

## **Martyna Krejmer-Rabalska**

Metody detekcji oraz charakterystyka genetyczna bakulowirusów infekujących gąsienice żerujące na drzewach o znaczeniu gospodarczym.

### **Streszczenie**

Do rodziny *Baculoviridae* należą duże wirusy o pałeczkowatym kształcie, ich materiał genetyczny stanowi kolisty, dwuniciowy DNA. Infekują głównie stadia larwalne motyli (Lepidoptera), błonkoskrzydłych (Hymenoptera) oraz muchówek (Diptera). Ze względu na morfologię bakulowirusy dzielą się na nukleopolihedrowirusy (NPV) oraz granulowirusy (GV), które w ciałach okluzyjnych mają odmienne główne białka strukturalne – odpowiednio, polihedrynę i granulinę. Ze względu na sekwencje genomowe oraz ewolucję zależną od gospodarza rodzina *Baculoviridae* dzieli się na cztery rodzaje: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* i *Deltabaculovirus*. Rodzaj *Alphabaculovirus* tworzą NPV, a *Betabaculovirus* – GV; oba te rodzaje zakażają gąsienice motyli i stanowią przedmiot zainteresowania w mojej pracy doktorskiej. Genom bakulowirusów ma od 80 -180 kbp i zawiera 90 -180 genów, z czego 38 to tzw. geny stałe, obecne u wszystkich członków rodziny *Baculoviridae*. Wirusy z tej rodziny znalazły dwa główne zastosowania – jako wydajny system ekspresji białek oraz – co dużo ważniejsze w kontekście mojej pracy – jako biopestycydy do kontroli owadów atakujących uprawy o znaczeniu gospodarczym. Są bezpieczne, specyficzne, selektywne i nie akumulują się w środowisku. Pomimo że szacowana ilość bakulowirusów wynosi ok. 600 gatunków, dotychczas tylko u ok. 100 poznano genomy w pełni.

Cele mojej pracy doktorskiej obejmowały opracowanie metody umożliwiającej detekcję i różnicowanie gatunków betabakulowirusów z próbek środowiskowych oraz wykorzystanie nowoczesnych technik do detekcji i charakterystyki genetycznej bakulowirusów wyizolowanych z gąsienic ważnych gospodarczo drzew.

W mojej pracy opisałam pełne genomy trzech alfabakulowirusów – dwóch pochodzących z gąsienic brudnicy nieparki (*Lymantria dispar* L.) z różnych regionów Polski – Biebrzańskiego Parku Narodowego oraz Rud k. Raciborza oraz jednego odkrytego w gąsienicach szczołecznicy szarawki (*Dasychira pudibunda* L.). Genom izolatu LdMNPV-BNP ma długość 157270 pz, a LdMNPV-RR01 – 159729 pz, pierwszy koduje - 154 otwarte ramki odczytu, a drugi – 166. Analizy filogenetyczne oparte na sekwencjach aminokwasowych białek kodowanych przez 38 genów stałych oraz opisane cechy genomów, jak np. struktura i zawartość elementów homologicznych powtórzeń czy genów kodujących nietypowe białka (jak np. fotoliza u LdMNPV-BNP), czy porównanie sekwencji nukleotydowych innych genów (np. *polihedryny*) wskazały na duże różnice u obu bakulowirusów. LdMNPV-RR01 jest bardzo podobny do pozostałych dziewięciu alfabakulowirusów dostępnych w bazie danych pochodzących z *L. dispar*, natomiast LdMNPV-BNP znacznie się od nich różni. Przeprowadzone

analizy mogą świadczyć o tym, że to odmienny gatunek, a nie tylko izolat pochodzący z tego samego gospodarza.

Trzeci opisany genom należy do alfabakulowirusa DapuNPV i jest to pierwszy izolat pochodzący z gąsienic szczoteczniczy szarawki, a długość jego genomu wynosi 136761 pz i koduje 161 otwartych ramek odczytu. Analizy wspomniane powyżej wykonane dla tego wirusa wykazały, że jest bardzo podobny do bakulowirusa OpMNPV odkrytego w innym odległym geograficznie gospodarzu znamionówce – *Orgyia pseudotsugata* (McDunnough). W tym przypadku prawdopodobnie może to być ten sam gatunek bakulowirusa.

Druga część pracy doktorskiej polegała na opracowaniu metod detekcji i różnicowania betabakulowirusów. Do tego celu wytypowałam grupę reprezentatywną rodzaju *Betabaculovirus* i zaprojektowałam zdegenerowane startery do powielenia krótkich fragmentów silnie konserwowanych genów - *gran*, *lef-8* i *lef-9*. Pierwsza z metod opiera się na technice wielotemperaturowego polimorfizmu konformacyjnego jednoniciowego DNA (*ang.* multitemperature single stranded DNA conformational polymorphism, MSSCP), druga wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (*ang.* real-time polymerase chain reaction, PCR w czasie rzeczywistym). Obie metody są szybkie i tanie oraz mogą posłużyć jako przesiewowe w kontroli stabilności/zmienności genetycznej betabakulowirusów lub do poszukiwania całkiem nowych gatunków/izolatów.