

Charakterystyka molekularna polskich izolatów wirusa smugowatej mozaiki pszenicy (wheat streak mosaic virus, WSMV)



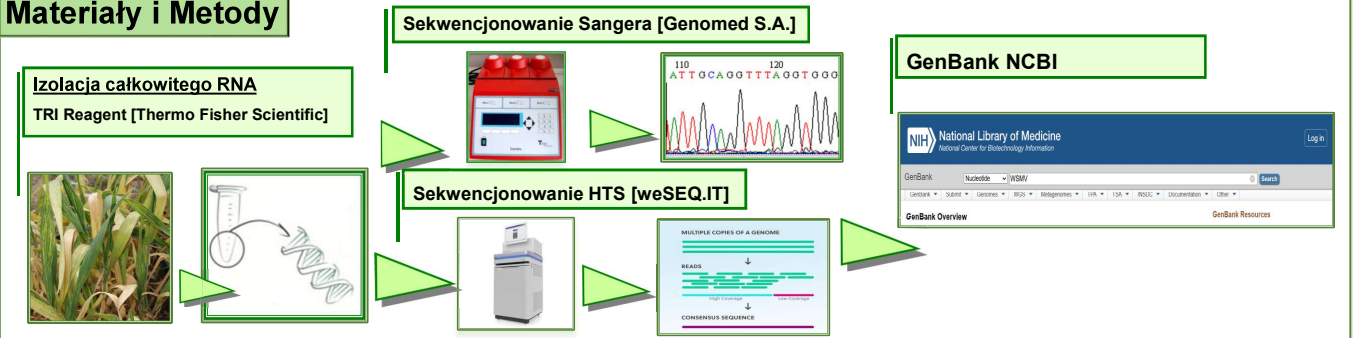
Katarzyna Trzmiel, Aleksandra Zarzyńska-Nowak, Emily Pusch, Beata Hasiów-Jaroszewska

Zakład Wirusologii i Bakteriologii; Instytut Ochrony Roślin-Państwowy Instytut Badawczy, Poznań; (K.Trzmiel@iortpib.poznan.pl)

WSTĘP Wirus smugowatej mozaiki pszenicy (wheat streak mosaic virus, WSMV, *Tritimovirus tritici*) należy do rodzaju *Tritimovirus* w rodzinie Potyviridae. Wirus wywołuje żółto-zieloną mozaikę liści (Fig.1.), zahamowanie wzrostu, redukcję masy korzeni co prowadzi do znaczących strat plonu (5-83%). Genom nitkowatych cząstek WSMV (Fig. 2A.) stanowi +ssRNA o wielkości 9,3 - 9,4 kb. Pojedynczy ORF koduje poliproteinę, z której powstaje 10 białek funkcyjnych: P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, Nla-Pro, Nib, CP. WSMV jest jednym z głównych i szeroko rozpowszechnionych patogenem wirusowym zbóż i traw. Naturalnym sposobem rozprzestrzeniania wirusa jest przenoszenie przez wektora - szpeciela z gatunku *Aceria tosichella* Keifer (Fig. 2B.), przez nasiona porażonej pszenicy (1,5%) oraz przenoszenie mechaniczne. WSMV jest głównym patogenem wirusowym upraw pszenicy w USA oraz krajów Ameryki Południowej i Australii. W Europie jak dotychczas nie powodował znaczących strat. Jednakże w niektórych krajach (Czechy, Ukraina) jest on uważany za potencjalnie groźnego patogena. Podobnie w Polsce, w ostatnich latach, stwierdzono wzrost liczby lokalnych porażen WSMV (Fig. 3.). Badania światowej populacji WSMV opierają się głównie na kompletnych sekwencjach genomu izolatów z USA, podczas gdy dla izolatów europejskich, w Banku Genów NCBI, znajdują się jedynie fragmenty sekwencji i tylko kilka pełnych sekwencji genomu wirusa. W ramach prowadzonych prac zidentyfikowano 6 nowych izolatów WSMV z różnych regionów kraju, które poddano dalszym analizom.

CEL Celem niniejszych badań była molekularna charakterystyka polskich izolatów WSMV wykonana na podstawie kompletnej sekwencji ich genomów.

Materiały i Metody



Materiał do badań stanowił całkowity RNA z porażonych roślin (Tabela 1.).
Sekwencjonowanie Sangera: do reakcji RT-PCR użyto SuperScript IV Reverse Transcriptase kit [Thermo Fisher Scientific] i CloneAmp HiFi PCR Premix [ClonTech]. Uzyskane sekwencje analizowano i edytowano przy użyciu BLASTn oraz BioEdit.
Sekwencjonowanie HTS: rybosomalny RNA z próbek RNA usuwano stosując Ribo-off rRNA depletion kit, a biblioteki tworzone przy użyciu VAHTS Universal V6RNA-seqLibrary Prep kit for Illumina [Vazyme].
Sekwencjonowanie wykonano w technologii Illumina - NovaSeq 6000 platform. Edycję i kompilację uzyskanych odczytów wykonano z wykorzystaniem: Skewer (0.2.2), fastp (0.21.0), CLC Genomics Workbench (20.0.3) [Qiagen].
Analizy bioinformatyczne wykonano dla kompletnych sekwencji genomu polskich i 57 innych izolatów WSMV, które pobrano z Banku Genów NCBI.
Przyrównanie sekwencji wykonano wykorzystując MUSCLE w MEGA11. **Podobieństwo sekwencji** oceniano przy użyciu BioEdit, a graficzną prezentację wyników wykonano w programie SDTV1.2. Potencjalne **zdarzenia rekombinacji** identyfikowano za pomocą RDP4. **Analizę presji selekcyjnej** wykonano na serwerze Datamonkey z użyciem metod FEL, FUBAR, SLAC i MEME. **Relacje filogenetyczne** pomiędzy izolatami ustalano za pomocą metody Maximum-Likelihood (ML) w MEGA11.

WYNIKI

- Wyniki wskazują na **wysokie wzajemne podobieństwo europejskich izolatów WSMV** wynoszące **od 97,6 % do 99,3%** dla sekwencji nukleotydów (nt) i **od 98,6% do 99,8%** dla sekwencji aminokwasów (aa). Analogiczne porównanie do izolatów WSMV z innych regionów świata wykazało niższe wartości od 78,9% do 89,1% oraz od 89,4% do 98,3%, odpowiednio dla sekwencji nt i aa (Fig. 4.).
- Wszystkie polskie izolaty WSMV miały taką samą **wielkość genomu – 9381 nt** oraz posiadały tę samą, charakterystyczną dla izolatów z Europy, delecję w pozycji 8411 – 8413 nt.
- Analizy porównawcze do referencyjnej sekwencji WSMV-Cz [AF454454] wykazały obecność wielu synonimicznych (S) i niesynonimicznych (NS) mutacji punktowych, ze średnią wartością **15NS** w grupie izolatów z Europy. Sekwencje kodujące białek P3, 6K1, 6K2, VPg i Nla-Pro były najbardziej konserwatywne (Fig.5.)
- Analiza zjawiska rekombinacji wykazała tylko **jeden zrekombinowany wariant** pochodzący z Polski (**WSMV-Sosn**).
- Wszystkie nowo zidentyfikowane izolaty wirusa należały do **jednej grupy filogenetycznej [B]** (Fig. 6.).
- Analizy wykazały dominację **negatywnej presji selekcyjnej ($\omega > 1$)**.

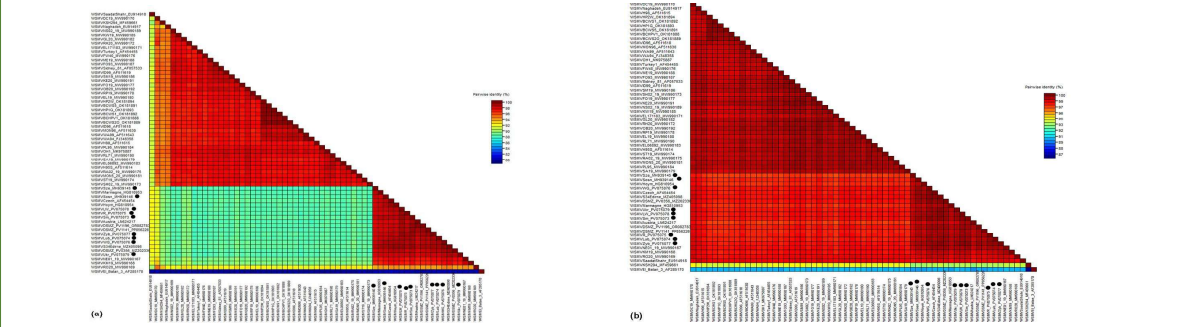


Fig. 4. Analiza podobieństwa badanej populacji WSMV na podstawie pełnej sekwencji nukleotydów (a) i aminokwasów (b) genomu wirusa wykonana w programie SDTV1.2. Polskie izolaty zaznaczono czarną kropką.

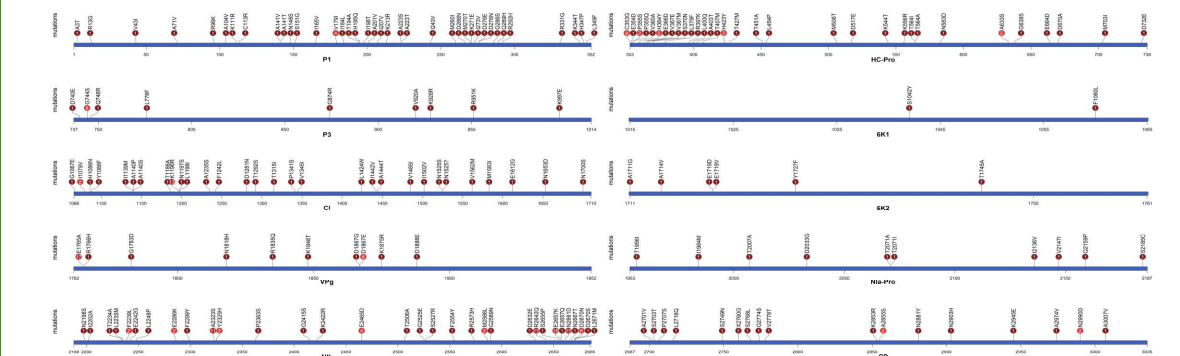


Fig. 5. Graficzna prezentacja lokalizacji i częstości występowania zmian aminokwasów we fragmentach ORF kodujących poszczególne białka funkcyjne (P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, Nla-Pro, Nib i CP) izolatów WSMV wykonana w programie RStudio. Numery w kółkach oznaczają liczbę izolatów, u których wystąpiła dana zmiana.

WNIOSKI

- WSMV jest jednym z głównych wirusów zagrażającym uprawom zbóż w Polsce.
- Wykazano niewielkie zróżnicowanie genetyczne sekwencji kodujących badanej populacji izolatów WSMV.
- Grupowanie się badanych izolatów WSMV było skorelowane z ich pochodzeniem.
- Dominujący wpływ na populację WSMV ma oczyszczająca presja selekcyjna.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2024/53/B/NZ9/02897 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki (OPUS 27).



Fig. 1. Objawy infekcji pszenicy wywołane przez WSMV-WG (a), WSMV-Lub (b), WSMV-R (c), WSMV-Zyb (d), WSMV-Sm (e)

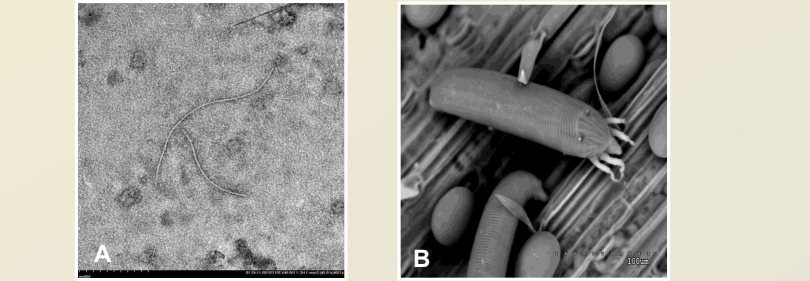


Fig. 2. Cząstki WSM obserwowane w transmisyjnym mikroskopie elektronowym [A], *Aceria tosichella*, obraz ze skaningowego mikroskopu elektronowego [B]

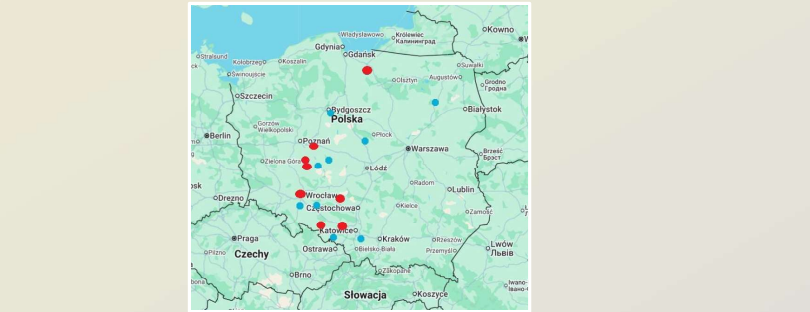


Fig. 3. Lokalizacja porażen WSMV na terenie Polski, miejsca poboru badanych izolatów oznaczono na czerwono

Tabela. 1. Kolekcja badanych izolatów WSMV				
Nazwa izolatu	Roślina - gospodarz	Lokalizacja	Data zebrania	Numer Akcesyjny NCBI
WSMV-LW	Pszenica	w. śląskie	2023	PV075078
WSMV-Zyb	Pszenica	w. dolnośląskie	2023	PV075077
WSMV-WG	OWIES	w. wielkopolskie	2023	PV075076
WSMV-R	Pszenica	w. opolskie	2024	PV075075
WSMV-Lub	Pszenica	w. pomorskie	2024	PV075074
WSMV-Sm	Pszenica	w. wielkopolskie	2024	PV075073
WSMV-Sosn	Pszenica	w. śląskie	2016	MH939146
WSMV-Sze	Pszenżyto	w. wielkopolskie	2013	MH939145

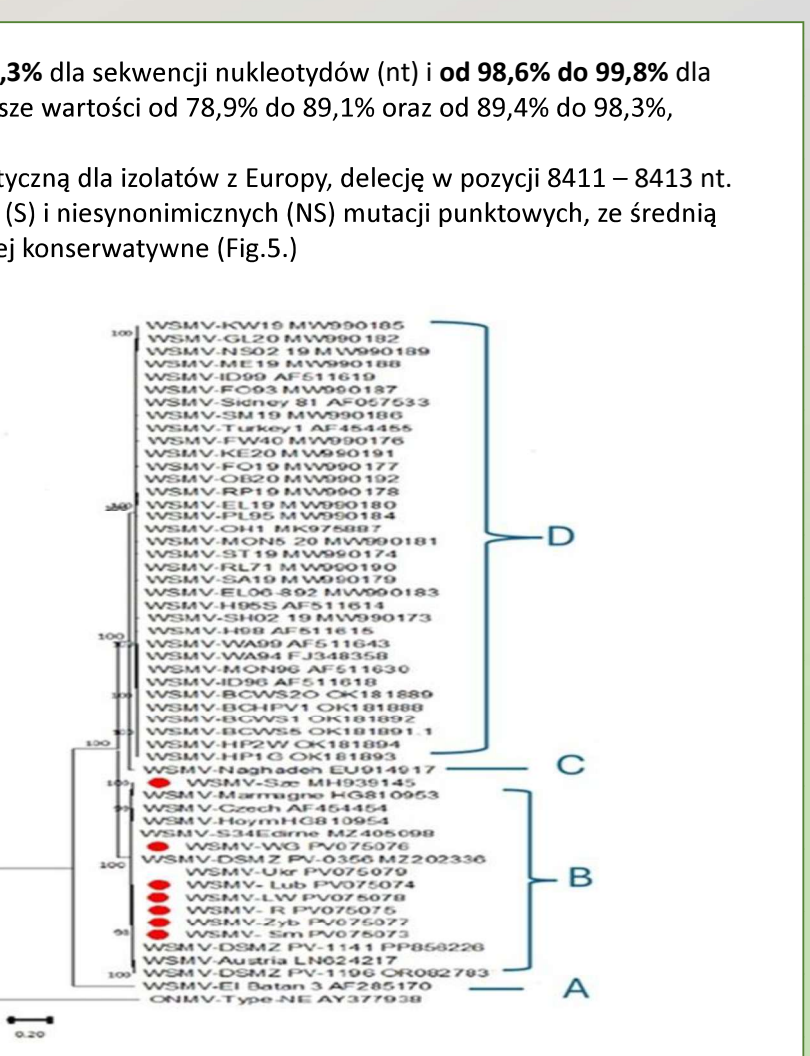


Fig. 6. Drzewo filogenetyczne dla sekwencji nt pełnego genomu badanej grupy izolatów WSMV. Analizę filogenetyczną prowadzono z użyciem programu MEGA11, metodą Maximum Likelihood (ML) z modelem (GTR+G+I). Prawidłowość wygenerowanej topologii drzewa szacowano metodą bootstrappingu (1000 powtórzeń). W badaniach wykorzystano zestaw 7 polskich i 46 innych izolatów WSMV z Banku Genów NCBI. Oat necrotic mottle virus (ONMV-Type-NE) zastosowano do utworzenia grupy zewnętrznej (ang. outgroup). Polskie izolaty WSMV oznaczono czerwona kropką.