

Zróżnicowanie genetyczne satelitarnych RNA wirusa czarnej pierścieniowej plamistości pomidora i ich wpływ na akumulację wirusa w roślinach

Beata Hasiów-Jaroszewska¹, Julia Minicka¹, Agnieszka Taberska¹, Aleksandra Zarzyńska-Nowak¹, Katarzyna Kubska¹, Daria Budzyńska¹, Santiago F. Elena^{2,3}

¹Instytut Ochrony Roślin-PIB, Zakład Wirusologii i Bakteriologii, ul Wł. Węgorka 20, Poznań

²Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Universitat de València, Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, Walencja, Hiszpania

³The Santa Fe Institute, Santa Fe, NM, USA.

e-mail: B.Hasiow@iorpib.poznan.pl

Wirus czarnej pierścieniowej plamistości pomidora (*Tomato black ring virus*, TBRV) poraża szeroki zakres roślin, w tym wiele gatunków gospodarczo ważnych. Genom wirusa zbudowany jest z dwóch pojedynczych nici RNA o dodatniej polarności (+ssRNA). Dodatkowo mogą występować subgenomowe cząsteczki RNA, w tym satelitarne RNA (satRNA). Większość satRNA nepowirusów posiada VPg na końcu 5' oraz ogon poli(A) na końcu 3'. Satelitarne RNA TBRV zawiera ~1374 nt i koduje białko o masie 48kD. Obecność satRNA może wpływać na symptomy obserwowane na porażonych roślinach oraz replikację wirusa. Celem niniejszej pracy była analiza zróżnicowania genetycznego satRNA TBRV oraz ich wpływu na akumulację wirusa w roślinach.

Do badań wybrano 41 izolatów pochodzących z różnych gospodarzy i regionów Polski. SatRNA amplifikowano z wykorzystaniem odpowiednich starterów w reakcji RT-PCR, klonowano molekularnie i sekwencjonowano. Otrzymane sekwencje analizowano pod kątem zjawiska rekombinacji z wykorzystaniem programów RDP4 i SplitsTree. Presja selekcyjna została określona na podstawie stosunków substytucji niesynonimicznych do synonimicznych (dN/dS) w analizowanych sekwencjach satRNA przy użyciu serwera Datamonkey. Relacje filogenetyczne w populacji satRNA analizowano z wykorzystaniem programu MEGAX. Wpływ satRNA na objawy chorobowe i akumulację wirusa analizowano z wykorzystaniem trzech izolatów: TBRV-K8, TBRV-MJ i TBRV-Pi oraz *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum* oraz *Spinacia oleracea*. Akumulację RNA badano po 7, 14, 21 oraz 28 dniach od inokulacji (dpi) za pomocą reakcji RT-qPCR (LightCycler96, Roche). Otrzymane dane analizowano statystycznie z wykorzystaniem programu SPSS (IBM, USA).

Spośród badanych izolatów obecność satRNA stwierdzono dla 18 izolatów TBRV. Analizy sekwencji wykazały wysoki stopień zróżnicowania genetycznego satRNA, które wyniosło od 91,1% do 100% dla sekwencji nukleotydów i od 89,4% do 100% dla sekwencji aminokwasów. W badanej populacji nie stwierdzono obecności zrekombinowanych wariantów. Wykazano działanie presji oczyszczającej co świadczy o usuwaniu niekorzystnych mutacji z populacji. Analiza filogenetyczna wykazała tendencję niektórych satRNA do wspólnego grupowania. Nie stwierdzono jednak wyraźnej korelacji pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym satRNA, gospodarzem i miejscem pochodzenia, co wymaga dalszych analiz z wykorzystaniem większej ilości sekwencji. Zaobserwowano, że rośliny szpinaku i komosy zainfekowane izolatem TBRV + satRNA wykazują silniejsze objawy chorobowe w porównaniu do tych zainfekowanych tylko TBRV. Podsumowując, wykazano, że obecność satelitarnych cząsteczek RNA ma istotny wpływ na akumulację TBRV zależny od kombinacji izolatu i rośliny gospodarza.

Pracę wykonano w ramach projektu OPUS 2017/25/B/NZ9/01715 z Narodowego Centrum Nauki.

Genetic variability of tomato black ring virus satellite RNAs and their impact on virus accumulation in plants

Beata Hasiów-Jaroszewska¹, Julia Minicka¹, Agnieszka Taberska¹, Aleksandra Zarzyńska-Nowak¹, Katarzyna Kubska¹, Daria Budzyńska¹, Santiago F. Elena^{2,3}

¹Institute of Plant Protection-NRI, Department of Virology and Bacteriology, ul. Wł. Węgorka 20, 60-318 Poznań, Poland

²Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universitat de València, Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, Valencia, Spain

³The Santa Fe Institute, Santa Fe, NM, USA

e-mail: B.Hasiow@iorpib.poznan.pl

Tomato black ring nepovirus infects a wide range of plant including many economically important species. Its genome consists of two single-stranded positive-sense RNAs. Additional subgenomic RNAs including satellite RNAs (satRNAs) have also been described. The majority of nepoviruses satRNA have a VPg at the 5' end and a polyA tail at the 3' end. TBRV satRNAs consist of a single-stranded RNA of about 1374 nt that encodes a protein of 48 kDa which probably affects the activity of the viral replicase. The presence of satRNAs might have great impact on symptoms development and virus replication. The goal of this study was to analyze the genetic diversity of TBRV satRNAs and their impact on virus accumulation in plants.

Forty-one TBRV isolates originated from different hosts and regions of Poland were selected for the study. SatRNAs were amplified with appropriate primers by RT-PCR, molecularly cloned and sequenced. The obtained sequences were analysed for occurrence of recombination using RDP4 and SplitsTree programs. The selective pressure acting on particular codons was evaluated based on the ratio of non-synonymous (d_N) to synonymous (d_S) nucleic acid changes using four different approaches implemented in the Datamonkey server. Phylogenetic relationships were established using MEGA X. The impact of satRNAs on symptoms and virus accumulation was analysed for TBRV-K8, TBRV-MJ and TBRV-Pi isolates in *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana tabacum* and *Spinacia oleracea*. RNA accumulation was established 7, 14, 21 and 28 days post inoculation using RT-qPCR (LightCycler96, Roche). The obtained data was analysed statistically using SPSS software (IBM, USA)

The presence of satRNA was confirmed in 18 out of 41 tested TBRV isolates. Sequence analyses showed a high level of genetic variability, ranging from 91.1% to 100% for the nucleotide and 89.4% to 100% for amino acid sequences, respectively. No recombinant variants were found. Pervasive purifying selection on satRNAs and removing deleterious variations has been found. Phylogenetic analysis showed significant clustering of satRNAs. However, no clear correlation was found between the genetic variation of satRNA, the host species and the site of origin, which requires further analysis using a larger data set. *S. oleracea* and *C. quinoa* plants infected with TBRV + satRNA showed more severe symptoms, in comparison to those infected only with TBRV, regardless of the viral isolate. In conclusion, the presence of satRNAs significantly impacts TBRV accumulation in an isolate and host plant dependent manner.

This research was funded by the Polish National Science Centre (project No. 2017/25/B/NZ9/01715).