



Wpływ zmiany gospodarza na dynamikę zmienności defektywnych genomów wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora

Daria Budzyńska¹, Julia Minicka¹, María J. Olmo-Uceda², Santiago F. Elena^{2,3}, Beata Hasiów-Jaroszewska¹

¹ Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań, Polska, ² Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), CSIC-Universitat de València, Walencja, Hiszpania, ³ Santa Fe Institute, Santa Fe, New Mexico, USA

WSTĘP

Defektywne genomy wirusa (ang. defective viral genomes, DVG) mogą być formowane *de novo* w trakcie wielokrotnego pasażowania wirusa w jednym gospodarzu. Powstają w wyniku delekcji, insercji czy hipermutacji w genomie wirusa, a ich replikacja jest zależna od wirusa, któremu towarzyszą. Wyróżniono cztery rodzaje DVG: cząsteczki powstałe na skutek delekcji lub insercji w genomie wirusa oraz tzw. 5'cb/sb i 3'cb/sb DVG. Powstawanie DVG w trakcie pasażowania wirusa w jednym gospodarzu potwierdzono również dla wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (ang. tomato black ring virus, TBRV, gatunek *Nepovirus nigranuli*). Genom wirusa zbudowany jest z dwóch jednoliciowych cząsteczek RNA (RNA1 i RNA2) o polarności dodatniej. Wcześniejsze analizy pozwoliły stwierdzić, że w genomie izolatów TBRV pochodzących z różnych gospodarzy znajdują się motywy potencjalnie zaangażowane w rekombinację TBRV prowadzącą do powstania D RNA (ang. defective RNA, rozumianych jako krótsze formy DVG) (Hasiów-Jaroszewska i wsp. 2012, Hasiów-Jaroszewska i wsp. 2018, Budzyńska i wsp. 2020). **Celem przeprowadzonych badań była analiza wpływu zmiany gospodarza na powstawanie i różnicowanie DVG TBRV.**

MATERIAŁY I METODY

Izolat TBRV pasażowano 20 razy przez cztery różne zestawy roślin testowych. Pasaże przeprowadzono w odstępach tygodniowych według czterech scenariuszy, określonych jako S1-S4. Dla każdego z układu roślin doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach (liniach ewolucyjnych, L1-L12). Zmiana gospodarza następowała po 5 przeprowadzonych pasażach, zgodnie ze schematem: i) S1 (L1-L3): tytoń → komosa → tytoń → komosa, ii) S2 (L4-L6): komosa → szpinak → tytoń → sałata, iii) S3 (L7-L9): tytoń → sałata → komosa → szpinak, iv) S4 (L10-L12): komosa → tytoń → szpinak → sałata (**Fig. 1**). Po 20 pasażach z każdej z linii ewolucyjnych przygotowano preparat wirusa. Otrzymano 13 preparatów oczyszczonych wirusa: i) preparat stanowiący inokulum do zakażenia pierwszej rośliny według każdego z scenariuszy (nazwany TBRV-Anc), ii) 12 preparatów otrzymanych z 3 linii ewolucyjnych każdego z 4 scenariuszy. Z każdego preparatu wyizolowano RNA wirusa, które następnie poddano RNA-Seq. Otrzymane dane analizowano pod względem jakościowym i ilościowym za pomocą FastQC (Andrews, 2010), MultiQC (Ewels i wsp., 2016) czy BBDuk.sh (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Obecność DVG w danych RNA-Seq identyfikowano za pomocą programu DVGfinder (Olmo-Uceda i wsp., 2022), po wcześniejszym przygotowaniu danych przy pomocy programów BBmap (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) i bwa (Li and Durbin, 2010). Analizy statystyczne przeprowadzono w programie RStudio. Ilość DVG przedstawiono jako RPHT ($10^5 \times$ odczyty przyporządkowane jako DVG / całkowita ilość odczytów zmapowanych do sekwencji referencyjnej TBRV).

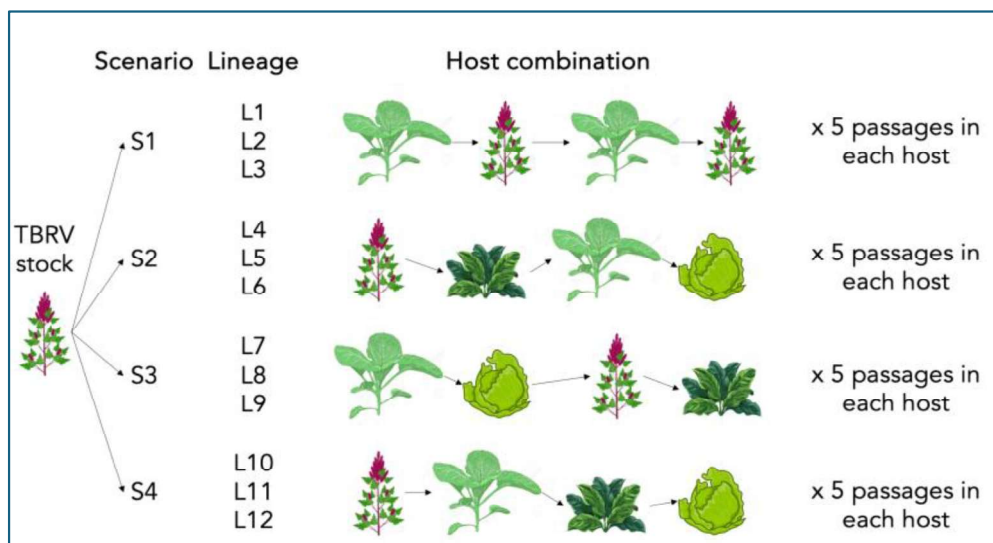


Figura 1. Schemat pasażowania izolatu TBRV. S – układ następujących po sobie gatunków roślin wykorzystanych do pasażowania wirusa (scenariusz), L – linia ewolucyjna; Budzyńska i wsp. 2024.

WYNIKI

We wszystkich analizowanych próbkach zaobserwowano obecność czterech rodzajów DVG (powstałych na skutek delekcji/insercji w genomie wirusa oraz tzw. 5' lub 3' snap-back/copy-back DVG). W przypadku niektórych linii ewolucyjnych zaobserwowano wzrost ilości DVG w stosunku do ilości DVG zidentyfikowanych dla izolatu TBRV przed pasażowaniem (**Fig. 2A**). Poszczególne scenariusze różniły się między sobą pod względem ilości powstałych DVG (**Fig. 2B**). Ponadto w każdej z linii ewolucyjnych dominowały DVG pochodzące z nici RNA1 TBRV (**Fig. 2C**).

Wśród zidentyfikowanych DVG przeważały te powstałe na skutek delekcji w genomie TBRV (**Fig. 3A**). W przypadku analizy poszczególnych linii ewolucyjnych dla L4 i L5 (S2) oraz L10 (S4) stwierdzono przewagę defektywnych genomów powstałych na skutek insercji (**Fig. 3B**).

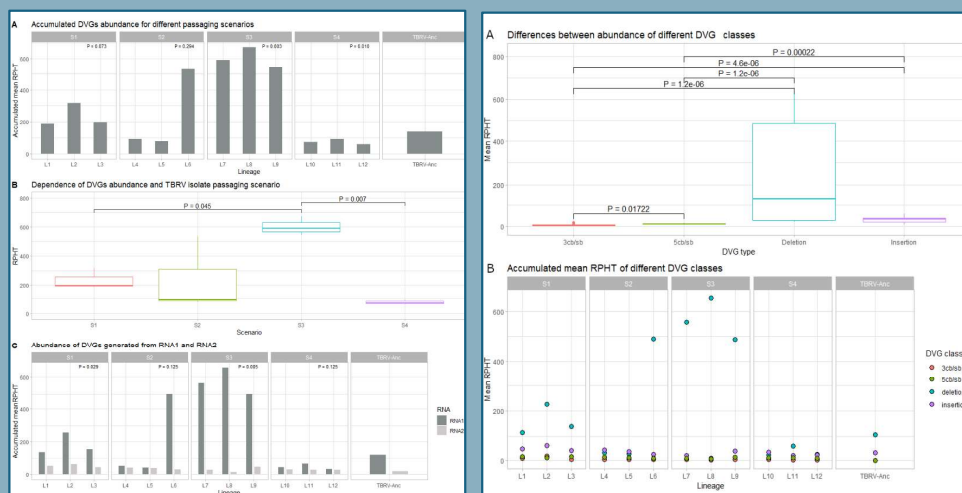


Figura 2. Ilość DVG przedstawiona dla poszczególnych linii ewolucyjnych (A), scenariuszy, według których wirus ewoluował (B), dla poszczególnych linii ewolucyjnych z podziałem na cząsteczki powstałe z nici RNA1 i RNA2 TBRV (C); Budzyńska i wsp. 2024.

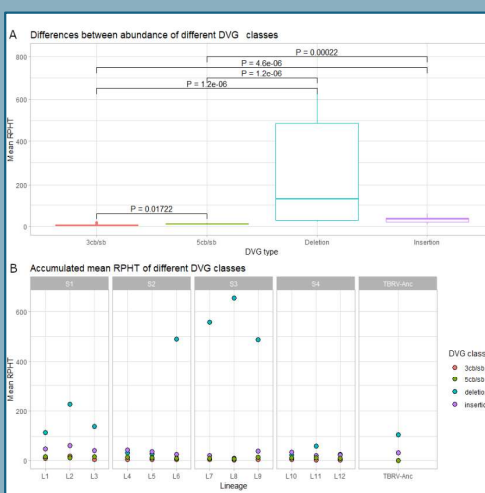


Figura 3. Analiza ilości DVG z podziałem na poszczególne rodzaje (A), dla poszczególnych linii ewolucyjnych (B); Budzyńska i wsp. 2024.

Wykazano, że niektóre spośród DVG powstałych na skutek delekcji w genomie TBRV występowały niezależnie od scenariusza zmiany gospodarza, według którego wirus ewoluował (cząsteczka opisana jako 3050_6364, **Fig. 5A**), podczas gdy niektóre z DVG są unikalne dla poszczególnych linii ewolucyjnych (np. 252_669, **Fig. 5**). Większość z analizowanych cząsteczek (**Fig. 5**) powstała *de novo*, w trakcie pasażowania izolatu TBRV.

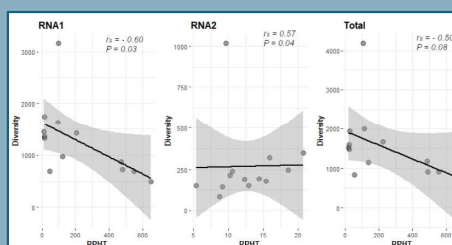


Figura 4. Analiza korelacji pomiędzy liczbą unikalnych pod względem budowy DVG powstałych na skutek delekcji, a ich sumaryczną ilością; Budzyńska i wsp. 2024.

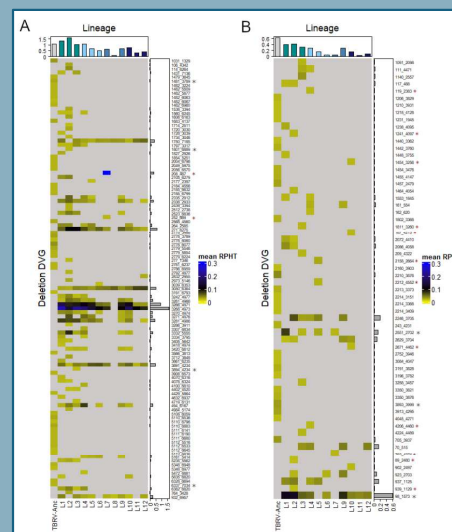


Figura 5. Mapa cieplna ilustrująca obecność DVG z delekcjami dłuższymi niż 99 nukleotydów i średnim RPHT > 0,018 dla RNA1 (A) i RNA2 (B); Budzyńska i wsp. 2024.

Tabela 1. Różnicowanie populacji DVG powstałych na skutek delekcji w genomie TBRV, przedstawione dla każdej linii ewolucyjnej i TBRV-Anc; Budzyńska i wsp. 2024.

Lineage	Number of unique deletion species			Percent of DVGs with mean read counts ≥5	Percent of DVGs longer than 1,000 nt
	RNA1	RNA2	Total		
TBRV-Anc	3,171	1,020	4,191	1.36	99.62
L1	1,638	348	1,986	14.45	98.69
L2	1,420	247	1,667	18.96	99.34
L3	977	179	1,156	14.71	98.96
L4	1,743	195	1,938	13.16	99.58
L5	1,319	152	1,471	12.64	98.84
L6	726	190	916	16.70	99.45
L7	698	216	914	14.88	98.58
L8	497	151	648	16.67	98.92
L9	870	320	1,190	14.62	99.24
L10	1,441	83	1,524	11.22	99.34
L11	699	145	844	13.98	99.53
L12	1,351	241	1,592	12.69	99.12

Zróżnicowanie DVG powstałych na skutek delekcji w genomie TBRV oceniano jako liczbę unikalnych pod względem budowy DVG zidentyfikowanych w każdej linii ewolucyjnej. Liczba unikalnych DVG była różna dla poszczególnych linii ewolucyjnych, za najbardziej zróżnicowaną populację DVG uznano populację TBRV-Anc (**Tab. 1**). W przypadku DVG powstałych na skutek delekcji w nici RNA1 TBRV stwierdzono ujemną korelację pomiędzy liczbą unikalnych cząsteczek, a ich sumaryczną ilością (**Fig. 4**). Wśród zidentyfikowanych cząsteczek dominowały dłuższe DVG (> 1000 nt).

WNIOSKI

- Replikacja istniejących DVG (rozumianych jako spektrum defektywnych RNA wirusa) i ich powstawanie *de novo* jest możliwe w trakcie pasażowania wirusa przez różnych gospodarzy.
- Wśród zidentyfikowanych DVG dominują cząsteczki powstałe na skutek delekcji w genomie TBRV.
- Większość powstałych DVG pochodzi z genomowego RNA1 wirusa.
- W przypadku DVG powstałych na skutek delekcji w nici RNA1 wirusa występuje negatywna korelacja pomiędzy zróżnicowaniem populacji DVG, a ich sumaryczną ilością.
- W populacji DVG dominują dłuższe cząsteczki, a część cząsteczek powstaje niezależnie od gatunku rośliny żywicielskiej wykorzystanej do pasażowania.



Dowiedz się więcej!

Badania wykonane w ramach projektu PRELUDIUM 2018/31/N/NZ9/02985 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz projektów PID2022-136912NB-I00 (Spain, MCIU/AEI/10.13039/501100011033) i "ERDF a way of making Europe".