

## UPORABA VISOKOZMOGLJIVEGA SEKVENCIRANJA ZA ISKANJE KARANTENSKIH RASTLINSKIH VIRUSOV

Anja PECMAN<sup>1</sup>, Zala KOGEJ<sup>2</sup>, Nataša MEHLE<sup>3</sup>, Ana VUČUROVIĆ<sup>4</sup>, Maja  
RAVNIKAR<sup>5</sup>, Denis KUTNJAK<sup>6</sup>

<sup>1-6</sup>Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,  
Ljubljana

<sup>1-2</sup>Mednarodna podiplomska šola Jožefa Štefana, Ljubljana

<sup>3</sup>Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Dvorec Lanthieri,  
Vipava

### IZVLEČEK

Posebno tveganje za kmetijstvo predstavljajo karantenski škodljivi organizmi, ki v EU niso zastopani ali pa so zastopani v omejenem obsegu. Če so vneseni v novo okolje, so praviloma zelo invazivni in lahko negativno vplivajo na gospodarstvo, kmetijstvo, naravo in biotsko raznovrstnost, za družbo pa imajo lahko hude socialne posledice. Med njimi so številni virusi, za katere ni niti vpeljanih niti razvitih ustreznih tarčnih diagnostičnih metod. Razvoj posameznih tarčnih metod za vse te viruse pa bi bil časovno in cenovno precej potraten. V tem primeru je najbolj smiselno uporabiti metodo, s katero lahko netarčno potrdimo katerikoli virus. Z uporabo generične metode, kot je visokozmogljivo sekvenciranje (HTS), lahko določimo nukleotidno zaporedje vsem nukleinskim kislinam v preiskovanih vzorcih in tako znotraj ene preiskave netarčno zaznamo tudi morebitne viruse. Do sedaj je sekvenciranje potekalo pri zunanjem izvajalcu na platformi Illumina, vendar, ker je časovno dolgotrajno (rezultati na voljo v približno dveh mesecih), smo uvedli HTS sekvenciranje v našem laboratoriju, z uporabo sekvenatorja MinION (Oxford Nanopore Technologies). S tem so rezultati na voljo bistveno hitreje (v do desetih delovnih dneh). V prispevku so predstavljeni i) dosednji rezultati uporabe HTS pri zaznavanju nepričakovanih rastlinskih virusov ter ii) primerjava rezultatov pri zaznavanju virusov v kumulativnih diagnostičnih vzorcih s sekvenciranjem s tehnologijo Illumina in platformo Oxford Nanopore Technologies.

**Ključne besede:** nanopore, rastlinski virusi, visoko zmogljivo sekvenciranje, zaznavanje

---

<sup>1</sup> mlada raziskovalka, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>2</sup> mlada raziskovalka, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup> doc. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>4</sup> dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>5</sup> prof. dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

<sup>6</sup> dr., Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

## ABSTRACT

### THE USE OF HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING FOR DETECTION OF QUARANTINE PLANT VIRUSES

Quarantine pests, which are not present in the EU or are present to a limited extent, pose a particular risk to agriculture. When introduced into a new environment, they tend to be highly invasive and can have a negative impact on the economy, agriculture, nature and biodiversity, as well as having serious social consequences for society. Among them, there are a number of viruses for which appropriate targeted diagnostic methods have not been established or do not exist. Developing individual target methods for all these viruses would be very time consuming and costly. In this case, it makes the most sense to use a method that can detect the presence of each virus in a non-targeted manner. Using a generic method such as high-throughput sequencing (HTS), we can determine the nucleotide sequence of all nucleic acids in the test samples and thus detect potential viruses in a single test in a non-targeted manner. Previously, HTS sequencing was outsourced using the Illumina platform. However, as this is very time consuming (results available in approximately two months), we have introduced HTS sequencing in our laboratory using a MinION sequencer (Oxford Nanopore Technologies), with which results are available significantly faster (within ten working days). Here we will present i) HTS results to date for the detection of unexpected plant viruses and ii) the HTS comparison results for the detection of plant viruses in cumulative diagnostic samples using Illumina technology and Oxford Nanopore Technologies.

**Key words:** detection, high-throughput sequencing, nanopore, plant viruses

## 1 UVOD

Na območju Evropske unije predstavljajo posebno tveganje karantenski škodljivi organizmi, ki v Evropski uniji niso zastopani (EU uredba 2021/2285 ANNEX II/A) ali pa so omejeno zastopani. Z vnosom v novo okolje lahko negativno vplivajo na gospodarstvo, predvsem, če prizadenejo kmetijsko pridelavo in gozdarstvo, kot tudi na naravo in biotsko raznovrstnost, saj so v novem okolju praviloma zelo invazivni. Posledično lahko pustijo hude socialne posledice v družbi (GOV, 2022).

Karantenske škodljive viruse lahko zaznavamo in identificiramo s specifičnimi tarčnimi metodami (ELISA, PCR), vendar le-te za številne viruse niso niti vpeljane niti razvite. Razvoj vseh posameznih tarčnih metod bi bil namreč časovno in cenovno zelo potraten, zato je v tem primeru smiselno uporabiti netarčno metodo, kot je na primer visoko zmogljivo sekvenciranje (high-throughput sequencing - HTS), ki omogoča določanje vseh nukleinskih kislin v vzorcih in tako poleg zaznavanja tudi do različka virusa natančno identifikacijo (Kutnjak in sod., 2014).

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo uporabljamo tehnologijo visokozmogljivega sekvenciranja za diagnostične vzorce z nepojasnjenimi bolezenskimi znamenji. S tem pristopom smo zaznali in identificirali že številne, s klasičnimi diagnostičnimi metodami spregledane viruse.

### **1.1 Virus mozaika zobnika na novem gostitelju (paradižniku)**

V raziskavi Pecman in sod. (2018) je bil paradižnik, vzorčen v Ankaranu (2015), s hudimi nekrotičnimi bolezenskimi znaki testiran s serološko metodo ELISA na prisotnost nekaterih virusov, kot na primer: virus nekrotične pegavosti vodenke (*impatiens necrotic spot virus*; INSV), virus pegavosti in uvelosti paradižnika (tomato spotted wilt virus; TSWV), virus S krompirja (potato virus S; PVS) in virus M krompirja (potato virus M; PVM). Vzorec je bil pregledan tudi z elektronskim mikroskopom in z mehansko inokulacijo različnih testnih rastlin. Z ELISA, mehansko inokulacijo testnih rastlin in z elektronsko mikroskopijo je bila v vzorcu potrjen virus PVM. Vzorec smo nato sekvencirali s tehnologijo Illumina, z namenom preverjanja morebitne sočasne prisotnosti drugih virusov, saj glede na znano literaturo PVM ne povzroča nekroz na paradižniku. Z visokozmogljivim sekvenciranjem, s tehnologijo Illumina, sta bila v vzorcu paradižnika zaznana, poleg virusa PVM, še južni virus paradižnika (*southern tomato virus*; STV) in nov različek virusa mozaika zobnika (*henbane mosaic virus*; HMV). V nadaljnjih raziskavah je bil sestavljen celoten genom novega različka virusa HMV. Virus smo tudi osamili in določili gostiteljske rastline. Raziskava je potrdila prvo najdbo tega virusa v Sloveniji in prvo najdbo tega virusa na novem gostitelju - paradižniku.

270

### **1.2 Virus Y zelene in virus ozkolistnosti korenja na peteršilju**

Leta 2014 so bile na zasebnem vrtu v osrednji Sloveniji opažene rastline peteršilja z upočasnjeno rastjo in izkrivljenimi ter mozaičnimi listi. Leta 2016 pa je bilo zaznanih 10 % takšnih rastlin na območju osrednje Slovenije, kjer gojijo peteršilj za komercialno uporabo. Rastline z bolezenskimi znamenji so bile pregledane z elektronsko mikroskopijo, kjer so bili vidni filamentozni virusni delci. V nadaljevanju smo vzorec iz leta 2016 sekvencirali s HTS ter zaznali in identificirali virus Y zelene (*apium virus Y*; ApVY) in virus ozkolistnosti korenja (*carrot thin leaf virus*; CTLV). Oba virusa smo z mehansko inokulacijo uspešno prenesli na testno rastlino *Chenopodium quinoa* ter nato tudi potrdili z metodo ELISA in RT-PCR. Oba virusa sta bila z naknadno analizo potrjena tudi v vzorcu iz leta 2014. To je prva najdba virusa Y zelene in virusa ozkolistnosti korenja v Sloveniji. S študijami iz leta 2016 je bil virus ApVY zaznan tudi na rastlinah peteršilja brez bolezenskih znakov, zato so potrebne nadaljnje raziskave, da bi ugotovili ali CTLV povzroča bolezenske znake sam ali v mešani okužbi z ApVY (Mehle in sod., 2019).

### **1.3 Z listnimi ušmi prenosljivi virus rumenice buče na oljni buči in buči velikanki**

V letih 2017 in 2018 je bilo s HTS analiziranih 32 vzorcev bučevk (20 *Cucurbita pepo*, 3 *Cucurbita maxima*, 7 *Cucumis melo*, 1 *Cucumis sativus*, in 1 *Citrullus lanatus*) z izraženimi bolezenskimi znaki v obliki petih kumulativnih vzorcev. V štirih od petih kumulativnih vzorcev smo zaznali odčitke z listnimi ušmi prenosljivega

virusa rumenice buče (cucurbit aphid-borne yellows virus; CABYV). Z RT-PCR metodo smo preverili vseh 26 vzorcev, ki so bili vključeni v kumulativne vzorce, v katerih so bile odkrite nukleinske kisline virusa CABYV. CABYV je bil z RT-PCR potrjen v 13 vzorcih *C. pepo* in v enem vzorcu *C. maxima*. Od 13 vzorcev rastlin *C. pepo*, jih je bilo kar 12 takšnih, v katerih smo sočasno odkrili tudi virus mozaika kumare (cucumber mosaic virus; CMV), virus mozaika lubenice (watermelon mosaic virus; WMV) in/ali virus rumenega mozaika bučke (zucchini yellow mosaic virus; ZYMV). CABYV je bil potrjen na 5 različnih lokacijah v različnih delih Slovenije. CABYV je razširjen v območju Mediterana, za Slovenijo pa je to prva potrditev tega virusa. V vzorcu *C. pepo*, kjer je bila zaznana samostojna okužba s CABYV, so bili opaženi bolezenski znaki rumenenja listov, pri mešanih okužbah pa so bili bolezenski znaki bistveno močnejši. Za razjasnitev pomembnosti okužbe s CABYV so tako potrebne nadaljnje raziskave (Mehle in sod., 2020).

#### **1.4 Virus bele lisavosti zlatice na novem gostitelju (paradižniku)**

Rastline paprike in paradižnika, vzorčene v Sloveniji v letih 2017, 2019 in 2020 z izraženimi bolezenskimi znaki, so bile združene v štiri kumulativne vzorce in sekvencirane s tehnologijo HTS. V vseh kumulativnih vzorcih so bili zaznani odčitki in soseske virusa bele lisavosti zlatice (ranunculus white mottle ophiovirus; RWMV). V nadaljnji raziskavi smo načrtovali specifičen test RT-PCR, ki je potrdil virus v dveh rastlinah paprike, vzorčenih v letih 2017 in 2019 in v štirih rastlinah paradižnika, vzorčenih v letu 2020 na dveh različnih lokacijah v Sloveniji. Gre za prvo najdbo tega virusa v Sloveniji in hkrati tudi prvo potrditev tega virusa na rastlinah paradižnika in paprike v Evropi (Rivarez in sod., 2021).

## **2 PRIMERJAVA UPORABE PLATFORM ILLUMINA IN OXFORD NANOPORE TECHNOLOGIES ZA ZAZNAVANJE RASTLINSKIH VIRUSOV**

Tehnologija visokozmogljivega sekvenciranja je v zadnjem času nepogrešljivo orodje v rastlinski virologiji. Z namenom redne uporabe in ažurnih rezultatov smo sekvenciranje pri zunanjih izvajalcih prenesli v lastni laboratorij, na napravo MinION (Oxford Nanopore Technologies). MinION je sekvenator v velikost USB-ključka, kar omogoča možnost njegove uporabe tako v manjših laboratorijih kot tudi na terenu (Branton in Dreamer, 2018). V primerjalni študiji sekvenciranja različnih virusov z različnimi načini nanopore sekvenciranja s sekvenatorjem MinION ter Illumina sekvenciranja s sekvenatorjem MiSeq je imela tehnologija sekvenciranja z nanoporami zelo primerljive rezultate s tehnologijo Illumina, ko smo vzorcem odstranili ribosomalno RNA ter uporabili cDNA-PCR kit (SQK-PCS108, Oxford Nanopore Technologies) (Pecman in sod., 2022). Kumulativne diagnostične vzorce iz leta 2021 smo sekvencirali z načinom odstranitve ribosomalne RNA in cDNA-PCR barcoding kitom (SQK-PCB109, Oxford Nanopore Technologies) na MinION napravi ter vzporedno s tehnologijo Illumina na sekvenatorju NovaSeq6000.

## 2.1 Izbira in priprava vzorcev

Izbrali smo vzorce rastlin z različnimi bolezenskimi znamenji. Glede na vrsto rastlin smo 39 vzorcev združili v 6 kumulativnih vzorcev (1x paprike, 1x bučevke, 4x paradižniki). Ekstrahirani celokupni RNA smo odstranili ostanke DNA z DNazno reakcijo (DNase I set, Zymo Research), nato pa še ribosomalno RNA z RiboMinus™ Plant Kit for RNA-Seq (Invitrogen) kitom. Del vsakega kumulativnega vzorca RNA smo poslali zunanjemu izvajalcu za sekvenciranje na Illumina platformi (sekvenator NovaSeq6000). Drugemu delu vsakega kumulativnega vzorca RNA pa smo dodali polyA rep (NEB# M0276) ter s polyA-RNA pripravili knjižnico s kitom cDNA-PCR Barcoding (SQK-PCB109, Oxford Nanopore Technologies) in to sekvencirali z MinION sekvenatorjem na eni pretočni celici tipa R9.4.1 (flowcell R9.4.1).

## 2.2 Bioinformatična primerjalna analiza zaznavanja virusov

HTS podatke obeh načinov sekvenciranja smo bioinformatično obdelali ter za namene primerjave izenačili število pridobljenih nukleotidov na enako število za obe metodi. Nato smo izvedli kartiranje proti referenčni bazi vseh virusov (RefSeq - viruses), pridobljenih iz baze nukleotidnih sekvenc NCBI (5.11.2021). Kartiranje podatkov Illumina smo izvedli s programom CLC Genomic Workbench (Pecman in sod., 2017), kartiranje podatkov MinION pa s programom minimap2 (Pecman sod., 2022). Kot rezultat smo podali povprečno globino sekvenciranja (število nukleotidov, ki se v povprečju kartira na en nukleotid v genomu virusa) ter delež pokritosti referenčnega genoma z odčitki prisotnih virusov (preglednica 1). Kot spodnjo mejno vrednost zaznave virusa smo določili > 30% pokritosti referenčnega genoma z odčitki.

## 3 REZULTATI S SKLEPI

Primerjalna analiza je pokazala, da so rezultati sekvenciranja z nanoporami na sekvenatorju MinION primerljivi rezultatom, ki jih dobimo s sekvenciranjem Illumina. Primerjava deleža pokritosti referenčnega genoma je za večino virusov visoko primerljiva, medtem ko je primerjava povprečne globine sekvenciranja za referenčne genome v večini primerov boljša pri uporabi tehnologije sekvenciranja z nanoporami (MinION, Oxford Nanopore Technologies) (preglednica 1). V prihodnosti bomo določili mejne vrednosti te metode za zaznavo izbranih karantenskih virusov ter tako zagotovili območje zanesljivosti metode. Visokozmogljivo sekvenciranje je navsezadnje edino orodje, ki omogoča netarčno iskanje virusov in viroidov ter hkrati tudi njihovo identifikacijo. Poleg tega pa je ustrezno za iskanje tako nepričakovanih, kot tudi novih virusov. V preteklosti (Pecman in sod., 2018; Mehle in sod., 2018, 2020; Rivarez in sod., 2021) smo z uporabo te tehnologije zaznali številne viruse, ki bi bili s tarčnimi metodami lahko spregledani.

Vpeljava sekvenciranja z nanoporami v lastnem laboratoriju s sekvenatorjem MinION (Oxford Nanopore Technologies) je pomembna, saj omogoča, da so rezultati analize na voljo bistveno hitreje. Rezultate analiz v primeru uporabe sekvenatorja MinION lahko zagotovimo v do desetih delovnih dneh (2 dni za pripravo vzorcev in knjižnice,

do 3 dni za sekvenciranje in do 5 dni za analizo podatkov), medtem ko v primeru uporabe sekvenciranja Illumina približno v dveh mesecih (1 dan za pripravo vzorcev, do 6 tednov za servis sekvenciranja, ter 2 dni za obdelavo rezultatov). Z uporabo te tehnologije in hitrimi ter zanesljivimi rezultati lahko preprečimo vnos novih nevarnih patogenov v državo in regijo ter njihovo širjenje v nasadih.

Preglednica 1: Rezultati primerjalne analize sekvenciranja. Za vsak zaznani virus v kumulativnem vzorcu je podana povprečna globina sekvenciranja in delež pokritosti referenčnega genoma z odčitki.

Vzorec	Zaznan virus	NovaSeq6000 (Illumina)		MinION (Oxford Nanopore Technologies)	
		Povprečna globina sekvenciranja	Delež pokritosti referenčnega genoma z odčitki [%]	Povprečna globina sekvenciranja	Delež pokritosti referenčnega genoma z odčitki [%]
Kumulativni vzorec paprik	BPEV	1,6	57,9	8,3	89,5
	PVY	31,9	86,9	18,3	90,9
	BBWV1	4,4	77,7	23,0	90,7
	CMV	129,6	98,7	446,0	100,0
	CMV-RNA satellite	188,5	95,5	1672,6	100,0
	AMV 1	11,0	90,5	92,3	98,6
Kumulativni vzorec bučevk	CMV	1217,2	99,5	4059,6	100,0
	ZYMV	78,7	99,8	162,1	99,0
	CABYV	3,3	90,0	0,7	41,9
Kumulativni vzorec paradižnikov 1	ToFBV	7,8	82,0	67,8	77,1
	PVY	2,9	86,8	10,0	99,0
	TSWV	5,1	94,3	10,0	72,1
	PVS	35,9	99,5	253,2	100,1
Kumulativni vzorec paradižnikov 2	CMV	203,3	99,0	290,5	100,0
	CMV-RNA satellite	2,6	87,8	29,6	100,3
	TSWV	17,9	98,9	51,4	96,4
	STV	1,3	58,1	2,2	34,4
Kumulativni vzorec paradižnikov 3	TSWV	1,5	63,5	1,9	48,2
	ToMV	23,3	99,7	129,6	99,9
Kumulativni vzorec paradižnikov 4	CMV	284,5	99,3	800,9	99,9

BPEV: endornavirus paprike (bell pepper endornavirus); PVY: virus Y krompirja (potato virus Y); BBWV1: broad bean wild virus 1; CMV: virus mozaika kumare (cucumber mosaic virus); AMV: virus mozaika lucerne (alfalfa mosaic virus); ZYMV: virus rumenega mozaika bučke (zucchini yellow mosaic virus); CABYV: z listnimi ušmi prenosljivi virus rumenice buče (cucurbit aphid-borne yellows virus); CrMEV: cucumis melo endornavirus; ToFBV: tomato fruit blotch virus; TSWV: virus pegavosti in uvelosti paradižnika (tomato spotted wilt virus); PVS: virus S krompirja (potato virus S); STV: južni virus paradižnika (southern tomato virus); ToMV: virus mozaika paradižnika (tomato mosaic virus).

Na Nacionalnem inštitutu za biologijo aktivno sodelujemo pri oblikovanju mednarodnih smernic na področju uporabe visokozmogljivega sekvenciranja. Smernice smo skupaj s kolegi iz tujine oblikovali v okviru EU projekta Valitest, ki je sedaj osnova za pripravo standarda v okviru evropske in mediteranske organizacije za varstvo rastlin (European and Mediterranean Plant Protection Organization; EPPO) pri kateri tudi aktivno sodelujemo.

#### 4 ZAHVALA

Avtorji se zahvaljujemo vzorčevalcem (preglednikom in fitosanitarnim inšpektorjem) za nabrane vzorce, Jakobu Brodariču in Tjaši Jakomin za priprave vzorcev do vključno izolacije RNA, vsem soavtorjem v do sedaj objavljenih člankih o najdenih virusih ter financerjem: Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano ter Javni agenciji za raziskovalno dejavnost RS (P4-0165). Primerjalne študije določanja s HTS potekajo v okviru različnih Euphresco projektov in v okviru aplikativnega ARRS projekta NanoPhyto (L7-2632). Smernice določanja s HTS pa smo oblikovali v okviru EU projekta Valitest.

#### 5 LITERATURA

- Branton, D., Deamer, D. 2018. The Development of Nanopore Sequencing in Nanopore Sequencing, ed. Branton, D., and Deamer, D. (World Scientific, <https://doi.org/10.1142/10995>). 1–16.
- GOV, Škodljivi organizmi rastlin, <https://www.gov.si/teme/skodljivi-organizmi-rastlin/> (25.3.2022)
- Kutnjak, D., Silvestre, R., Cuellar, W., Perez, W., Müller, G., Ravnikar, M., Kreuze, J. 2014. Complete Genome Sequences of New Divergent Potato Virus X Isolates and Discrimination between Strains in a Mixed Infection Using Small RNAs Sequencing Approach. *Virus Research* 191: 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.07.012>.
- Mehle, N., Kutnjak, D., Tušek Žnidarič, M., Ravnikar, M. 2019. First report of Apium virus y and carrot thin leaf virus in parsley in Slovenia. *Plant Disease*, 103(3), 592.
- Mehle, N., Kutnjak, D., Jakoš, N., Seljak, G., Pecman, A., Massart, S., Ravnikar, M. 2020. First report of cucurbit aphid-borne yellows virus in *Cucurbita pepo* and *Cucurbita maxima* in Slovenia. *Plant Disease*, 104(2), 599-599.
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., Ravnikar, M. 2017. Next Generation Sequencing for Detection and Discovery of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches. *Frontiers in Microbiology* 8 (OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>.
- Pecman, A., Kutnjak, D., Mehle, N., Tušek Žnidarič, M., Gutiérrez-Aguirre, I., Pirnat, P., Adams, I., Boonham, N., Ravnikar, M. 2018. High-Throughput Sequencing Facilitates Characterization of a 'Forgotten' Plant Virus: The Case of a Henbane Mosaic Virus Infecting Tomato. *Frontiers in Microbiology* 9 (November): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02739>.
- Pecman, A., Adams, I., Gutiérrez-Aguirre, I., Fox, A., Boonham, N., Ravnikar, M., Kutnjak, D. 2022. Systematic comparison of nanopore and Illumina sequencing for the detection of plant viruses and viroids using total RNA sequencing approach. *Frontiers in Microbiology* (accepted).
- Rivarez, M. P. S., Kogej, Z., Jakoš, N., Pecman, A., Seljak, G., Vučurović, A., Mehle, N., Ravnikar, M., Kutnjak, D. 2021. First Report of Ranunculus white mottle ophiovirus in Slovenia in Pepper with yellow leaf curling symptom and in Tomato. *Plant Disease*. doi: 10.1094/PDIS-08-21-1624-PDN.