem aplikacji REST (Qiagen), natomiast w przypadku pomidora przygotowano krzywą standardową na podstawie dziesiętnych rozcieńczeń wirusa ToTV (10^{-3} – 10^{-9}) wyznaczając liczbę jego kopii.

III. WYNIKI I DYSKUSJA

W roślinach tytoniu określono różnice w akumulacji szczepów ToTV poprzez zbadanie poziomu ekspresji genu poliproteiny wirusa względem genu referencyjnego beta-aktyny (rys. 1). Analiza wykazała 4-krotnie wyższą ekspresję izolatu Kra niż izolatu Wal'03 (tab. 1).

Tabela 1. Wartości Ct (wartość cyklu progowego) uzyskane z użyciem starterów specyficznych dla fragmentu poliproteiny RNA2 oraz względna ekspresja badanych izolatów ToTV
Table 1. Ct values (threshold cycle) obtained using specific primers, complementary to polypeptide 2 of ToTV, and relative expression of analyzed isolates

Liczba powtórzeń Number of replications	Izolat ToTV Isolate of ToTV	Wartości Ct Ct values	Ekspresja względna; wynik uśredniony (u tytoniu) Relative expression; average score (in tobacco)
1	Kra	7,73	4,724
2		7,97	
3		7,86	
1	Wal'03	9,61	1
2		9,42	
3		9,56	



Rys. 1. Krzywe amplifikacji uzyskane w reakcji real-time PCR u tytoniu porażonego ToTV Kra i Wal'03. A – krzywa amplifikacji dla genu referencyjnego beta-aktyny; B – krzywe uzyskane z użyciem starterów specyficznych dla ToTV

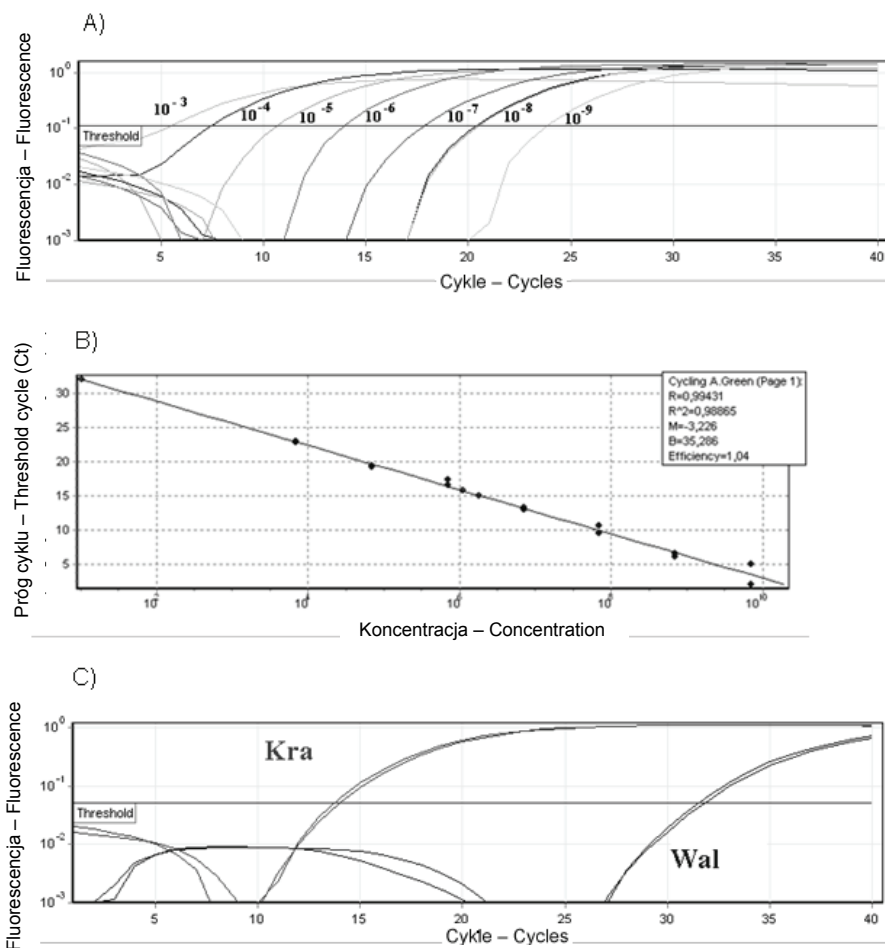
Fig. 1. Amplification plots of the real-time PCR reaction in tobacco plant tissue inoculated with ToTV Kra and Wal'03 isolates. A – Amplification plots for the reference gene beta-actin; B – amplification plots obtained using specific ToTV primers

W przypadku roślin pomidora oszacowano ekspresję absolutną wskazującą liczbę kopii poszczególnych izolatów wirusa (rys. 2). Za pomocą krzywej standardowej wykazano, że w roślinie pomidora liczba kopii dla izolatu Kra jest około 10 000-krotnie wyższa od liczby kopii izolatu Wal'03 (tab. 2).

Tabela 2. Wartości Ct dla badanych izolatów Kra i Wal'03, uzyskane w reakcji z wykorzystaniem starterów specyficznych dla ToTV oraz ekspresja absolutna, wyznaczona za pomocą krzywej standardowej

Table 2. Ct values obtained using specific ToTV primers and the values of absolute expression estimated on the basis of the standard curve

Izolat ToTV ToTV isolate	Wartości Ct Ct values	Ekspresja absolutna Absolute expression	Kra/Wal'03
Kra	16,64	602 004,9	9765,624
Wal'03	29,51	61,6453	



Rys. 2. Akumulacja izolatów ToTV w roślinie pomidora. A – krzywa amplifikacji malejących rozcieńczeń wirusa ToTV, liczba kopii wirusa (10^{-3} – 10^{-9}); B – krzywa standardowa; C – krzywa amplifikacji dla izolatów Kra i Wal'03 uzyskana w reakcji ze starterami specyficznymi dla fragmentu polipeptyny RNA2

Fig. 2. Accumulation of ToTV isolates in tomato plant tissue. A – amplification plots of decreasing dilutions of ToTV (10^{-3} – 10^{-9} cDNA copy number per reaction); B – standard curve; C – amplification plots for Kra and Wal'03 isolates obtained using specific ToTV primers

W wyniku prowadzonych testów na roślinach stwierdzono, że izolat Kra charakteryzuje się większym stopniem infekcyjności niż izolat Wal'03. Z przeprowadzonego porównania analizy poziomu akumulacji cząstek wirusa wynika, że w przypadku obydwu gospodarzy izolat Kra występuje w roślinie, w znacznie większym stężeniu w porównaniu do Wal'03, co świadczy o większej wydajności jego replikacji, a tym samym wyższej agresywności. Większa agresywność izolatu Kra wynika zapewne z sekwencji jego genomu, gdzie w porównaniu do izolatu Wal'03 wskazać można kilka zmian nukleoty-

dowych. W literaturze nie ma żadnych danych dotyczących analizy funkcjonalnej tego wirusa, dlatego też wskazanie i poznanie determinant agresywności polskich izolatów wirusa ToTV będzie przedmiotem dalszych badań.

IV. WNIOSKI

1. Obserwacja symptomów wskazuje, iż izolat Kra charakteryzuje się większą agresywnością.
2. W przypadku obydwu gospodarzy izolat Kra występuje w roślinie w znacznie większej koncentracji w porównaniu do Wal'03.

V. LITERATURA

- Verbeek M., Dullemans A.M., Van der Heuvel J.F.J.M., Maris P.C., Van der Vlugt R.A.A. 2007. Identification and characterization of tomato torrado virus, a new plant picorna-like virus from tomato. *Arch. Virol.* 152: 881–890.
- Pospieszny H., Budziszewska M., Hasiów-Jaroszewska B., Obrepalska-Stęplowska A., Borodynko N. 2009. Biological and molecular characterization of polish isolates of tomato torrado virus. *J. Phytopathol.* 158 (1): 56–62.

MARTA BUDZISZEWSKA, PRZEMYSŁAW WIECZOREK,
ALEKSANDRA OBREPALSKA-STĘPŁOWSKA

THE STUDY OF THE DIFFERENCES IN ACCUMULATION OF KRA AND WAL'03 ISOLATES OF TOMATO TORRADO VIRUS IN HOST PLANT

SUMMARY

Tomato torrado virus, ToTV, is a serious pathogen of tomato causing strong necrosis on leaves and fruits, and of whole plants, leading to permanent wilting, being a cause of crops reduction. In Poland, three isolates of the ToTV were identified so far: Wal'03, Kra and Ros differing in their pathogenicity, showing that Kra and Wal'03 are the most extreme. The aim of our work was to determine whether a degree of the aggressiveness of the pathogen correlates with virus accumulation in host's cells. Using real-time PCR approach we analyzed the relative and absolute expression of ToTV in *Nicotiana benthamiana* and *Solanum lycopersicum* plants. Analysis based on the standard curve method showed that the copy number of Kra is almost 10 000-fold higher than Wal'03 isolate in tomato tissue, whereas in tobacco, the results were normalized to reference gene: β -actin, indicating 4-fold higher concentration of Kra in relation to Wal'03. The obtained results showed that Kra isolate was present in plants at a higher concentration that suggests its elevated replication rate responsible for higher aggressiveness.

Key words: ToTV, aggressiveness, real-time PCR