1. Tytuł zadania: **Badania nad regulatorową funkcją cząsteczek miRNA   
   w przebiegu infekcji wirusami ziemniaka PVY i TRV (nr 95)**
2. Kierownik zadania: dr Zhimin Yin, IHAR-PIB, Oddział Młochów

**Cel zadania**:Celem pracy jest zdobycie podstawowej wiedzy na temat, które cząsteczki miRNA mogą być zaangażowane w reakcję roślin tytoniu na zakażenie wirusem PVY. Tytoń jest rośliną modelową i testową. Wyniki badań przyczynią się do postępu wiedzy o roli miRNA w interakcji ziemniak – wirusy ziemniaka.

PVY jest najważniejszym wirusem ziemniaka w Polsce. Badania będą obejmować oznaczenie ilościowe w roślinach tytoniu inokulowanych wirusem PVY, wybranych miRNA tytoniu, związanych z funkcjami rozwojowymi, miRNA i komplementarnych do nich transkryptów genów związanych z odpowiedzią na stres, oznaczenie wirusowego RNA (np. kodującego geny supresorowe wyciszania wirusowego RNA). Ocena ilościowa będzie przeprowadzona przy użyciu techniki RT-qPCR. Nasze badania dostarczą danych eksperymentalnych o wpływie PVY na ekspresję cząsteczek miRNA.

**W 2017 r. realizowano trzy tematy:**

Biologiczna, serologiczna i molekularna charakterystyka tytoniu zakażonego PVY.

**Celem tematu** było potwierdzenie zakażenia roślin tytoniu danymi szczepami wirusa Y ziemniaka.

**Materiały i metody**

Izolaty PVY: PVY 3202, PVY 3303, PVY 3411; odmiana tytoniu (*Nicotiana tabacum*) Samsun. Rośliny tytoniu odmiany Samsun zakażono każdym z trzech izolatów PVY osobno, po 15 roślin. Kontrolą doświadczenia były rośliny tytoniu traktowane sokiem ze zdrowych roślin tytoniu, traktowane sterylizowaną wodą z dodatkiem węglika krzemu. Testy serologiczne przeprowadzono za pomocą testu ELISA. Do testu zastosowano przeciwciała PVY-monocock Bioreba AG, które wykrywają wszystkie szczepy PVY, PVYO i PVYN, oraz przeciwciała swoiste względem PVYO i PVYN. Badano 10 roślin, w dwóch terminach, po 7 i 14 dniach. Biologiczną charakterystykę tytoniu przeprowadzono po 7 i 14 dniach od zakażenia, poprzez obserwację symptomów zakażenia na roślinach tytoniu. W celu potwierdzenia zakażenia roślin danym szczepem wirusa przeprowadzono reakcję multiplex RT- PCR według Lorenzena i in. (2006) i Chikh-Ali i in. (2010). Całkowite RNA izolowano przy użyciu zestawu do izolacji mirVana miRNA z trzech pojedynczych roślin zakażanych trzema izolatami w dwóch terminach po 7 i 14 dniach (3 izolaty x 3 rośliny x 2 terminy x 2 metody, łącznie 36 testów). Odwrotną tranksrypcję przeprowadzono przy użyciu zestawu TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

**Wyniki.** Potwierdzono zakażenie roślin tytoniu dwoma izolatami serotypu N (PVY 3202, PVY 3203) i jednym izolatem serotypu O (PVY 3411) i brak porażenia roślin kontrolnych – traktowanych wodą. Potwierdzono zakażenie roślin danym szczepem wirusa w reakcji multiplex RT- PCR według Lorenzena i in. (2006) i Chikh-Ali i in. (2010), PVY 3202 i PVY 3303 należą do szczepu PVYNTN , izolat PVY 3411 – do szczepu PVYN-Wi. Siedem dni po inokulacji roślin tytoniu różnymi szczepami wirusa Y ziemniaka średnie wartości testu ELISA wskazały na wyższy poziom wirusa w roślinach inokulowanych izolatem szczepu NTN (PVY 3202) niż w roślinach po zakażeniu szczepem Z-NTN (PVY-3303) i N-Wi (PVY-3411). Po 14 dniach od zakażenia najwyższy poziom wirusa wykryto w roślinach zakażonych szczepem N-Wi. Najniższą akumulację wirusowego białka wykryto w roślinach po zakażeniu szczepem Z-NTN. W roślinach tytoniu (*Nicotiana tabacum*) odmiany Samsun izolaty PVY 3202 oraz PVY 3411 powodowały nekrozy nerwów, podczas gdy izolaty PVY 3303 powodował rozjaśnienia nerwów.

**Wnioski.** Potwierdzono obecność trzech szczepów PVY w roślinach tytoniu po 7 i 14 dniach po inokulacji oraz potwierdzono brak cząstek wirusa w roślinach tytoniu – kontrolnych- traktowanych wodą oraz sokiem ze zdrowych roślin tytoniu. Izolat szczepu Z-NTN wywoływał słabsze symptomy w postaci rozjaśnienia nerwów blaszki liściowej, po 14 dniach od inokulacji charakteryzował się najniższym poziomem akumulacji wirusa. Szczep wirusa PVY N-Wi powodował łagodne objawy w postaci nekrotyzacji nerwów a poziom akumulacji wirusa był najwyższy. Szczep NTN wywoływał silne objawy porażenia w postaci nekroz nerwów i średni poziom akumulacji wirusa w roślinie. Liście tytoniu z roślin zakażonych i kontrolnych zebrano 7 i 14 dni po inokulacji do dalszych badań.

**Literatura**

Chikh-Ali M, Maoka T, Natsuaki KT, Natsuaki T, 2010. The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVYNTN-NW by multiplex PCR assay. J Virol Methods. 2010 165(1):15-20.

Lorenzen JH, Piche LM, Gudmestad NC, Meacham T, Shiel P, 2006. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. Plant Dis. 90: 935-940.

**Oznaczenie ilościowe ekspresji PVY-HC-Pro przy użyciu techniki RT-qPCR.**

**Celem tematu** było zbadanie związku pomiędzy poziomem ekspresji PVY-HC-Pro w roślinach tytoniu po zakażeniu różnymi szczepami wirusa Y ziemniaka z poziomem ekspresji miRNA.

**Materiały i metody**

Materiał roślinny uzyskano w opisanym powyżej doświadczeniu. RNA izolowano przy użyciu zestawu do izolacji mirVana, odwrotną tranksrypcję przeprowadzono przy użyciu zestawu TaqManmicroRNAReverseTranscription Kit (Applied Biosystems. Poziom ekspresji HC-Pro PVY RNA oznaczono przy użyciu techniki SYBR Green według Frazier et al. (2010)w termocyklerzeReal-Time PCR System LightCycler 480 (Roche). Poziom ekspresji miRNA i ich genów celowych normalizowano do genu referencyjnego - genu fosfatazy 2, PP2A. W celu wybrania najlepszej pary starterów do testowania ekspresji HC-Pro PVY RNA przetestowano 10 par starterów. Spośród testowanych par starterów wybrano najlepszą parę starterów, którą wykorzystano do badania ekspresji genu HC-Pro PVY RNA w roślinach tytoniu po zakażeniu trzema izolatami wirusa Y [PVYNTN (PVY3202), PVYN-Wi (PVY-3411) and PVYZ-NTN (PVY-3303)] z 5 roślin każdej kombinacji, roślin zakażanych sokiem ze zdrowych roślin tytoniu, traktowanych wodą, zakażanych trzema izolatami, w dwóch terminach testowania – po 7 i 14 dniach po inokulacji (łącznie 50 kombinacji).

**Wyniki i dyskusja.** Poziom ekspresji RNA genu HC-Pro w badanych roślinach tytoniu 7 dni po inokulacji nie różnił się od siebie istotnie. Istotne różnice stwierdzono 14 dni po zakażeniu roślin tytoniu różnymi szczepami wirusa Y. Względny poziom ekspresji po zakażeniu dwoma szczepami wirusa, PVYNTN i PVYN-Wi , wynosił 76.7 i 92.5, odpowiednio i był wyższy od poziomu ekspresji 17,6 w roślinach po zakażeniu izolatem PVYZ-NTN. W większości wirusów funkcjonują tzw. białka supresorowe (Voinnet i in. 1999; Vaucheret i in. 2001). Ich celem jest przeciwdziałanie wyciszaniu wirusowego RNA. Białko HC-Pro (ang. *helper component-proteinase*), jest specyficzne dla wirusów z rodzaju *Potyvirus* i bezpośrednio zaangażowane w różnych stadiach infekcji wirusowej (Shiboleth i in. 2007). Poziom ekspresji RNA genu HC-Pro był związany z poziomem wykrywanego białka płaszcza wirusa w teście ELISA jak również związany z nasilemiem objawów porażenia. Najsilniejsze objawy, najwyższy poziom ekstynkcji w teście ELISA oraz najwyższy poziom ekspresji genu HC-Pro (chociaż statystycznie nieistotnie różny od szczepu NTN) uzyskano o zakażeniu roślin tytoniu izolatem PVY 3411N-Wi.

**Wnioski.** Poziom wirusowego RNA kodującego białko HC-Pro nie różnił się po 7 dniach od inokulacji roślin tytoniu trzema różnymi izolatami wirusa Y ziemniaka. Różnice wykryto po 14 dniach od inokulacji, wyższą ekspresję obserwowano po użyciu dwóch szczepów wirusa Y - NTN i N-Wi, niższą po użyciu szczepu Z-NTN. Różnice pomiędzy dwoma szczepami NTN i N-Wi chociaż nie były statystycznie istotne to szczep N-Wi charakteryzował się większą akumulacją RNA białka HC-Pro od szczepu NTN.

**Literatura.**

Frazier TP, Xie F, Freistaedter A, Burklew CE, Zhang B. 2010. Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (Nicotiana tabacum). Planta. 232:1289-1308.

Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC, 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc Natl Acad Sci U S A. 96: 14147–14152.

Vaucheret H, Béclin C, Fagard M, 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. J. Cell Sci. 114: 3083–3091.

Shiboleth YM, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham SA, Gaba V, Gal-On A. 2007. The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. J Virol. 81(23):13135-48.

**Oznaczenie ilościowe ekspresji wybranych miRNA i transkryptów genów kontrolowanych przez miRNA w tytoniu zakażonym i niezakażonym PVY przy użyciu techniki RT-qPCR. Analiza statystyczna wyników.**

**Celem tematu** było wybranie miRNA oraz genów kontrolowanych przez miRNA, które podlegają ekspresji w tytoniu po zakażeniu różnymi szczepami wirusa Y ziemniaka. Cel został osiągnięty.

**Materiały i metody.** Materiał roślinny i metody opisano w poprzednim zadaniu.

W 2017 r. przetestowano 35 miRNA należące do 16 rodzin: miR168: miR 162, miR 159, miR 160, miR 164, miR 166, miR 172, miR 319, miR 390, miR 396, miR167, miR156, miR479, miR157, Novel-miR9, Novel-miR32. Do badania ekspresji genów celowych izolowano i poddawano odwrotnej transkrypcji RNA z próbek roślinnych, które testowano metodą RT-qPCR w trzech powtórzeniach technicznych. Geny celowe odpowiadające 33 rodzinom miRNA wybrano na podstawie ekspresji odpowiadających miRNA.

**Wyniki.** Nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji miRNA w roślinach tytoniu po zakażeniu trzema szczepami wirusa Y ziemniaka, NTN, N-Wi i Z-NTN. Niektóre miR nie są typowymi członkami i ogólnie ich poziom ekspresji był niski (CT ok. 29-32).

**Wyniki i dyskusja**

Nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji miRNA (16 rodzin miR, 35 członków) w roślinach tytoniu po zakażeniu trzema szczepami wirusa Y ziemniaka, NTN, N-Wi i Z-NTN, wymienionych w Tabeli 4. Ponadto niektóre miR (Tabela 4. II, III) nie są typowymi członkami i ogólnie ich poziom ekspresji jest niski (CT ok. 29-32).

Przetestowano ekspresję 40 transkryptów genów celowych odpowiadających 33 rodzinom miRNA. Spośród testowanych 39 mRNA, u 8 zaobserwowano obniżenie ekspresji genu po infekcji wirusem Y ziemniaka; u trzech genów – wzrost ekspresji; u 9 – brak ekspresji. Dla pozostałych 20 genów nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji po zakażeniu roślin tytoniu wirusem Y ziemniaka. Zmiany poziomu ekspresji genów obserwowano głównie w przypadku dwóch silnych izolatów NTN i N-Wi, natomiast łagodny szczep Z-NTN powodował zmiany 4 genów celowych. Niektóre z genów celowych należących do tej samej rodziny miRNA uległy ekspresji po zakażeniu wirusem, niektóre pozostały bez zmian. Wiele niewykrytych bądź nie zmieniających poziomu ekspresji genów celowych było związanych z odpornością, na przykład miR482, miR390.

W wyniku zakażenia roślin tytoniu wirusem Y ziemniaka zachodzą w roślinie zmiany genów celowych odpowiadających za biogenezę i funkcje miRNA (na przykład AGO1), lub transkrypcję (na przykład TCP3, MYB, HD-ZIPIII etc). Te rodziny genów mogą być związane z silnymi objawami zakażenia powodowanymi przez silne szczepy wirusa Y ziemniaka: NTN i N-Wi.

miRNA to klasa małych RNA, które regulują negatywnie ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Wzrost poziomu miRNA zwykle powoduje obniżenie ekspresji transkryptów mRNA odpowiadających genów celowych. W roślinach zakażonych wirusami często obserwowaliśmy także wzrost ekspresji miRNA i ich genów celowych. W tym przypadku na funkcjonowanie miRNA może wpływać wirusowy supresor, na przykład HC-Pro. W niektórych przypadkach nie obserwowaliśmy zmian w poziomie transkryptów celowych – może to być spowodowane większą liczbą celowych transkryptów dla tych samych miRNA, z których niektóre mogą być zmienione, lub też mogą zostać hamowane w procesie translacji tych genów. I odwrotnie, czasami miRNA nie ulegają zmianom ekspresji natomiast ulegają zmianie ekspresji ich geny celowe. Podobnie, jeden transrypt mRNA może być celem dla różnych miRNA. W niektórych przypadkach transkrypty genów celowych nie były wykrywane ani w zdrowych roślinach tytoniu ani w porażonych, na przykład dla miR482, miR390, miR6020. Przyczyną tego zjawiska może być fakt, że tytoń jest podatnym gospodarzem dla PVY.

**Wnioski**

Zakażenie wirusem Y ziemniaka może prowadzić do zmiany ekspresji niektórych genów celowych komplementarnych do miRNA a związanych z rozwojem rośliny i odpowiedzią rośliny na stres. Silne szczepy wirusa, NTN i N-Wi powodowały zmiany większej ilości genów celowych niż szczep łagodny Z-NTN. W tytoniu, gatunku podatnym na PVY transkrypty związane z odpornością nie były wykrywane.

**Literatura.**

Bukhari SA, Shang S, Zhang M, Zheng W, Zhang G, Wang TZ, Shamsi IH, Wu F. (2015) Genome-wide identification of chromium stress-responsive micro RNAs and their target genes in tobacco (Nicotiana tabacum) roots. Environ Toxicol Chem. 34(11):2573-82.

Tang S, Wang Y, Li Z, Gui Y, Xiao B, Xie J, Zhu QH, Fan L. (2012) Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (Nicotiana tabacum). BMC Plant Biol. 12:28.