

Wirusy roślinne w znaczący sposób wpływają na ilość i jakość plonów. Ze względu na brak środków chemicznych umożliwiających bezpośrednio ich zwalczanie w roślinach, z punktu widzenia ochrony roślin, istotne jest uzyskiwanie wiedzy dotyczącej ich biologii, zdolności adaptacji do różnych warunków środowiska, różnych roślin żywicielskich czy zajmowania nowych nisz ekologicznych. Jednym z wirusów porażających szeroki zakres roślin, w tym roślin gospodarczo ważnych (tj. pomidor, ziemniak, ogórek, truskawka), ozdobnych (tj. aksamitka, narcyz) oraz drzew, krzewów i krzewinek (tj. robinia akacjowa, winorośl, porzeczka) jest wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*, TBRV). Prowadzone od 1999 roku obserwacje upraw tradycyjnych, pod osłonami oraz drzew i krzewów wskazują na ciągłą obecność tego wirusa w Polsce. W ramach badań prowadzonych w Zakładzie Wirusologii i Bakteriologii, Instytutu Ochrony Roślin-Państwowego Instytutu Badawczego zebrano kolekcję 22 izolatów TBRV, które różnią się patogenicznością i wirulencją oraz pochodzą z różnych roślin żywicielskich. Dodatkowo w przypadku kilku z nich stwierdzono możliwość powstawania małych cząstek RNA (zwanych defektywnymi formami RNA, D-RNA), które pojawiły się w trakcie wielokrotnego pasażowania wirusa w jednym gospodarzu i mogą mieć wpływ na jego właściwości biologiczne, namnażanie oraz gromadzenie wirusa w tkankach roślinnych. Niewiele wiadomo jednak o mechanizmach przebiegu choroby wirusowej, replikacji wirusa, procesów adaptacji do różnych gospodarzy, czynników warunkujących zróżnicowanie poziomu patogeniczności czy wpływu D-RNA na patogenezę.

Ciągły rozwój technik molekularnych umożliwia poznawanie swoistych oddziaływań między wirusem a gospodarzem co jest istotne w kontekście opracowywania nowych strategii ochrony roślin. Jedną z zaawansowanych metod są sztuczne konstrukty, które wprowadzane do roślin za pomocą bakterii z rodzaju *Agrobacterium* umożliwiają odtworzenie infekcyjnego wirusa (tzw. infekcyjne kopie). Ich uzyskanie pozwala na dowolną manipulację genomem wirusa, dzięki czemu mogą być stosowane w wielu badaniach np. w analizie ewolucji, określaniu determinantów zmienności lub badaniu interakcji pomiędzy wektorem, wirusem a rośliną żywicielską.

W związku z tym celem niniejszego projektu jest skonstruowanie infekcyjnych kopii TBRV sprzężonych z białkiem zielonej fluorescencji (ang. green-fluorescence protein, GFP) dla trzech izolatów (z pomidora, cukinii i robinii akacjowej) różniących się zakresem roślin gospodarzy i poziomem patogeniczności, które umożliwią przeprowadzenie szczegółowych badań na temat jego biologii, namnażania w komórkach oraz oddziaływań z gospodarzem. Obserwacja za pomocą mikroskopów fluorescencyjnych (światłowego i konfokalnego) preparatów wykonanych z wybranych gatunków roślin (pomidor, cukinia i tytoń) porażonych infekcyjnymi kopiami wirusa umożliwi lokalizację TBRV w poszczególnych komórki oraz wizualizację przebiegu infekcji dzień po dniu. Co więcej, planowane jest uzyskanie kopii cząsteczki D-RNA, a następnie wybrany zestaw roślin gospodarzy będzie równocześnie inokulowany infekcyjnymi kopiami z GFP, otrzymanymi dla 3 izolatów TBRV (RNA1+RNA2) oraz z dodatkową cząsteczką D-RNA (RNA1+RNA2+D-RNA). Dzięki temu, możliwa będzie analiza wpływu tej cząsteczki na namnażanie się wirusa, ekspresję genów oraz przebieg patogenezę począwszy od momentu infekcji lokalnej w pojedynczym liściu do systemicznego porażenia całej rośliny w zależności od izolatu wirusa i gatunku porażonej rośliny.

Wyniki niniejszego projektu w znaczny sposób poszerzą wiedzę dotyczącą biologii mechanizmów wpływających na zdolność porażania przez TBRV różnych gatunków roślin i roli defektywnych cząstek w patogenezie. Wiedza ta jest niezbędna w opracowywaniu nowych strategii ochrony roślin. Co więcej, realizacja zadań w ramach niniejszego projektu będzie punktem wyjścia do zakrojonych na szeroką skalę badań nad oddziaływaniami pomiędzy wirusem a gospodarzem.