

VALIDACIJA VISOKOZMOGLJIVEGA SEKVENCIRANJA Z NANOPORAMI ZA UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KARANTENSKIH ŠKODLJIVIH VIRUSOV V VZORCIH PARADIŽNIKA

Veronika BUKVIČ¹, Nataša MEHLE², Anja PECMAN³, Ana VUČUROVIČ⁴, Irena
BAJDE⁵, Jakob BRODARIČ⁶, Maja RAVNIKAR⁷, Denis KUTNJAK⁸

¹⁻⁸ Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

¹ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

² Univerza v Novi Gorici, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo

IZVLEČEK

600

Kmetijstvo se sooča s številnimi izzivi, kot so hitro prilagajanje na podnebne spremembe, naraščanje prebivalstva in povečan pretok blaga, kar pomeni tudi večjo možnost širjenja rastlinskih bolezni in škodljivcev. Karantenski povzročitelji bolezni, ki v EU niso navzoči ali so navzoči v omejenem obsegu, predstavljajo veliko tveganje za kmetijstvo, zaradi svoje invazivnosti ob vnosu v novo okolje in negativnih vplivov na gospodarstvo, biotsko raznovrstnost in družbo. Med njimi so številni virusi, za katere ni niti vpeljanih niti razvitih ustreznih tarčnih diagnostičnih metod, s katerimi bi lahko zanesljivo in pravočasno določili prisotnost virusa, kar je nujno za učinkovito preprečevanje širjenja bolezni. Ker bi bil razvoj posameznih tarčnih metod za vse te viruse časovno in cenovno precej potraten, smo v diagnostiko vpeljali metodo visokozmogljivega sekvenciranja z nanoporami z uporabo naprave MinION (Oxford Nanopore Technologies), s katero lahko določimo nukleotidno zaporedje vsem nukleinskim kislinam v preiskovanih vzorcih in tako znotraj ene preiskave netarčno zaznamo tudi morebitne viruse. Celoten postopek smo validirali v skladu s smernicami evropske in mediteranske organizacije za zaščito rastlin (EPPO PM7/98 in PM7/151) na primeru določanja virusa blage lisavosti paradižnika (tomato mild mottle virus; rod *Ipomovirus*) v listih paradižnika in s tem pripravili podlago za vključitev tega diagnostičnega postopka na seznam akreditiranih metod po ISO 17025. Rezultati naše validacije, ki jih predstavljamo v prispevku, so na voljo tudi ostalim laboratorijem v EPPO podatkovni bazi (https://dc.eppo.int/validation_data/validationlist), pripravili pa smo tudi diagnostični

¹ str. sod., Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana; Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: veronika.bukvic@nib.si

² doc. dr. Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana; Dvorec Lanthieri, Glavni trg 8, 5271 Vipava

³ dr., Večna pot 121, SI-1000 Ljubljana

⁴ dr., prav tam

⁵ str. sod., prav tam

⁶ str. sod., prav tam

⁷ prof. dr., prav tam

⁸ dr., prav tam

protokol, ki bo kot primer vključen v EPPO smernice in na ta način v pomoč pri
peljavi te metode tudi v druge diagnostične laboratorije.

Ključne besede: HTS, visokozmogljivo sekvenciranje, karantenski škodljivi
organizmi, rastlinski virusi, nanopore, validacija

ABSTRACT

VALIDATION OF HIGH-THROUGHPUT NANOPORE SEQUENCING FOR DETECTION OF QUARANTINE VIRUSES IN TOMATO SAMPLES

Agriculture is facing many challenges, such as rapid adaptation to climate change, population growth and increased movement of goods, which also means a greater potential for the spread of plant diseases and pests. Quarantine pathogens, which are absent or present to a limited extent in the EU, pose a major risk to agriculture due to their invasiveness when introduced into a new environment and their negative impacts on the economy, biodiversity and society. They include a number of viruses for which no appropriate targeted diagnostic tests have been introduced or developed to reliably and timely identify the presence of the pathogen, which is essential to effectively prevent the spread of the disease. As the development of individual targeting tests for all these viruses would be time consuming and costly, we have introduced a high-throughput nanopore sequencing using MinION (Oxford Nanopore Technologies), which can determine the nucleotide sequence of all nucleic acids in samples, and thus detect potential viruses in a non-targeted manner and in a single assay. The whole procedure was validated according to the guidelines of the European and Mediterranean Plant Protection Organisation (EPPO PM7/98 and PM7/151) on the example of the detection of tomato mild mottle virus (genus *Ipomovirus*) in tomato leaves, thus providing the basis for the inclusion of this diagnostic procedure in the list of accredited methods according to ISO 17025. The results of our validation, which is presented in this paper, are also available to other laboratories in the EPPO database (https://dc.eppo.int/validation_data/validationlist) and we have also prepared a diagnostic protocol that will be included as an example in the EPPO guidelines and thus help to introduce this method to other diagnostic laboratories.

Key words: high-throughput sequencing (HTS), nanopores, plant virus, validation, quarantine pests

1 UVOD

Številni virusi so pomembni povzročitelji bolezni pri kulturnih rastlinah. Protivirusnih spojin za zdravljenje rastlin ni na voljo, a lahko z učinkovitimi ukrepi preprečimo ali omejimo širjenje bolezni. Ključni prvi korak za uspešno obvladovanje širjenja bolezni je identifikacija povzročitelja bolezni. Razvoj posameznih tarčnih metod za vse karantenske viruse, ki lahko na primer okužijo paradižnik, papriko in bučevke in na območju EU še niso prisotni, v primeru vnosa pa bi povzročili veliko gospodarsko škodo (Priloga II, del A Uredbe 2019/2072/EU, s spremembami), bi bil časovno in cenovno precej potraten. Metoda visokozmogljivega sekvenciranja (HTS) z

nanoporami je ena izmed netarčnih metod s katero lahko določimo nukleotidno zaporedje vsem nukleinskim kislinam v preiskovanih vzorcih, ne glede na dolžino fragmentov (Pecman, 2022). Metoda temelji na principu zaznavanja nukleinskih kislin z beljakovinskimi nanoporami, ki tvorijo kanale skozi tanko elektroprepustno membrano. Zaradi električnega polja, negativno nabite enoveržne nukleinske kisline prehajajo skozi luknjico pore. Ob prehodu se ustvarijo električni signali, ki jih meri in zabeleži prilagojeno integrirano vezje. Vsaka sprememba je specifična glede na nukleotidno bazo in na podlagi tega nastalega signala se določi specifično zaporedje DNA. Ker metoda omogoča uporabo črtnih kod, lahko analiziramo več vzorcev hkrati in s tem znižamo stroške preiskave (Oxford Nanopore Technologies, 2024). Da lahko metodo uporabimo za analizo uradnih vzorcev, mora biti validirana, zato smo validacijo izvedli v skladu z EPPO smernicami PM 7/98 in PM 7/151. Validacija je proces, s katerim določimo občutljivost, specifičnost, selektivnost in ponovljivost metode. Z validacijo postopka HTS od priprave vzorcev do bioinformatične analize smo pripravili podlago za vključitev tega diagnostičnega postopka na seznam akreditiranih metod po ISO 17025.

2 MATERIALI IN METODE

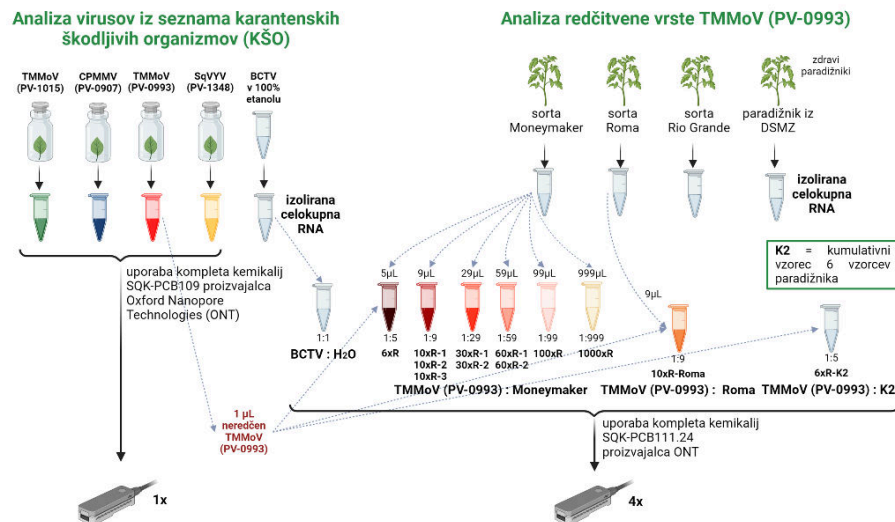
V referenčni podatkovni bazi, ki smo jo pridobili na spletni strani <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/viral/>, smo preverili prisotnost nukleotidnih zaporedij izbranih karantenskih virusov (Preglednica 1) in v primeru njihove odsotnosti le-te ročno dodali.

Preglednica 1: V tabeli so navedeni virusi, ki lahko ogrozijo pridelavo paradižnika, paprike in/ali bučevk in so v EU uvrščeni na seznam karantenskih škodljivih organizmov, za katere ni znano, da bi bili navzoči na ozemlju EU (Priloga II, del A Uredbe 2019/2072/EU, s spremembami). Nukleotidna zaporedja teh virusov so vključena v referenčno bazo.

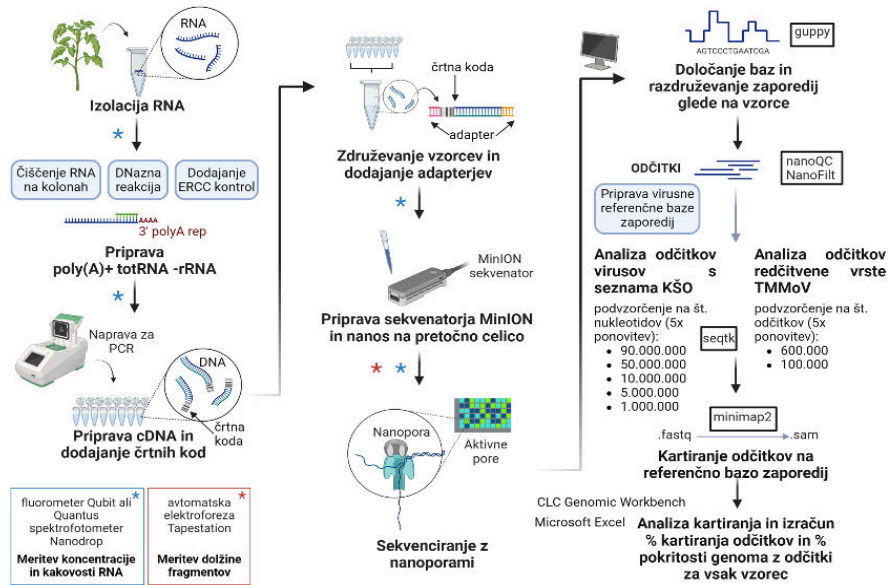
Slovensko ime virusa	Angleško ime virusa (družina, rod)	Oznaka virusa	Referenčna št. zaporedja
Virus kodrastih vršičkov pese	Beet curly top virus (<i>Geminiviridae</i> , <i>Curtovirus</i>)	BCTV	NC_001412.1
Infektivni virus rumenice solate	Lettuce infectious yellows virus (<i>Closteroviridae</i> , <i>Crinivirus</i>)	LIYV	NC_003617.1 in NC_003618.1
Virus blage lisavosti kitajskega fižola	Cowpea mild mottle virus (<i>Betaflexiviridae</i> , <i>Carlavirus</i>)	CPMMV	NC_014730.1
Z rumenenjem melone povezani virus	Melon yellowing associated virus (<i>Betaflexiviridae</i> , <i>Carlavirus</i>)	MYaV	NC_038324.1
Virus rumenenja žil buče	Squash vein yellowing virus (<i>Potyviridae</i> , <i>Ipomovirus</i>)	SqVYV	NC_010521.1

Virus blage lisavosti paradižnika	Tomato mild mottle virus (<i>Potyviridae</i> , <i>Ipomovirus</i>)	TMMoV	NC_038920.1
Virus čokoladnosti paradižnika	Tomato chocolate virus (<i>Secoviridae</i> , <i>Torradovirus</i>)	ToChV	FJ560490.1 in FJ560489.1
Virus marchitez paradižnika	Tomato marchitez virus (<i>Secoviridae</i> , <i>Torradovirus</i>)	ToMarV	NC_010987.1 in NC_010988.1

Zasnovali smo poskuse, ki so shematsko prikazani na Sliki 1. Najprej smo preverili, če lahko z vpeljanim postopkom HTS (Slika 2) zaznamo nukleinske kisline izbranih karantenskih virusov, ki se uvrščajo v različne družine/rodove. Za ta namen smo analizo HTS izvedli na izolatu BCTV, ki smo ga dobili od Omid Eini (Institut für Zuckerrübenforschung Abteilung Phytomedizin, Göttingen) ter na izolatih TMMoV PV-1015, CPMMV PV-0907, TMMoV PV-0993 in SqVYV PV-1348 iz zbirke DSMZ (The Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH). Občutljivost postopka HTS smo preverili na redčitveni vrsti izolata TMMoV PV-0993 (6x, 10x, 30x, 60x, 100x in 1000x redčitev je bila pripravljena v RNA izolirani iz listov paradižnika sorte Moneymaker). Za namen preverjanja ponovljivosti in selektivnosti postopka, smo 10x redčitev TMMoV PV-0993 pripravili tudi v RNA izolirani iz listov paradižnika sorte Roma, 6x redčitev pa v RNA kumulativnega vzorca šestih vzorcev paradižnika. Analizo smo opravili tudi za vzorce listov zdravih paradižnikov različnih sort.



Slika 1: Priprava vzorcev in načrt sekvenciranja. Kratice imen virusov so razložene v preglednici 1, postopek pa je natančneje obrazložen v besedilu. Slika ustvarjena v Biorender.com.



Slika 2: Potek dela od priprave vzorca za sekvenciranje do bioinformatične analize. Na desni strani slike so v črnih okvirjih navedena imena programov, ki smo jih uporabili za analizo podatkov. Slika ustvarjena v Biorender.com.

Laboratorijski del postopka HTS smo izvedli po protokolu Pecman in sod. (2024) (Slika 2). Celokupno RNA smo iz vzorcev izolirali s kompletom kemikalij RNeasy Plant Mini Kit, po modificiranem protokolu proizvajalca Qiagen (brez dodatka 2-merkaptotetanolu in z dvakratno elucijo v 50 µl (skupaj 100 µl) predhodno segrete (65 °C) vode brez RNaz). Sledilo je čiščenje RNA na kolonah (RNA Clean & Concentrator-5 kit, Zymo Research) in DNazna reakcija (RNase-Free DNase Set, Qiagen in RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). Temu je sledilo dodajanje ERCC kontrole (ERCC RNA Spike-in Mix, Invitrogen) po navodilih proizvajalca. Nato smo pripravili poliadenilirano RNA (*E. coli* Poly(A) Polymerase, NEB) z odstranjenimi ribosomalno RNA (RiboMinus Plant Kit for RNA-Seq, Invitrogen) in s tem vstopili v proces priprave knjižnice cDNA in dodajanja črtnih kod k vsakemu vzorcu, da smo jih lahko združili za sekvenciranje. Sledili smo navodilom proizvajalca Oxford Nanopore Technologies (ONT) in uporabili komplet kemikalij SQK-PCB109 oziroma SQK-PCB111.24. Tik pred nanosom na pretočno celico smo dodali še adapterje, ki omogočajo vezavo DNA s površino pretočne celice. Pretočno celico verzije R9.4.1 (FLO-MIN106D) in sekvenator MinION smo pripravili in zagnali sekvenciranje v programu MinKNOW po navodilih proizvajalca. Skozi celoten proces priprave vzorca za sekvenciranje smo merili koncentracijo in kakovost RNA ali DNA na fluorometru Qubit (Thermo Fisher Scientific) ali fluorometru Quantus (Promega) in spektrofotometru Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), pred nanosom na pretočno celico pa smo pomerili še dolžino fragmentov na Bioanalyzer (Agilent) ali TapeStation (Agilent), da smo lahko vzorce združili

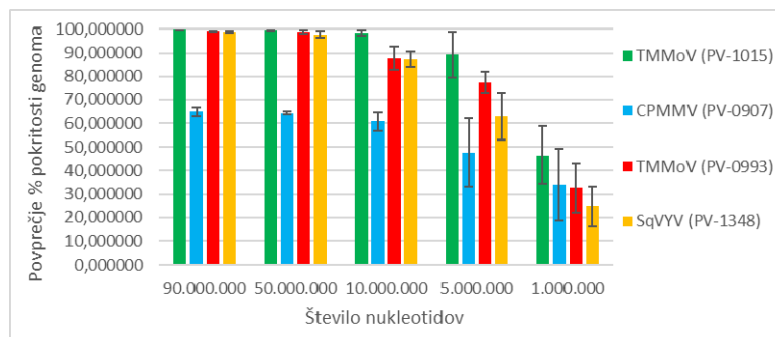
ekvimolarno. Po končanem sekvenciranju je sledilo določevanje baz in razdruževanje glede na vzorce s programom Guppy.

Kakovost odčitkov smo preverili s programom NanoQC in jih glede na kakovost koncev in dolžino odčitkov, ki smo jo dobili iz statističnega povzetka (NanoStat), porezali z NanoFilt programom. Odčitke pri analizi izbranih virusov smo v petih tehničnih ponovitvah podvzorčili s programom Seqtk na število nukleotidov, ki so navedena na Sliki 2. Odčitke pri analizi redčitvene vrste TMMoV PV-0993 smo v petih ponovitvah podvzorčili s programom Seqtk na 100.000 in 600.000 odčitkov. Za takšno število odčitkov smo se odločili, ker je bilo, glede na predhodne izkušnje, pri uporabi kompleta kemikalij SQK-PCB109 najnižje pričakovano število vseh surovih odčitkov na knjižnico («output») 100.000 in pri uporabi kompleta kemikalij SQK-PCB111.24 600.000. Odčitke po koraku rezanja z NanoFilt in podvzorčene odčitke smo s programom Minimap2 kartirali na dopolnjeno referenčno podatkovno bazo in datoteke kartiranja uvozili v program CLC Genomic Workbench, kjer smo za vsak vzorec ali podvzorec dobili podatke o številu kartiranih odčitkov, iz katerih smo izračunali % kartiranih odčitkov in podatke o pokritosti referenčnega genoma z odčitki, iz katerih smo izračunali % pokritosti genoma z odčitki. Pri obeh analizah smo za vsak podvzorec iz 5 ponovitev izračunali povprečne vrednosti in standardni odklon.

Ustreznost izvedbe smo kontrolirali na različnih nivojih postopka in z v nadaljevanju navedenimi kontrolami. *Phaseolus vulgaris* endornavirus (PvEV 1, PvEV 2 in PvEV3) je služil kot negativna in pozitivna kontrola celotnega postopka od priprave vzorca do bioinformatične analize. Z RNA kontrolnim vzorcem proizvajalca Oxford Nanopore Technologies (kontrola RCS) smo spremljali uspešnost priprave knjižnice in sekvenciranja. ERCC kontrola, ki je bila dodana vsem vzorcem in tudi PvEV, pa je služila kot dodatna pozitivna kontrola od DNazne reakcije naprej.

3 REZULTATI

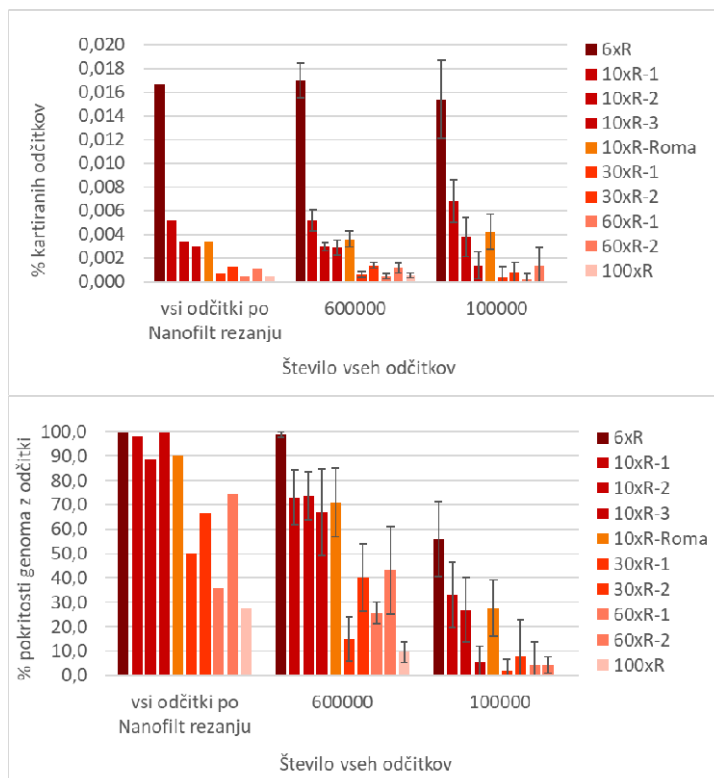
Z uvedenim postopkom na osnovi sekvenciranja z nanoporami smo zaznali vseh pet proučevanih virusov, ki se uvrščajo v različne družine/rodove. Da bi pridobili vpogled v občutljivost metode, smo v nadaljevanju podatkovne sete za štiri viruse nadalje podvzorčili in preverili kako se z zmanjševanjem količine podatkov spreminja % pokritosti genomov posameznih virusov (Slika 3).



Slika 3: Graf prikazuje povprečje % pokritosti genoma z odčitki, izračunano iz 5 ponovitev za vsak podvzorec, s pripadajočimi standardnimi odkloni.

Ugotovili smo, da se pokritost genoma z zmanjševanjem količine podatkov niža, a smo pri podvzorčenju na 1 milijon vseh nukleotidov, še vedno zanesljivo zaznali vsa zaporedja izbranih virusov.

V vzorcu TMMoV, ki smo ga redčili v kumulativnem vzorcu 6 paradižnikov smo tako pri podvzorčenju na 600.000, kot pri podvzorčenju na 100.000 odčitkov, uspešno zaznali prisotnost nukleinskih kislin TMMoV. V vzorcu TMMoV (PV-0993) redčenem 1000x virusnih zaporedij zaradi prevelike redčitve nismo zaznali. Pri 100.000 odčitkih je največja redčitev TMMoV, ki je še dala pozitivni rezultat 60x, pri 600.000 odčitkih pa smo TMMoV zaznali tudi v 100x redčenem vzorcu TMMoV (Slika 4). Bistvenih razlik v primeru redčitev TMMoV v različne matrikse nismo opazili. V listih zdravih paradižnikov različnih sort, nukleinskih kislin virusov nismo zaznali.



Slika 4: Graf levo prikazuje % kartiranih odčitkov za vse odčitke po Nanofilt koraku in povprečje % kartiranih odčitkov za obe podvzorčenji, izračunano iz 5 ponovitev s pripadajočimi standardnimi odkloni. Graf desno prikazuje % pokritosti genoma z odčitki za vse odčitke po Nanofilt koraku in povprečje % pokritosti genoma z odčitki, izračunano iz 5 ponovitev s pripadajočimi standardnimi odkloni. Legenda prikazuje oznake vzorcev, ki so bolj natančno razložene na sliki 1.

4 SKLEPI

V diagnostični postopek smo vpeljali metodo visokozmogljivega sekvenciranja z nanoporami s katero lahko netačno zaznamo prisotnost nukleinskih kislin virusov. Pripravili smo referenčno bazo, ki vključuje nukleotidna zaporedja virusov, ki lahko ogrozijo pridelavo paradižnika, paprike in bučevk in so uvrščeni na seznam karantenskih škodljivih organizmov za katere ni znano, da bi bili navzoči na ozemlju EU.

Dokazali smo, da lahko z uporabljenimi metodami odčitke virusa TMMoV zaznamo tudi v 100x redčenemu vzorcu TMMoV (PV-0993).

Test je validiran v skladu s smernicami EPPO PM7/98 in PM7/151 (podrobnejši rezultati so na voljo na spletni strani: https://dc.eppo.int/validation_data/validationlist).

Metoda bo kot primer vključena v priložo nove verzije standarda EPPO PM 7/151.

5 ZAHVALA

Poskusi so bili izvedeni v okviru strokovne naloge s področja zdravstvenega varstva rastlin katere naročnik in plačnik je Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) in v okviru slovensko-hrvaškega raziskovalnega projekta L7-2632, ki je financiran s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) in Hrvaške znanstvene fundacije (HRZZ). Slovenski del projekta sta poleg ARIS financirala tudi MKGP in BIA d.o.o.

6 LITERATURA

Izvedbena uredba Komisije (EU) 2019/2072 (s spremembami) z dne 28. novembra 2019 o določitvi enotnih pogojev za izvajanje Uredbe (EU) 2016/2031 Evropskega parlamenta in Sveta, kar zadeva ukrepe varstva pred škodljivimi organizmi rastlin, ter razveljavitvi Uredbe Komisije (ES) št. 690/2008 in spremembi Izvedbene uredbe Komisije (EU) 2018/2019. Dostopno na: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2019/2072/2023-10-09 (11. 4. 2024)

Oxford Nanopore Technologies. How nanopore sequencing works. Dostopno na: <https://nanoporetech.com/platform/technology> (15.3.2024)

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*. doi: 10.3389/fmicb.2022.883921

Pecman, A., Mehle, N., Kutnjak, D. 2024. Detection of Plant Viruses Using Nanopore Sequencing Based Metagenomic Approach. *Viral Metagenomics. Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-0716-3515-5_17

PM 7/151 (1) Considerations for the use of high throughput sequencing in plant health diagnostics. 2022. *EPPO Bulletin*, 52, 619–642. Available from: <https://doi.org/10.1111/epp.12884>

PM 7/98 (5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. 2021. *EPPO Bulletin*, 51: 468–498. doi: 10.1111/epp.12780