

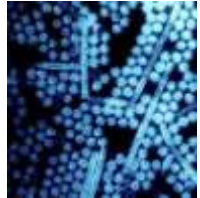
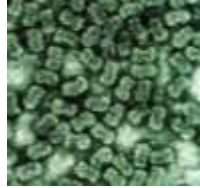
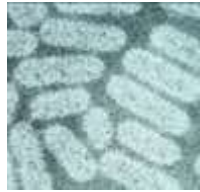
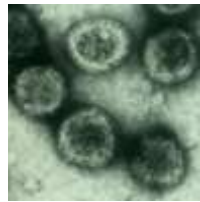
# Analýza rastlinných vírusov v ére sekvenovania novej generácie (NGS): dopad na diagnostiku a štúdium ich epidemiológie.

Miroslav Glasa, Lukáš Predajňa

*Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava*



# Rastlinné vírusy sa vyznačujú značnou diverzitou



## ➤ medzi vírusovými druhmi

- jedno-/dvojvláknový DNA alebo RNA genóm
- rôzne replikačné stratégie
- veľkosť genómu a jeho organizácia
- morfológia vírusových častíc
- mechanizmy prenosu

## ➤ v rámci jedného vírusu

- vysoká intra-špecifická variabilita kmeňov/izolátov

molekulárna (10-30% nukleotidová odlišnosť)

biologické a epidemiologické odlišnosti

vysoký adaptačný potenciál



plum pox virus, PPV (kmene infikujúce čerešne, PPV-C a -CR)  
prunus necrotic ringspot virus, PNRSV  
prune dwarf virus, PDV  
apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV  
cherry virus A, CVA  
little cherry virus-1, LChV-1 a  
little cherry virus-2, LChV-2  
arabis mosaic virus, ArMV



žiadny z diagnostikovaných vírusov



PDV + LChV-1



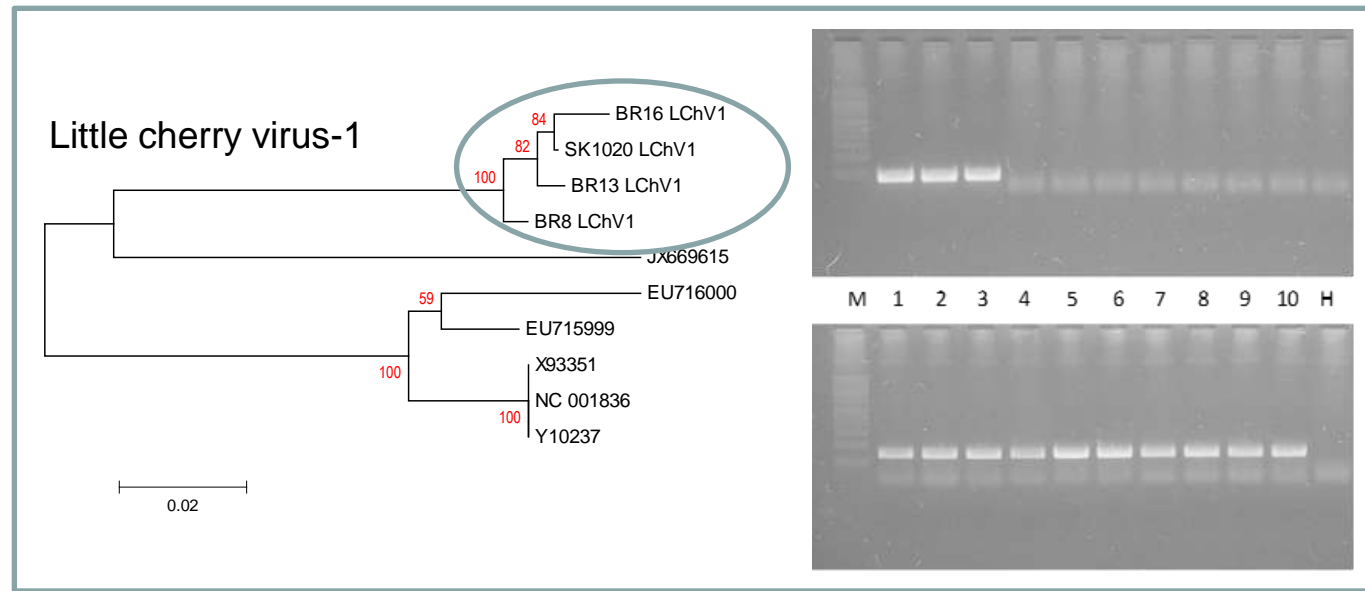


Grapevine virus A  
Grapevine leafroll associated virus-1  
Grapevine Syrah virus-1

- absencia príznakov  $\neq$  absencia patogéna
- v jednotlivých rastlinách sa veľmi často nachádzajú komplexy zahrňajúce viacero vírusov, čo komplikuje jasné určenie spojitosti symptóm – infekčný agent.



známa  
diverzita



- špecifická detekcia známeho vírusu v súčasnosti nie je náročná
  - ELISA, immuno-printing, lateral flow assays...
  - PCR v rôznych usporiadaniach (alebo RCA, isothermal amplification...)



- široká a polyvalentná detekcia, bez predchádzajúcich znalostí, je problematická
  - jediný test na diagnostiku všetkých fytovírusov neexistuje (žiadny plne konzervovaný gén)
  - vysoká vnútrodruhová variabilita vírusov
  - certifikačné a karanténne schémy nie vždy dostatočné



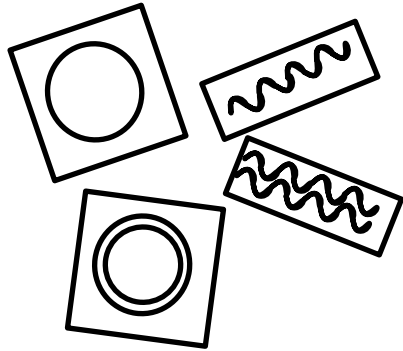
# Sekvenovanie novej generácie NGS

(next generation / high throughput/ deep sequencing)

- nešpecifické sekvenovanie
- generovanie obrovského množstva krátkych čítaní 20-400bp ( $10^5$ - $10^6$  v jednom behu)
- Nové aplikácie:
  - neskreslená analýza komplexnosti a diverzity vírusových populácií („viróm“)
  - metagenomické štúdiá vírusov priamo v ich prirodzených prostrediach
  - *de novo* sekvenácia
- Zvýšené nároky na cenu, technológiu (NGS platformy...) a bioinformatickú analýzu (oddelenie hostiteľských sekvencií, blast verejných databáz ...)

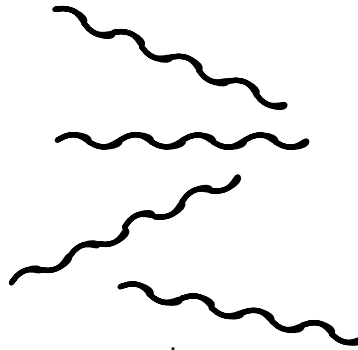


# Rôzne templáty pre NGS



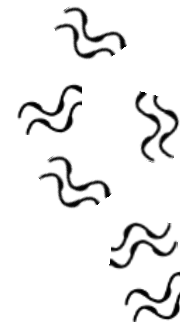
DNA / RNA  
extrakty z  
purifikovaných  
vírusových častíc

DNA & RNA  
vírusy



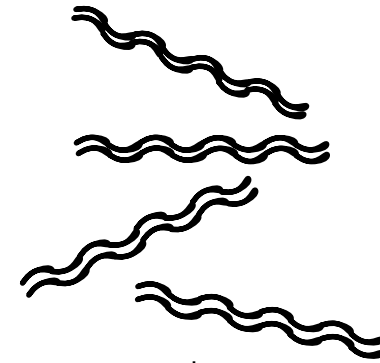
Totálna RNA,  
messenger RNA

DNA & RNA  
vírusy,  
viroidy



siRNA

DNA & RNA  
vírusy,  
viroidy



dvojvláknová RNA

RNA vírusy,  
viroidy





# NGS analýza viniča

cca 20-ročný vinič cv. Veltlínske zelené (SK30) v opustenom vinohrade na západnom Slovensku (Pezinok)



- predbežné testy (ELISA, RT-PCR) odhalili prítomnosť *Grapevine fleck virus*, *Arabis mosaic virus* a *Grapevine leafroll associated virus-1*

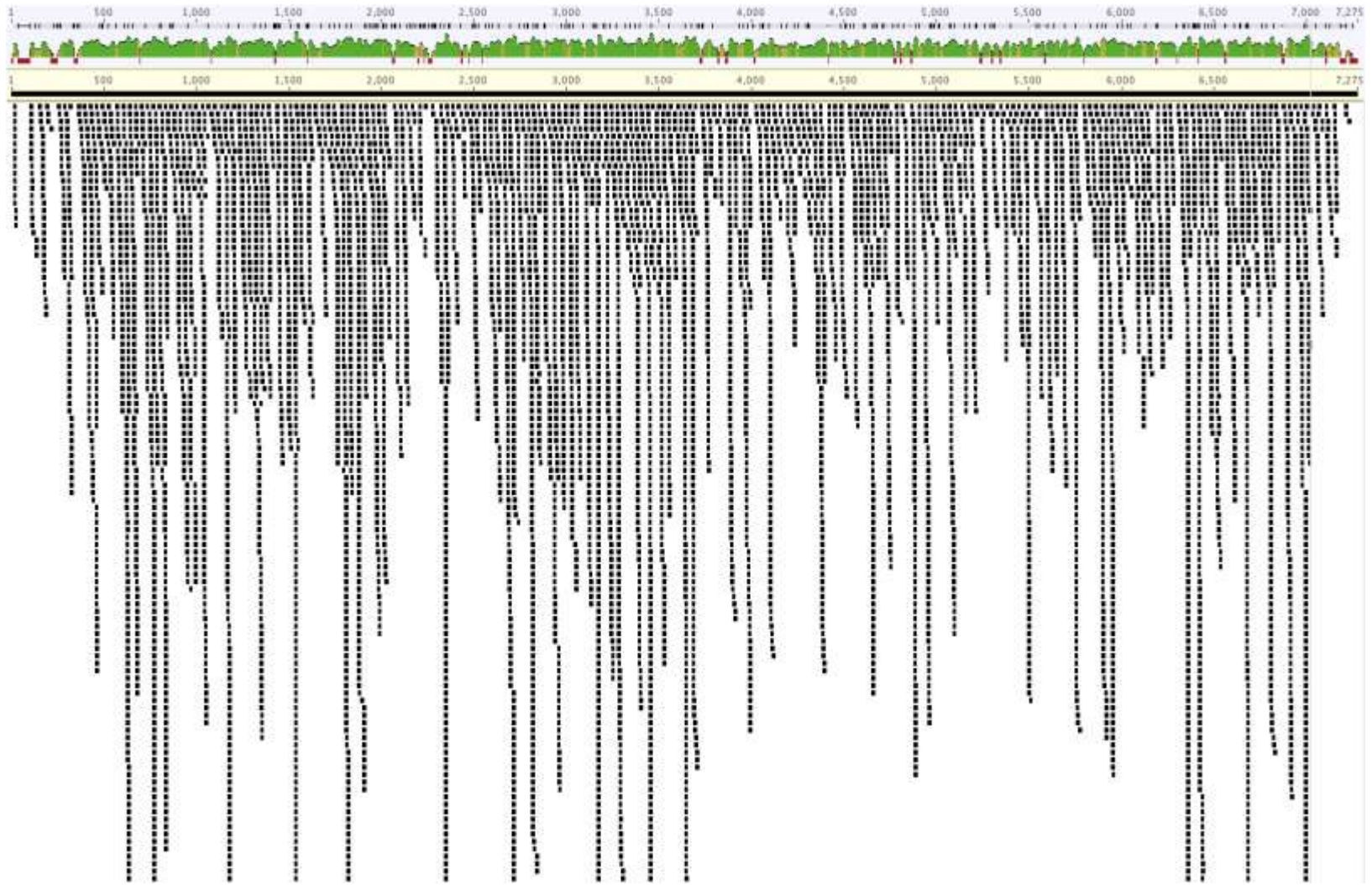
- siRNA next-generation sequence analysis (TrueSeq v.3 Illumina technology on a HiSeq 1000 equipment)
- bioinformatické nástroje: Geneious, CLC Genomics Workbench, Velvet

SK30 „viróm“:

- GFkV
- ArMV
- GLRaV-1
- GFLV (*G. fanleaf virus*)
- GLRaV-3 (*G. leafroll associated virus-1*)
- GRSPaV (*G. rupestris stem pitting v.*)
- GDefV (*G. deformation virus*)
- GPGV (*G. Pinot gris trichovirus*)**
- GSyV-1 (*G. Syrah virus-1 marafivirus*)**



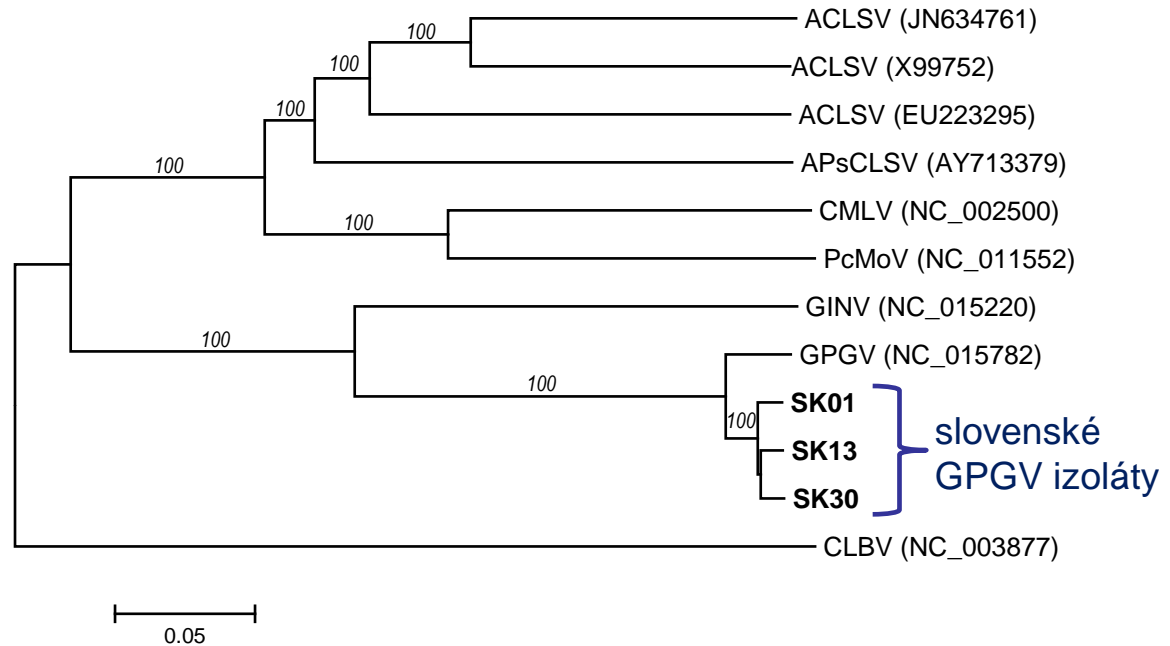
# Mapovanie SK30 siRNA čítaní (21-24 nt) oproti referenčnej GPGV sekvencii (NC\_015782)



# Grapevine Pinot gris virus (GPGV)

- prvýkrát identifikovaný v Taliansku v roku 2012
- asociovaný s chlorotickými škvrkami a deformáciou listov

*Fylogenetický strom marafivírusov generovaný z kompletných genomických sekvencií*

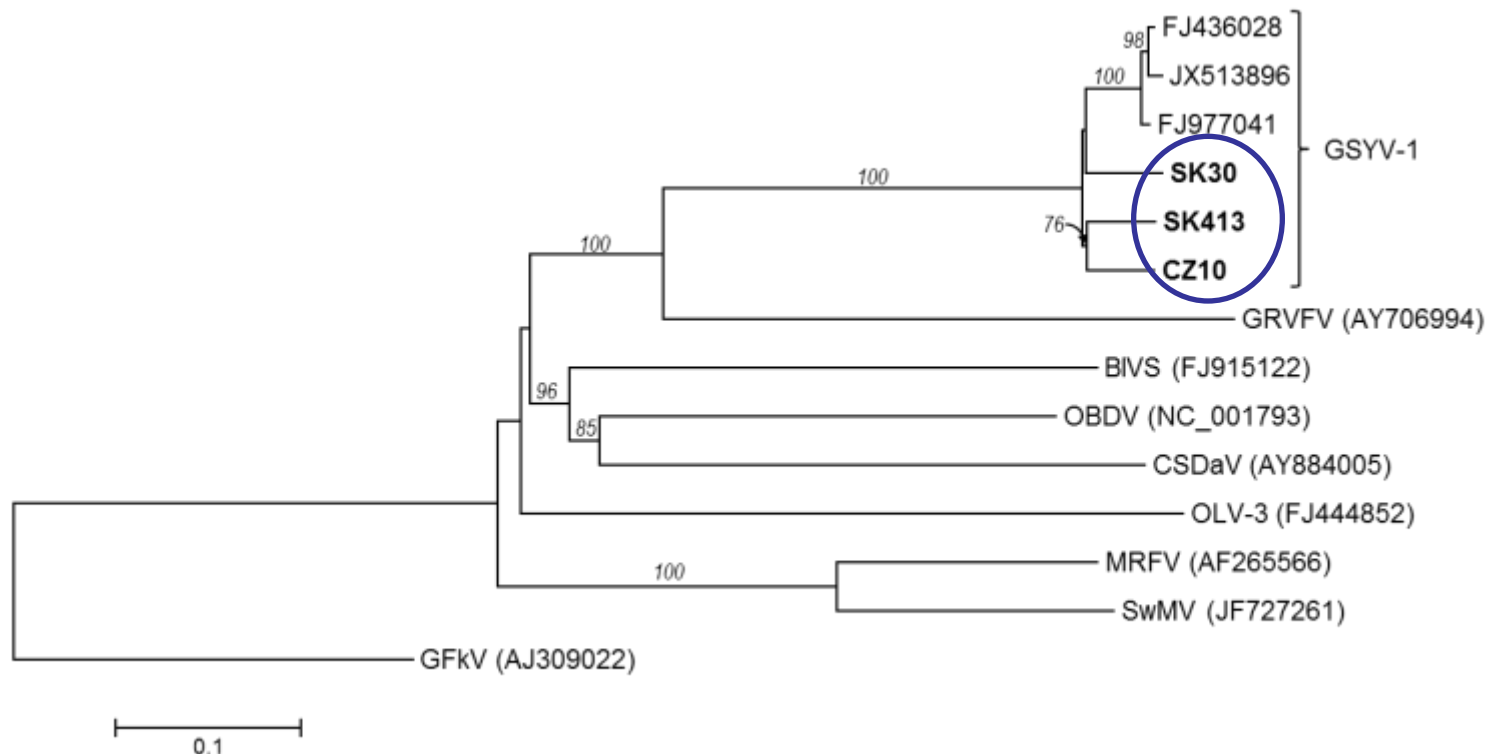


- slovenské GPGV izoláty formovali homogénny kluster (vzájomná divergencia dosahovala 1.7%)
- molekulárne odlišné od talianskeho izolátu (4.7 %)
- potenciálna rekombinácia s Grapevine inner berry virus (GINV)



# Grapevine Syrah virus-1 (GSyV-1)

- prvýkrát identifikovaný v USA (CA, MS) v roku 2009
- neznáma etiológia
- iba veľmi sporadické údaje z Európy (Taliansko, Francúzsko)



- slovenské a české GSyV-1 izoláty sú geneticky značne odlišné od severoamerických GSyV-1 a vyznačujú sa vyššou heterogenitou
- výsledky naznačujú možný európsky pôvod GSyV-1



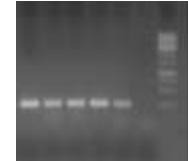
- dizajnované primery pre rutinnú diagnostiku s vylepšenou polyvalentnosťou
- novo vyvinutá RT-PCR umožnila identifikovať GPGV a GSyV-1 na Slovensku (Pezinok, Svätý Jur, Čachtice, Topolčianky, Zeleneč...) vo vysokej frekvencii (ca. 30% vzoriek infikovaných)

GPGV movement protein (MP) gene

GPG-5637F, 5'-ATTGCGGAGTTGCCTTCAAG-3', sense

GPG-5939R, 5'-CTGAGAAGCATTGTCCCATC-3', antisense

302 bp

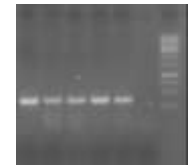


GPGV capsid protein (CP) gene

GPG-6609F, 5'-GAGATCAACAGTCAGGAGAG-3', sense

GPG-7020R, 5'-GACTTCTGGTGCCTTATCAC-3', antisense

411 bp

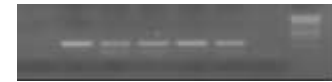


GSyV-1 capsid protein (CP) gene

SY5922F (5'-CCAATGGGTGCGCACTTGTTG-3', sense)

SY6295R (5'-ACTTCATGGTGGTGCCGGTG-3', antisense)

374 bp



- GPGV a GSyV-1 nájdené na rôznych odrodách (Veltlínske, Dornfelder, Muller Thurgau, Alibernet, André, Rizlink vlašský, Tramín, Rúbanka, Ametyst, Chrupka, Prim, Burgundské sivé, Svätovavrinecké ...) v rôznych agroekologických kontextoch
- žiadny špecifický symptomatologický znak GPGV alebo GSyV-1 infekcie (zmiešaná infekcia GLRaV-1 a -3, ArMV, GFkV, GRSPaV...)



# Závery

- nové a vynárajúce sa („emerging“) patogény alebo ich formy predstavujú potenciálnu hrozbu pre výsadby (otvorenie trhov, klimatické zmeny, zmeny spektra vektorov...)
- **2014 : Grapevine Pinot gris virus (vinič)**
- **2015 : Grapevine Syrah-1 virus (vinič)**
- **2015 : Little cherry virus-1 a -2 (čerešňa)**
- pravdepodobne dlhodobo etablované na Slovensku, v minulosti prehliadnuté
- reálny impakt na výsadby treba preveriť
- citlivá a špecifická diagnostika predstavuje základný nástroj pre identifikáciu pôvodcov ochorení a aplikáciu účinných preventívnych fyto-sanitárnych opatrení



## Závery

- NGS prináša neskreslený a kompletný pohľad na sanitárny stav vyšetrovanej vzorky
- urýchľuje čas medzi objavom nového vírusu a dostupnosťou diagnostického testu
- umožňuje zlepšiť polyvalentnosť molekulárnych testov (RT-PCR, LAMP) integráciou kompletnejšej informácie o vírusovej diverzite (napr. design primerov...)



## COST Action FA1407

Application of next generation sequencing for the study and diagnosis of plant viral diseases in agriculture



- vývoj a validácia NGS technologických štandardov pre diagnostiku rastlinných vírusov
- návrh decíznych schém pre diagnostiku vírusov
- zhodnotenie dopadu NGS na vírusovú taxonómiu a na interakcie vírus-rastlina





Ďakujem za pozornosť.



projektová podpora  
APVV-0174/12  
VEGA2/0060/13



© 2015

*Miroslav.Glasa@savba.sk*