

Sekwencjonowanie genomów bakteriofagów powodujących lizę roślinnych i ludzkich szczepów *Kosakonia cowanii*

Krzysztof Krawczyk¹⁾, Weronika Zenelt²⁾, Anna Hoffmann¹⁾, Katarzyna Sadowska²⁾

¹⁾Zakład Wirusologii i Bakteriologii, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań

²⁾Klinika Chorób Roślin i Bank Patogenów, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Poznań

Kosakonia cowanii (wcześniej *Enterobacter cowanii*) to Gram-ujemna pałeczka, zdolna do ruchu i rozwoju w różnorodnych środowiskach. Dzięki wszechstronności metabolicznej jest silnym konkurentem i posiada ogromny potencjał metaboliczny. W wodzie czy ściekach została zidentyfikowana jako składnik organizmów tworzących biofilm. W roślinach stwierdzono ją jako endofityczną bakterię w brodawkach lucerny (*Medicago sativa*) oraz w *Artemisia nilagirica*, tradycyjnej roślinie leczniczej w Azji. U zwierząt stwierdzono jej obecność w jelitach tropikalnego komara *Anopheles gambiae* i pszczoł (*Apis mellifera mellifera*). Bakterię wyizolowano także z jelita dorsza atlantyckiego (*Gadus morhua*) oraz z otworu nosowego papugi kea (*Nestor notabilis*). U ludzi kilka szczepów *K. cowanii* wyizolowano z próbek klinicznych (krew, mocz, żółć czy płwocina).

Choć głównie uważana za patogen roślin takich jak eukaliptus, cebula czy soja, *K. cowanii* została również wskazana jako przyczyna rzadkich zakażeń u ludzi, takich jak rabdomioliza czy ostre zapalenie pęcherzyka żółciowego.

Materiały i metody

Z zebranych w Polsce liści soi z widocznymi objawami porażenia (brązowe plamki otoczone żółtą obwódka) izolowano szczepy *K. cowanii*. Szczep od pacjenta z zapaleniem pęcherzyka żółciowego pochodził z Instytutu Mikrobiologii Medycznej, Hamburg, szczep typu DSM 18,146 *K. cowanii* z kolekcji DSMZ, Niemcy.

Próbki gleby do badań przesiewowych fagów pobrano z różnych miejsc w Czechach. Bakterie hodowano w bulionie trypsynowo-sojowym w temp. 27°C (szczep ludzki w 37°C) i wysiewano na płytkach Petriego. Próbki fagów nałożono na hodowle i inkubowano przez 16 h w 27°C. Obecność strefy lizy („łysinki”) wskazywała na specyficzne lityczne fagi. Zbadano ponad 300 próbek gleby, z których w dziewięciu znaleziono fagi, które oczyszczono, barwiono negatywnie 2% (w/v) octanem uranylu i badano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym JEOL 1010 (pod napięciem)80 kV.

DNA izolowano z oczyszczonych wirusów po traktowaniu RNazą, DNazą i proteinazą K, następnie sekwencjonowano na Illumina platform (Neogen)(Cambridge, UK). Odczyty odrębne demultipleksowano, adapterowano, następnie zmontowano *de novo* w oprogramowaniu CLC GenomicsWorkbench 8.5.1. (Qiagen, Hilden, Niemcy). Kontigi ręcznie sprawdzono, niejasności korygowano po sekwencjonowaniu metodą Sangera. Poprawione sekwencje zanotowano w RAST. Do identyfikacji odległe spokrewnionych białek użyto HHpred. Porównanie sekwencji i analizy filogenetyczne przeprowadzono w MEGA X. Analizę wykresu punktowego Dotplot przeprowadzono na połączonych kompletnych genomach wybranych wirusów bakteryjnych w programie Gepard DotPlot (parametry: word length = 10 i window size = 0). Sekwencje wyjustowano w ClustalW (gap opening penalty = 10, gap extension penalty = 0.10). Analizę filogenetyczną przeprowadzono przy użyciu MEGA X z modelem JTT i potwierdzono przez 1000 powtórzeń metody bootstrap.

Wyniki

W próbkach gleby zidentyfikowano sześć różnych wirusów, stosując *K. cowanii* 042 i 045 jako gospodarzy selekcyjnych. Oznaczono je jako Kc166A, Kc166B, Kc237, Kc261, Kc283 i Kc318. Dodatkowo trzy wirusy (Kc263, Kc304 i Kc305) zidentyfikowano przy użyciu szczepu *K. cowanii* Hamburg.

Stwierdzono, że dziewięć wirusów powoduje lizę roślinnych i/lub ludzkich szczepów *K. cowanii*. Nowe wirusy zostały całkowicie zsekwencjonowane i przeanalizowane. Trzy sklasyfikowano w *Podoviridae*, trzy w *Autographiviridae* i trzy w *Myoviridae*. Wirusy Kc166B i Kc283 najprawdopodobniej reprezentują gatunki w obrębie rodzajów *Podoviridae*, które nie zostały jeszcze ustalone.

Wirus	Długość	Dostęp GenBank
Kc261	42 203 bp, G+C 55,4%	MW250275
Układ genomu i 87,2% identyczność z fagiem <i>Escherichia usur</i> (nr akces. MN850624) potwierdzają klasyfikację wirusa do rodzaju <i>Bonnellvirus</i> , <i>Autographiviridae</i> ; Motywy endolizyny faga rozpoznano na białku kodowanym przez ORF53 i powinien być kluczowym enzymem układu lizy Kc261.		
Kc318	41 938 bp, G+C 55,5%	MW250276
Całkowita sekwencja genomu wykazuje 91,3% identyczności z fagiem <i>Cronobacter sakazakii</i> GAP227 (nr akces. NC_020078, rodzaj <i>Cronovirus</i> , <i>Autographiviridae</i>) i ponad 95% identyczności z sekwencją większości kodowanych białek. Zaproponowano nazwę dla tego wirusa <i>Kosakonia</i> K318 (Kc318), będąc jednocześnie nowym wirusem z rodzaju <i>Cronovirus</i> .		
Kc166A	41 374 bp, G+C 52,7%	MW258709
Układ genomu jest bardzo podobny do tego u wirusów z rodzaju <i>Kayfunavirus</i> . Porównanie całych genomów metodą BLASTN ujawniło, że fag ST31 <i>Escherichia</i> jest najbardziej podobnym wirusem (68,8% identyczności nukleotydowej). W genomie Kc166A zidentyfikowano gen holin, który może poprawiać zdolności lityczne faga.		
Kc166B	40 785 bp, G+C 57,4%	MW258711
Fag <i>Escherichia</i> C130_2 (nr akces. NC_048067) i fag <i>Escherichia Sortsne</i> (nr akces. NC_048178) były odpowiednio w 53,5% i 48% identyczne, gdy kompletne sekwencje nukleotydowe dopasowano w MUSCLE.		
Kc237	40 897 bp, G+C 59,4%	MW258710
Genom faga <i>Klebsiella</i> IME279 uznano za najbardziej podobny genom, z 72,1% identyczności.		
Kc283	76 232 bp, G+C 46,9%	MZ348421
Genom jest blisko spokrewniony z niesklasyfikowanymi podowirusami, przy czym najbardziej podobne są fagi <i>Pectobacterium Nepra</i> , <i>Pectobacterium</i> CB1 i <i>Pectobacterium Possum</i> , z odpowiednio 74,6%, 74,4% i 69,0% identyczności sekwencji.		
Kc263	253 740 bp	MZ348422
Genom Kc263 jest największym ze wszystkich znalezionych i zsekwencjonowanych wirusów <i>K. cowanii</i> . Fag <i>Aeromonas</i> PS1, <i>Klebsiella</i> N1M1 i <i>Pseudomonas</i> OBP (wszyscy członkowie <i>Myoviridae</i>) są wirusami spokrewnionymi, ale mają tylko około 50% identyczności sekwencji. Jego pozycja taksonomiczna nie jest jasna i bardziej prawdopodobne jest, że będzie to członek nowego rodzaju.		
Kc304	17 1207 bp	MZ348424
94,2% nukleotydowo identyczny z fagiem <i>Serratia</i> CH14 (<i>Myoviridae</i>). Różnice w genomach wynikają głównie z obecności lub braku endonukleaz naprowadzających w genomach. Jeśli zignoruje się ten fakt, Kc304 można uznać za izolat faga <i>Serratia</i> CH14.		
Kc305	174 783 bp, G+C 40%	MZ348423
Na genomie w obu orientacjach zapisano 295 przewidywanych otwartych ramek odczytu i sześć genów tRNA.		

Wirus	Szczepy <i>K. cowanii</i>											Klasyfikacja
	039	042	045	048	051	056	059	062	063	18146	Hamburg	
	szczepy roślin						szczepy ludzkie					
Kc166A	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	Kayfunavirus <i>Autografiwirusy</i>
Kc261	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Wirus Bonnell <i>Autografiwirusy</i>
Kc318	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	Kronovirus <i>Autografiwirusy</i>
Kc166B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	nowy rodzaj <i>Podoviridae</i>
Kc237	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Sortsnevirus <i>Podoviridae</i>
Kc283	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	nowy rodzaj <i>Podoviridae</i>
Kc263	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nowy rodzaj <i>Myoviridae</i>
Kc304	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	Wirus Winklera <i>Myoviridae</i>
Kc305	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	Miowirus <i>Myoviridae</i>

Tabela 1. Specyficzność gospodarza wirusów *Kosakonia* przetestowana na dziewięciu izolatach roślinnych oraz dwóch izolatach ludzkich *K. cowanii*. Obecność „łysinek” „+”, brak „łysinek” „-”