

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2020 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania: Występowanie dotychczas nie monitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce.
Numer zadania: <i>(w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170 z późn. zm.))</i> 107
Planowany okres realizacji zadania: 2020 r.
Planowane nakłady w zł: 298 800

B. DANE WNIOSKODAWCY

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, (tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax)

Wiesław Aleksander Oleszek, prof. dr hab. czł. koresp. PAN
Dyrektor
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 700
fax: 81 4786 900

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Marcin Przybyś	dr	IUNG-PIB
wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Urszula Skomra	dr	IUNG-PIB
Grażyna Korbecka-Glinka	dr	IUNG-PIB
Teresa Doroszewska	prof. dr hab.	IUNG-PIB

2. Kierownik zadania

Marcin Przybyś, dr
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 934
tel. sekretariat: 81 4786 931
e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl

Kontakt w przypadku nieobecności kierownika zadania
Urszula Skomra, dr
Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin
ul. Czartoryskich 8
24-100 Puławy
tel. 81 4786 943

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel	Czy cel został zrealizowany (tak/nie ¹ /częściowo ¹)
1	Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania NGS cząsteczek RNA z próbek chmielu	tak
2	Sekwencjonowanie cząsteczek RNA z próbek chmielu	tak
3	Anaiza bioinformatyczna uzyskanych sekwencji	tak

2. Harmonogram realizacji zadania

¹ Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania NGS cząsteczek RNA z próbek chmielu	I-IV	136 000
2	Sekwencjonowanie cząsteczek RNA z próbek chmielu	III-VII	108 000
3	Anaiza bioinformatyczna uzyskanych sekwencji	V - XII	54 800
Razem			298 800

3. Opis tematów badawczych

3. 1. Temat badawczy 1

Cel tematu badawczego 1: Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania NGS cząsteczek RNA z próbek chmielu

Celem tematu badawczego jest uzyskanie bibliotek DNA przygotowanych z cząsteczek RNA pochodzących z próbek chmielu.

Cel tematu badawczego 1 został osiągnięty.

Materiały i metody

Ze zgromadzonych próbek chmielu pobieranych z polskich plantacji zlokalizowanych we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce: lubelskim, dolnośląskim, wielkopolskim, obejmujących odmiany typu gorzkiego i aromatycznego, wybrano 5 próbek, odważano po 50 mg materiału z kilku liści i umieszczano go w probówkach typu Eppendorf wypełnionych 6 kulkami ceramicznymi o średnicy 2,8 mm. Tak przygotowane próbki zamrażano w -86°C na okres 12 godzin. Po schłodzeniu próbki rozdrabniano w homogenizatorze Tissue Lyser (Qiagen, Niemcy) przy częstotliwości wytrząsania 30 Hz przez 3 minuty. Zhomogenizowany materiał poddawano izolacji całkowitego RNA z wykorzystaniem zestawów do izolacji RNA – RNeasy PowerPlant Kit (Qiagen), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Ponieważ liście chmielu zawierają znaczne ilości związków fenolowych, dlatego zredukowano objętość buforu lizującego MBL/ β -ME z 600 μl do 550 μl i dodano 50 μl Phenolic Separation Solution aby zapobiec tworzeniu się kompleksów kwasów nukleinowych z utlenionymi związkami fenolowymi, co powodowałoby zmniejszenie ilości izolowanego RNA.

Wyizolowane RNA doczyszczano z pozostałości DNA za pomocą zestawu DNase Max (Qiagen), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Następnie na drodze elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) wyznaczano RIN (RNA integrity number). Do kolejnych etapów wykorzystywano próbki o $\text{RIN} \geq 7$.

Do przygotowania bibliotek przygotowano rozcieńczenia RNA o stężeniu 0,5 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$. Następnie w celu pozbycia się z próbek rybosomalnego RNA (rRNA) przeprowadzono deplecję rRNA. W tym celu do roztworu RNA dodawano po 5 μl rRNA Binding Buffer oraz 5 μl rRNA Removal Mix – Plant. Mieszaninę poddawano denaturacji RNA w 65°C przez 5 minut, a następnie kontynuowano inkubację w temperaturze pokojowej przez 1

minutę. Następnie do 35 µl rRNA Removal Beads przenoszono 20 µl zdenaturowanego RNA i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 minutę, po czym próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 1 minutę. Supernatant po deplecji rRNA przenoszono do nowych probówek, dodawano po 99 µl kulek magnetycznych RNAClean XP (Beckman Coulter) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po okresie inkubacji próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut. Kiedy wszystkie kulki osiadły na ściance probówki cały supernatant odrzucano, a kulki przemywano 200 µl 70% etanolu, inkubowano przez 30 sekund, po czym cały supernatant odrzucano, a kulki suszono w temperaturze pokojowej przez 15 minut, po czym próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego. Do wysuszonych kulek dodawano 11 µl Elution Buffer i inkubowano przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie prowadzono fragmentację enzymatyczną cząsteczek. W tym celu próbki ponownie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut, po czym 8,5 µl supernatantu przenoszono do nowych probówek, dodawano do nich 8,5 µl Elute, Prime, Fragment High Mix i inkubowano przez 8 minut w 94°C, po czym schładzano do 4°C. Do schłodzonych próbek dodawano po 8 µl mieszaniny First Strand Synthesis Mix D z odwrotną transkryptazą SuperScript III (w stosunku 9:1) i inkubowano przez 10 minut w 25°C, następnie 15 minut w 46°C, przez 15 minut w 70°C i schładzano do 4°C.

Następnie prowadzono syntezę drugiej nici cDNA. Podczas syntezy drugiej nici cDNA matryca RNA jest usuwana i syntetyzowana zastępująca ją druga nić DNA. W tym celu, dodawano 5 µl 50-krotnie rozcieńzonego End Repair Control oraz 20 µl Second Strand Marking Master Mix i inkubowano 60 minut w 16°C. Po uzyskaniu dwuniciowego cDNA (ds cDNA) było ono poddawane oczyszczaniu przy użyciu kulek magnetycznych AMPure XP (Beckman Coulter), w celu oddzielenia ds cDNA od pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej, dlatego po inkubacji do próbek dodawano 90 µl AMPure XP beads i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, po czym próbki umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut. 135 µl supernatantu odrzucano, przemywano 200 µl 80% etanolu, inkubowano przez 30 sekund, supernatant odrzucano, a płukanie powtarzano. Po płukaniu supernatant odrzucano, a próbki suszono przez 15 minut i po tym czasie usuwano ze statywu magnetycznego. Do próbek dodawano 17,5 µl Resuspension Buffer, mieszaninę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 minuty i umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut. 15 µl supernatantu – dwuniciowego cDNA, przenoszono do nowych probówek. W efekcie uzyskano ds cDNA posiadający tępe końce. W celu wytworzenia lepkich końców ds cDNA poddawano 3' adenylacji. Do próbek dodawano po 2,5 µl 100-krotnie rozcieńzonego A-Tailing Control i 12,5 µl A-Tailing Mix i inkubowano w 37°C przez 30 minut, 5 minut w 70°C i schładzano do 4°C. Następnie prowadzono ligację adapterów Illumina, które zawierały sekwencje nukleotydowe znakujące poszczególne próbki DNA oraz umożliwiające im na przyłączanie się do płytki (flow cell) podczas procesu sekwencjonowania. Do próbek dodawano po 2,5 µl 100-krotnie rozcieńzonego Ligation Control, 2,5 µl Ligation Mix, i 2,5 µl RNA adapter Mix. Mieszaninę inkubowano w 30°C przez 10 minut, a następnie dodawano 5 µl Stop Ligation Buffer, w celu inaktywacji procesu przyłączania adapterów do sekwencjonowania. W celu oczyszczenia produktów ligacji adapterów do próbek dodawano po 42 µl AMPure XP Beads, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut, odrzucano 79,5 µl supernatantu, kulki przemywano 2-krotnie 200 µl 80% etanolu przez 30 sekund, a następnie suszono przez 15 minut. Po wyschnięciu kulek próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego, dodawano do nich po 52,5 µl Resuspension Buffer, inkubowano przez 2 minuty, po czym ponownie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut. Przenoszono po 50 µl supernatantu do nowych probówek i ponownie dodawano do nich po 50 µl AMPure XP Beads, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut, następnie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut, odrzucano 95 µl

supernatantu, kulki przemywano 2-krotnie 200 μ l 80% etanolu przez 30 sekund, a następnie suszono przez 15 minut. Po wyschnięciu kulek próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego, dodawano do nich po 22,5 μ l Resuspension Buffer, inkubowano przez 2 minuty, po czym ponownie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut i przenoszono 20 μ l supernatantu do nowych probówek.

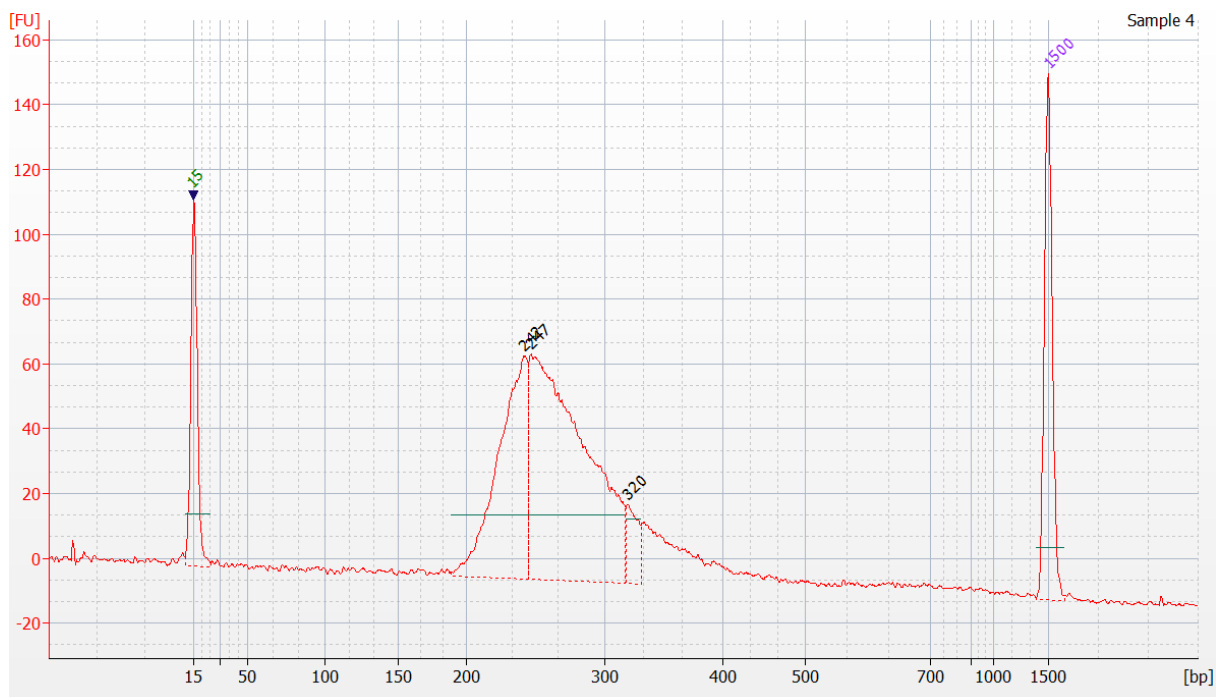
Aby reakcja sekwencjonowania przebiegała w sposób wydajny DNA z przyłączonymi adapterami Illumina wzbogacano w ograniczonej reakcji PCR. Do próbek dodawano po 5 μ l PCR Primer Cocktail, 25 μ l PCR Master Mix i prowadzono ograniczoną reakcję PCR: denaturacja wstępna 98°C przez 30 sekund, 15 cykli – denaturacja 98°C przez 10 sekund, przyłączanie starterów 60°C przez 30 sekund, elongacja 72°C przez 30 sekund, końcowa elongacja 72°C przez 5 minut. Po amplifikacji biblioteki oczyszczano poprzez dodanie po 50 μ l AMPure XP Beads i inkubację w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Po inkubacji próbki umieszczano na kolejne 5 minut w statywie magnetycznym, następnie odrzucano 95 μ l supernatantu, kulki przemywano 2-krotnie 200 μ l 80% etanolu przez 30 sekund, a następnie suszono przez 15 minut. Po wyschnięciu kulek próbki wyjmowano ze statywu magnetycznego, dodawano do nich po 32,5 μ l Resuspension Buffer, inkubowano przez 2 minuty, po czym ponownie umieszczano w statywie magnetycznym na 5 minut i przenoszono 30 μ l supernatantu do nowych probówek.

Wyniki

Ogółem w roku 2020 przygotowano 5 bibliotek DNA. Wśród próbek chmielu wykorzystanych do syntezy bibliotek trzy stanowiły próbki, w których w latach poprzednich potwierdzono obecność jednego z badanych patogenów. Dwie pozostałe pochodziły z roślin, w których nie stwierdzono obecności ArMV, HpLV, HSVd, AFCVd i CBCVd.

W celu określenia poprawności przebiegu wszystkich etapów ich przygotowania biblioteki przed sekwencjonowaniem poddano ocenie jakościowej i ilościowej. Ocena jakościowa odbywała się metodą elektroforezy kapilarnej prowadzonej na aparacie Bioanalyzer 2100 (Perlan Technologies) przy użyciu zestawu odczynników Agilent DNA 1000. Uzyskane elektroforegramy umożliwiły ocenę rozkładu wielkości fragmentów DNA w przygotowanych bibliotekach. (Ryc. 1)

Ocenę ilościową uzyskanych bibliotek przeprowadzono poprzez pomiar stężenia DNA w każdej z bibliotek metoda fluorymetryczną na aparacie Quantus (Promega) oraz przy użyciu zestawu dsDNA Quantifluor (Promega) (Tab. 1).



Ryc. 1. Elektroforeogram do oceny jakościowej uzyskanej biblioteki do NGS.

Tab. 1. Stężenia uzyskanych bibliotek z wykazem zastosowanych indexów RNA.

Biblioteka	RNA Index	Stężenie DNA [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]	Średnia wielkość biblioteki [nt]	Stężenie DNA [nM]
1_2020	AR007	16	255	95
2_2020	AR015	18	255	107
3_2020	AR012	12	255	71
4_2020	AR018	18	255	107
5_2020	AR006	11	250	67

Dyskusja

Metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oparte na masowym, równoległym sekwencjonowaniu różnorodnych cząsteczek RNA/DNA otwierają nowe możliwości wykrywania patogenów roślinnych. Największą zaletą tych metod jest brak konieczności zakładania *a priori* jaki wirus będzie wykrywany w czasie analiz. Sekwencjonowanie całkowitego RNA z rośliny zakażonej pozwala na identyfikację RNA wszystkich patogenów w toku analizy bioinformatycznej, przy czym zbiór wirusów i wiroidów zidentyfikowanych w zakażonych roślinach określa się terminem wiromu (ang. virome; Barba, i in., 2014). Alternatywną metodą badania infekcji wirusowych jest badanie wyciszania RNA – mechanizmu obronnego roślin przed zakażeniem, indukowanego podczas infekcji wirusami. Ten mechanizm może być wykorzystany do detekcji nowych wirusów. dsRNA występujące w komórkach rośliny podczas replikacji genomu wirusa jest przetwarzane przez białka Dicer-like do siRNA (małe interferujące RNA), których zadaniem jest znakowanie wirusowych cząsteczek RNA do degradacji (Valli et al. 2011). Oznaczanie sRNA (small RNA), w skład którego wchodzi również siRNA może więc zostać wykorzystane do oznaczania infekcji wirusowych.

W RNA wyizolowanym z rośliny dominują sekwencje gospodarza. Opracowano różne metody eliminacji poszczególnych frakcji roślinnego RNA z próbek (Boonham, i in.,

2014, Massart, i in., 2014). W badaniach realizowanych w ramach zadania wykorzystano technologię deplekcji – Ribo-Zero firmy Illumina, która w znacznym stopniu eliminuje rRNA chmielu.

Wnioski

- Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu umożliwia uzyskanie bibliotek do sekwencjonowania NGS

Mierniki dla tematu badawczego 1:

Lp.	miernik ²	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.1	Liczba przygotowanych bibliotek	5 bibliotek	5 bibliotek

3.2 Temat badawczy 2

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu badawczego było sekwencjonowanie cząsteczek RNA z próbek chmielu, a w efekcie uzyskanie sekwencji nukleotydowych, które w temacie badawczym 3 posłużą do przeprowadzenia analizy bioinformatycznej.

Cel tematu badawczego 2 został osiągnięty.

Materialy i metody

Uzyskane w temacie badawczym nr 1 biblioteki po walidacji jakościowej i ilościowej poddawano normalizacji stężeń. W pierwszym kroku określano stężenie poszczególnych bibliotek wyrażone w „nM”. Wykorzystano wzór:

$$\text{stęż. biblioteki w nM} = \frac{\text{stęż. w ng/}\mu\text{l}}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{średni rozmiar biblioteki}} \times 10^6$$

W przypadku uzyskanych bibliotek za średni rozmiar biblioteki przyjęto 255 lub 250 nukleotydów (tab. 1).

Po transformacji stężeń 5 bibliotek pochodzących z 2019 roku i 5 bibliotek uzyskanych w 2020 roku, rozcieńczano je w 10 mM Tris-HCl pH 8,5 do końcowego stężenia 4 nM.

W celu denaturacji dwuniciowej struktury DNA i uzyskaniu pojedynczych nici do 5 μl biblioteki o stężeniu 4 nM dodawano taką samą objętość 0,2 N roztworu NaOH. Krótco wortexowano i wirowano w temperaturze pokojowej przy 280 x g przez 1 minutę i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Następnie dodawano 990 μl schłodzonego buforu HT1 (Illumina), co powodowało uzyskaniem bibliotek o stężeniu 20 pM. Zdenaturowane biblioteki rozcieńczano następnie do stężenia 6 pM poprzez dodanie do 180 μl biblioteki o stężeniu 20 pM 420 μl schłodzonego buforu HT1 (Illumina). Równoległe z denaturacją bibliotek DNA prowadzono denaturację kontroli wewnętrznej procesu sekwencjonowania – PhiX (Illumina). Ponieważ dla optymalnego przebiegu sekwencjonowania zalecany jest 5% udział PhiX w bibliotece dlatego do 570 μl zdenaturowanej biblioteki DNA dodawano 30 μl kontroli PhiX. Po dokładnym

² Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

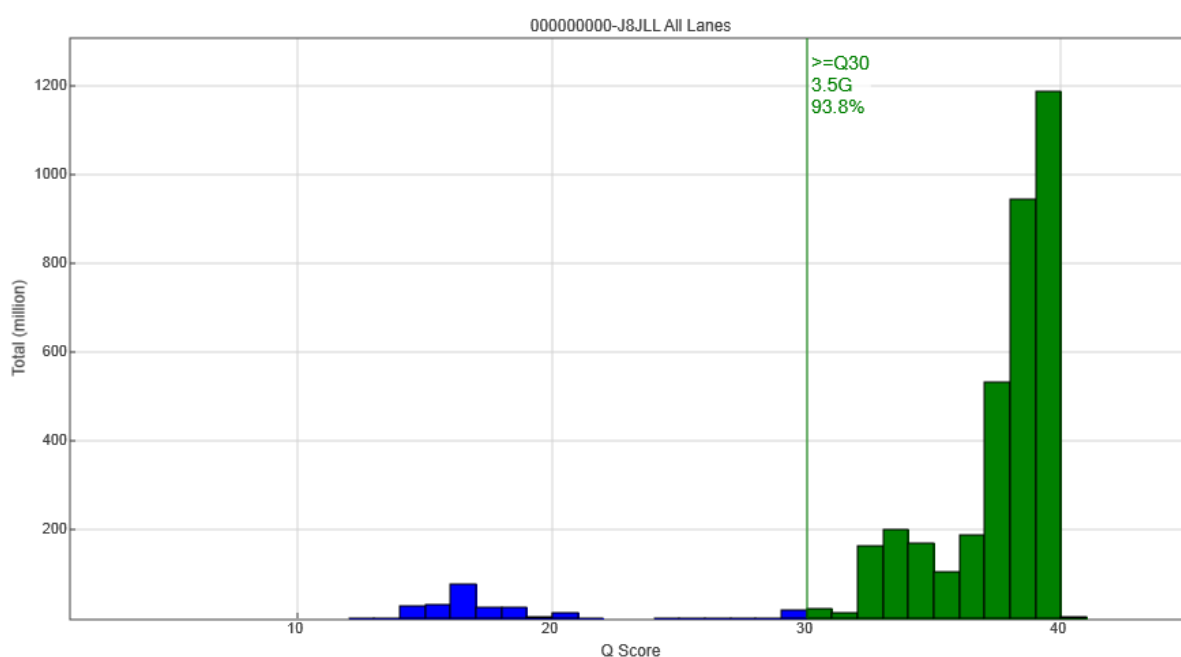
wymieszaniu bibliotekę ogrzewano w 96°C przez 2 minuty i natychmiast schładzano na lodzie. Po 5 minutowym schładzaniu biblioteki nakładano na sekwenator. Biblioteki sekwencjonowano pojedynczo w oddzielnych run'ach.

Proces sekwencjonowania programowano w programie Illumina Experiment Manager. Wykorzystywano pojedyncze indeksowanie próbek. Parametry odczytu ustalano na 2 x 76 cykli + 6 cykli dla odczytu indeksów.

Wyniki

W wyniku przeprowadzonego sekwencjonowania 10 bibliotek uzyskano wyniki sekwencjonowania w zakresie od 18 292 682 do 22 560 975 odczytów na próbkę.

Jakość uzyskanych sekwencji o $Q \geq 30$ spełniało od 91% do 97,1% uzyskanych odczytów dla każdej próbki (Ryc. 2).



Ryc. 2. Wykres jakości uzyskanych odczytów sekwencji.

Wnioski

- Sekwencjonowanie poprzez syntezę DNA z wykorzystaniem technologii NGS pozwala na uzyskanie wysokiej jakości sekwencji nukleotydowych niezbędnych w procesie analizy wiromu chmielu

Mierniki dla tematu badawczego 2:

Lp.	miernik ³	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
2.1	Liczba zsekwencjonowanych bibliotek	10 bibliotek	10 bibliotek

³ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

3.3 Temat badawczy 3

Cel tematu badawczego 3

Celem tematu badawczego była ocena występowania poszczególnych wirusów (HpLV i ArMV) oraz wiroidów (CBCVd, HpSVd, AFCVd) w wiromie roślin chmielu oraz próba wykrycia wirusów, które nie były dotąd wykrywane w chmielu.

Cel tematu badawczego 3 został osiągnięty.

Materiały i metody

Surowe dane w postaci plików fastq były wstępnie filtrowane w programie Trimmomatic ver. 0.39 z następującymi parametrami ILLUMINA CLIP:TruSeq3-SE:2:30:10, LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15, MINLEN:36 (Tab. 2).

Tab. 2. Jakość bibliotek RNASeq

Biblioteka	Liczba surowych odczytów	Liczba odczytów po odrzuceniu odczytów o niskiej jakości
1_2019	21 476 459	20 273 777(94,4%)
2_2019	18 292 682	17 762 194 (97,1%)
3_2019	20 690 835	18 828 660 (91%)
4_2019	18 996 756	17 420 025 (91,7%)
5_2019	21 713 603	20 801 631 (95,8%)
1_2020	22 560 975	21 207 316 (94%)
2_2020	19 614 682	18 320 112(93,4%)
3_2020	21 110 782	20 435 237(96,8%)
4_2020	22 186 593	20 877 584 (94,1%)
5_2020	19 857 327	18 308 455 (92,2%)

Oczyszczone odczyty były przeszukiwane pod kątem występowania sekwencji wirusowych i wiroidowych z wykorzystaniem programu VirusDetect ver. 1.7 (Tab.3.). Składanie kontigów przez program VirusDetect łączy ze sobą etap składania kontigów *de novo* wykorzystując do tego celu pakiet Velvet oraz mapowania do sekwencji referencyjnych pochodzących z GenBanku – pakiet bwa. Głębokość sekwencjonowania określano za pomocą pakietu SAMtools.

Wyniki

Liczba uzyskanych odczytów po sekwencjonowaniu wynosiła od 18 292 682 do 22 560 975, zaś liczba odczytów po zastosowaniu filtrowania i odrzuceniu odczytów o niskiej jakości wynosiła od 91% do 97,1% pierwotnej ilości (Tab. 2).

Tab. 3. Wiromy chmielu

Biblioteka		Genom referencyjny				
		HpLV	ArMV	HSVd	AFCVd	CBCVd
	Długość pełnego genomu wirusa	8612	7334	302	371	284
1_2019	Pokrycie (%)	95,4	-	-	-	-
	Liczba kontigów	24	-	-	-	-
	Głębokość	9,8	-	-	-	-
	Homologia (%)	99,32	-	-	-	-
2_2019	Pokrycie (%)	79,3	-	-	-	-
	Liczba kontigów	30	-	-	-	-

	Głębokość	4,5	-	-	-	-
	Homologia (%)	99,44	-	-	-	-
3_2019	Pokrycie (%)	96,2	-	-	-	-
	Liczba kontigów	17	-	-	-	-
	Głębokość	12	-	-	-	-
	Homologia (%)	98,87	-	-	-	-
4_2019	Pokrycie (%)	-	-	-	-	-
	Liczba kontigów	-	-	-	-	-
	Głębokość	-	-	-	-	-
	Homologia (%)	-	-	-	-	-
5_2019	Pokrycie (%)	-	-	-	-	-
	Liczba kontigów	-	-	-	-	-
	Głębokość	-	-	-	-	-
	Homologia (%)	-	-	-	-	-
1_2020	Pokrycie (%)	80,1	-	-	-	-
	Liczba kontigów	6	-	-	-	-
	Głębokość	14	-	-	-	-
	Homologia (%)	99,56	-	-	-	-
2_2020	Pokrycie (%)	69,73	-	-	-	-
	Liczba kontigów	21	-	-	-	-
	Głębokość	15	-	-	-	-
	Homologia (%)	99,54	-	-	-	-
3_2020	Pokrycie (%)	-	-	98,4	-	-
	Liczba kontigów	-	-	23	-	-
	Głębokość	-	-	38	-	-
	Homologia (%)	-	-	99,23	-	-
4_2020	Pokrycie (%)	-	-	-	-	-
	Liczba kontigów	-	-	-	-	-
	Głębokość	-	-	-	-	-
	Homologia (%)	-	-	-	-	-
5_2020	Pokrycie (%)	-	-	-	-	-
	Liczba kontigów	-	-	-	-	-
	Głębokość	-	-	-	-	-
	Homologia (%)	-	-	-	-	-

„-” – brak wykrytych sekwencji badanych patogenów, pokrycie – procent sekwencji referencyjnej z GenBanku, która jest pokryta przez złożone i wyrównane kontigi, liczba kontigów – liczba kontigów złożonych w odniesieniu do próbki, które będą wyrównywane do sekwencji referencyjnej, głębokość – średnia ogólna liczba opisująca ile razy każdy nukleotyd sekwencji referencyjnej jest pokryty przez sekwencje zidentyfikowane w próbce, homologia – średni procent identycznych nukleotydów jak w sekwencji referencyjnej wszystkich kontigów dopasowanych do tej sekwencji.

Biblioteki 1_2019, 2_2019, 3_2019 oraz 1_2020, 2_2020, 3_2020 obejmowały próbki chmielu, w których w latach 2018-2019 potwierdzono obecność wirusa lub wiroida. Biblioteki 4_2019, 5_2019 oraz 4_2020, 5_2020 obejmowały próbki, w których nie wykryto żadnego z badanych patogenów metodą RT-PCR i wykazujących nietypowe objawy chorobowe.

Jedynie w bibliotekach z potwierdzoną metodą RT-PCR obecnością badanych patogenów, wykryto poprzez sekwencjonowanie NGS obecność sekwencji wirusowych HpLV lub HSVd. Nie stwierdzono infekcji mieszanych. W żadnej z bibliotek nie stwierdzono sekwencji pochodzących od ArMV, AFCVd, CBCVd. Na podstawie porównania stopnia homologii sekwencji HpLV w stosunku do sekwencji referencyjnej oraz do siebie nawzajem stwierdzono, że izolaty HpLV pochodzące z różnych rejonów kraju wykazują duże podobieństwo do siebie oraz do sekwencji referencyjnej.

Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach analizowano wirom RNA chmielu. Zidentyfikowano jednego wirusa – HpLV oraz jeden wiroid – HSVd. Chociaż kilka badań opartych na NGS wykazało identyfikację znanych lub nowych wirusów u wielu gatunków roślin

(Barba i in., 2014; AlRwahnih i in., 2015; Roossinck, 2016) przeprowadzone badania nie wykazały występowania innych wirusów i wiroidów.

Pojawienie się kilku systemów NGS jest innowacją w wielu obszarach badawczych, w tym wirusologii (Barba i in., 2014; Roossinck, 2016). Ogólnie rzecz biorąc, pierwszym krokiem identyfikacji wirusa jest obserwacja objawów chorobowych wywoływanych przez wirusy (Burger i Maree, 2015). Jednak infekcja wirusowa roślin nie zawsze powoduje objawy chorobowe. Objawy choroby mogą zależeć od wirusa, żywiciela i warunków środowiskowych.

Rośliny chmielu wykorzystane w tym badaniu nie zawsze wykazywały objawy choroby wirusowej, co wskazuje na znaczenie warunków środowiskowych, takich jak metoda uprawy, klimat, stosowane pestycydy i nawozy.

Ostatnie badania sugerują możliwy wpływ wiromu na zdrowotność i choroby rośliny gospodarza (Cadwell K., 2016). W prowadzonych badaniach nie stwierdzono koinfekcji jednak inni autorzy donoszą, że koinfekcja kilku wirusów może stworzyć konkurencję w postaci wzajemnie korzystnej współpracy (Pinky L. i Dobrovoly H.M., 2016; Salvaudon L. i in. 2013). Co więcej, przypuszcza się, że przynajmniej blisko spokrewnione wirusy mogą być korzystne dla replikacji, ruchu i patogenezы ze względu na ich wspólne cechy (Herranz M.C., 2013). Jednak nie jest dotychczas zbadany wpływ koinfekcji całkowicie różnych wirusów i wiroidów na cykl życiowy wirusa i żywiciela. Co więcej, dowiedziono, że koinfekcja różnych wirusów u żywiciela nie zawsze koreluje z objawami choroby (Jo i in., 2018).

Złożona mieszanina wirusów w jednej roślinie może być przeszkodą w odróżnieniu blisko spokrewnionych wirusów (Jo i in., 2018).

Kompletne lub prawie kompletne sekwencje genomu są bardzo przydatne, jak opisano wcześniej (Marais i in., 2016; Yo i in., 2017), do określania blisko spokrewnionych genomów. Zgromadzone kontigi związane ze zidentyfikowanymi wirusami w prowadzonych badaniach były wystarczające do pokrycia większości regionów docelowego wirusa. Ponadto informacje o dostępnych sekwencjach genomu referencyjnego były korzystne dla składania genomu wirusa

Wnioski

- Patogeny pochodzące z różnych rejonów polski różniły się w nieznacznym stopniu od siebie (Tab. 3).
- W próbkach bezobjawowych lub o nietypowych objawach nie stwierdzono obecności sekwencji wirusowych bądź wiroidowych

Mierniki dla tematu badawczego 3:

Lp.	miernik ⁴	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
3.1	Liczba zanalizowanych bibliotek	10	10

3.5 Literatura

Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C. & Rowhani, A. 2015. Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology* **105**, 758–763.

⁴ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

- Barba, M., Czosnek, H. & Hadidi, A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6, 106–136.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Burger, J. T. & Maree, H. J. 2015. Metagenomic next-generation sequencing of viruses infecting grapevines. *Methods Mol. Biol.* 1302, 315–330.
- Cadwell, K. 2015. The virome in host health and disease. *Immunity* 42, 805–813.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, i in. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol.* 2011 May 15;29(7):644-52. doi: 10.1038/nbt.1883. PubMed PMID: 21572440.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, i in. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc.* 2013 Aug;8(8):1494-512. Open Access in PMC doi: 10.1038/nprot.2013.084. Epub 2013 Jul 11. PubMed PMID:23845962.
- Herranz, M. C. et al. 2013. A remarkable synergistic effect at the transcriptomic level in peach fruits doubly infected by prunus necrotic ringspot virus and peach latent mosaic viroid. *Virology J.* 10, 1.
- Jo, Y. *et al.* 2017. Comprehensive analysis of genomic variation of Hop stunt viroid. *Eur. J. Plant Pathol.* 148, 119–127.
- Li H., Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25:1754-60.
- Marais, A., Faure, C. & Candresse, T. 2016. New insights into Asian prunus viruses in the light of NGS-based full genome sequencing. *PLoS One* 11, e0146420.
- Massart, S., Olmos, A., Jijakli, H., Candresse, T., 2014. Current impact and future directions of high throughput sequencing in plant virus diagnostics. *Virus Research*, 188: 90-96
- Pinky, L. & Dobrovolsky, H. M. 2016. Coinfections of the respiratory tract: viral competition for resources. *PLoS One* 11, e0155589.
- Roossinck, M. J. 2016. Deep sequencing for discovery and evolutionary analysis of plant viruses. *Virus Res.*
- Salvaudon, L., De Moraes, C. M. & Mescher, M. C. 2013. Outcomes of co-infection by two potyviruses: implications for the evolution of manipulative strategies. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 280, 20122959.
- Yeonhwa J., Sen L., Hyosub C. i in., 2018. Peach RNA viromes in six different peach cultivars. *Nature Scientific Reports* 8:1844-1-14.
- Zerbino D.R., Birney E. 2008. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Research* 18:821-829.
- Zheng Y, Gao S, Padmanabhan C, Li R, Galvez M, Gutierrez D, Fuentes S, Ling K-S, Kreuze J, Fei Z (2017) VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. *Virology* 500:130-138
- Valli A., Oliveros J., Molnar A., Baulcombe D., Garcia J.A. 2011. The specific binding to 21-nt double-stranded RNAs is crucial for the antisilencing activity of Cucumber vein yellowing virus P1b and perturbs endogenous small RNA population. *RNA* 17:1148-1158.
- Ziegler, A., Kawka, M., Przybys, M., Doroszevska, T., Skomra, U., Kastirr, U., Matoušek, J., Schubert, J. 2014. Detection and molecular analysis of Hop latent virus and Hop latent viroid in hop samples from Poland, *Journal fur Kulturpflanzen*, 66 (7). S. 248–254.

4. Planowana prezentacja wyników badań

Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych			
lp.	konferencja	Rodzaj publikacji	Liczba prezentacji
1	International Scientific Conference Bioprotection – Global Plant Health and product safety 09.2020	poster	1

Z uwagi na trwającą pandemię koronawirusa SARS-CoV2 powodowaną przez COVID-19 planowany udział w międzynarodowej konferencji nie odbył się.

5. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:

<http://chmiel.iung.pulawy.pl/wyniki.html>

6. Miernik zadania - stopień realizacji

Lp.	miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji miernika
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1.1	Liczba przygotowanych bibliotek	5	5	100%
temat badawczy 2				
2.1	Liczba zsekwencjonowanych bibliotek	10	10	100%
temat badawczy 3				
3.1	Liczba zanalizowanych bibliotek	10	10	100%
temat badawczy 4				
			Średnia	100%
			% realizacji zadania	100%

Sporządzono:

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

15.12.2020 r.

prof. dr hab. Wiesław Aleksander Oleszek

dr Marcin Przybyś

data

podpis i pieczęć

podpis