

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0026**

Metagenomický prístup identifikácie a charakterizácie vírusových ochorení pri vybratých druhoch liečivých rastlín

Zodpovedný riešiteľ **Mgr. Daniel Mihálik, PhD.**

Príjemca **Žilinská univerzita v Žiline - Výskumný ústav vysokohorskej biológie v Tatranskej Javorine**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

- Výskumný ústav vysokohorskej biológie, Žilinská Univerzita v Žiline
- Biomedicínske centrum SAV, Virologický Ústav SAV v Bratislave

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

- hoci projekt bol riešený v rámci SR, bola založená a rozvíjaná medzinárodná spolupráca s Dr. Thierrym Candresse, (INRA Bordeaux, Francúzsko), čo môžeme deklarovať spoločnou publikáciou

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

- patentové prihlášky alebo úžitkové vzory neboli výstupmi projektu

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

A. Práce publikované v rámci WoS-počet 9ks:

1. Molecular and biological characterisation of Turnip mosaic virus isolates infecting poppy (*Papaver somniferum* and *P. rhoeas*) in Slovakia / M. Glasa, K. Šoltys, L. Predajňa, N. Sihelská, S. Nováková, Z. Šubr, Ján Kraic, Daniel Mihálik. In: Viruses-Basel. - ISSN 1999-4915. - Roč.10, č.8 (2018)
2. High-throughput sequencing of Potato virus M from tomato in Slovakia reveals a divergent variant of the virus Glasa Miroslav - Šoltys Katarína - Predajňa Lukáš - Sihelská Nina - Budiš Jaroslav - Mrkvová Michaela - Kraic Ján - Mihálik Daniel - Ruiz- García Ana Belén, 2019. In: Plant Protection Science = Ochrana rastlín = Ochrana rostlin. - ISSN 1212-2580, Roč. 55, č. 3 (2019), s. 159-166
3. Higher Effectiveness of New Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Germplasm Acquisition by Collecting Expeditions Associated with Molecular Analyses. Sajgalik, M; Ondreichkova, K; Hauptvogel, P; Mihalik, D; Glasa, M; Kraic, J. (2019). In: SUSTAINABILITY, vol.11, č.8, 2019, eISSN:2071-1050
4. High-throughput sequencing reveals Bell Pepper Endornavirus infection in Pepper (*Capsicum annuum*) in Slovakia and enables its further molecular characterization. Tomasechova Jana, Hančinský Richard, Predajna Lukas, Kraic Jan, Mihalik Daniel, Soltys Katarina, Vavrova Silvia, Bohmer Miroslav, Sabanadzovic sead, Glasa Miroslav, 2019. In Plants, ISSN 2223-7747, č. 9,

5. Diacylglycerol Acetyltransferase Gene Isolated from *Euonymus europaeus* L. Altered Lipid Metabolism in Transgenic Plant towards the Production of Acetylated Triacylglycerols [electronic] / Daniel Mihálik, Andrea Lančaričová, Michaela Mrkvová, Šarlota Kaňuková, Jana Moravčíková, Miroslav Glasa, Zdeno Šubr, Lukáš Predajňa, Richard Hančinský, Simona Grešková, Michaela Havrlentová, Pavol Hauptvogel, Ján Kraic, 2020. DOI DOI 10.3390/life10090205. In: Life. - ISSN 2075-1729 (online), Roč. 10, č. 9 (2020), s. [1-16] [online].

6. Plant Viruses Infecting Solanaceae Family Members in the Cultivated and Wild Environments: A Review / Richard Hančinský, Daniel Mihálik, Michaela Mrkvová, Thierry Candresse, Miroslav Glasa, 2020. DOI DOI 10.3390/plants9050667. In: Plants-Basel. - ISSN 2223-7747 (online), Roč. 9, č. 5 (2020), s. [1-17] [online].

7. Procedures for DNA Extraction from Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.) and Poppy Seed-Containing Products / Šarlota Kaňuková, Michaela Mrkvová, Daniel Mihálik, Ján Kraic, 2020. In: Foods. - ISSN 2304-8158 (online), Roč. 9, č. 10 (2020), s. [1-15] [online].

8. High-throughput sequencing reveals bell pepper endornavirus infection in pepper (*Capsicum annuum*) in Slovakia and enables its further molecular characterization [electronic] / Jana Tomašechová, Richard Hančinský, Lukáš Predajňa, Ján Kraic, Daniel Mihálik, Katarína Šoltys, Silvia Vávrová, Miroslav Böhmer, Sead Sabanadzovic, Miroslav Glasa, 2020. DOI DOI 10.3390/plants9010041. In: Plants-Basel. - ISSN 2223-7747 (online), Roč. 9, č. 1 (2020), s. [1-9] [online].

9. Biotic and Abiotic Elicitors of Stilbenes Production in *Vitis vinifera* L. Cell Culture [electronic] / Martin Sák, Ivana Dokupilová, Šarlota Kaňuková, Michaela Mrkvová, Daniel Mihálik, Pavol Hauptvogel, Ján Kraic, 2021. DOI DOI 10.3390/plants10030490. In: Plants-Basel. - ISSN 2223-7747 (online), Roč. 10, č. 3 (2021), s. [1-14] [online].

B. Skriptá učebnice:

1.

Laboratórne cvičenia z molekulárnej biológie a biotechnológií / D. Mihálik, ISBN 978-80-8105-940-7, počet str., vydavateľstvo UCM v Trnave, 124 strán, (2018)

C. príspevky na konferenciách + popularizačné aktivity:

1. Sihelská N, Predajňa L, Šubr Z, Mihálik D, Šoltys K, Glasa M (2018): Molecular and biological characterisation of Turnip mosaic virus isolates infecting poppy (*Papaver* sp.) in Slovakia. XXI. Česká a slovenská konference o ochraně rostlin. Sborník abstraktů. Šefrová H & Šafranková I (eds), MENDELU v Brně, 5. – 6. 9. 2018, p. 27, ISBN 978-80-7509-562-6.

2. Glasa M, Predajňa L, Šoltys K, Mihálik D (2019): High-throughput sequencing reveals common poppy (*Papaver rhoeas* L.) as a natural host for Turnip yellows virus. Joint Czechoslovak Virology Conference nad 1st SK-AT Structural Virology Meeting, Book of Abstracts, p. 73, 13. – 15. 2. 2019, Bratislava, ISBN 978-80-86668-53-6

3. Glasa M, Tomašechová J, Predajňa L, Šoltys K (2019): Characterisation of virome identified in selected medical plants by next generation sequencing. International Scientific Conference Applied Natural Sciences 2019, Book of Abstracts, p. 57, 25. - 27. 9. 2019, Tále, ISBN 978-80-572-0011-6

4. Sihelská N, Šubr Z, Tomašechová J, Predajňa L, Glasa M (2019): Potato virus Y diversity in the non-potato hosts in Slovakia as revealed by next generation sequencing. The 17th triennial meeting of the virology section of the European association of potato research EAPR, Abstract book, p. 27, 18. – 21. 6. 2019, Laulasmaa, Estonia.

5. Sihelská N, Predajňa L, Šubr Z, Tomašechová J, Glasa M (2019): Štúdium molekulárnej variability a charakterizácia fytovírusov infikujúcich rastliny čeľade Solanaceae a Papaveraceae v ére sekvenovania novej generácie. Konferencia mladých mikrobiológov Čo nového v mikrobiológii, ČSSM, Zborník abstraktov, p. 41, 14. – 17. 3. 2019, Štrbské Pleso, ISBN 978-80-971422-9-2.

6.. Vírusy rastlín pod drobnohľadom

<https://vedanadosah.cvtisr.sk/virusy-rastlin-pod-drobnohľadom>

- popularizačný článok o aktivitách projektu na portáli Veda na dosah (CVTI)

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu majú veľký význam pre pestovateľskú prax, lebo boli molekulárno - biologicky identifikované nové patotypy vírusov, ktoré neboli doposiaľ na území SR nikdy popísané! O ich originalite svedčí aj fakt, že boli deponované do databázy GenBank, predmetom riešenia projektu nebola liečba postihnutých ochorení rastlín, nami získané

informácie sú dôležité z hľadiska diagnostiky, prevencie a aj následnej eradikácie (odstránenia) postihnutých jedincov (rastlín), čím sa zamedzí šíreniu infekcie, výrazne znižujúcej rastlinnú produkciu rastlín patriacich do čeladi Papaveraceae a Solanaceae. Významným milníkom získaným z riešenia projektu je aj fakt, že divorastúce rastlinné druhy čeladi Papaveraceae a Solanaceae sú významným depozitom a teda tzv. prirodzenou "génovou bankou vírusov" napadajúcich kultúrne, hospodársky významné, rastlinné druhy spomínaných čeladi. Významným faktom zisteným naším bádáním je aj dôkaz zvýšenej expresie génov zahrnutých v biosyntéze tropánových alkaloidov počas infekcie rastlín durmanu obyčajného tobamovírusmi. Daný fakt má obrovský potenciál z hľadiska priemyselnej produkcie tropánových alkaloidov, avšak tento fakt treba ešte verifikovať metabolomickými analýzami, ktoré však neboli predmetom štúdia riešeného projektu. Celosvetová produkcia medicínsky využívaných tropánových alkaloidov (hlavne atropín, skopolamín, hyoscyamín) je saturovaná približne na úrovni 50% a tak jestvuje obrovský dopyt po ich produkcii a naše zistenie ma veľký potenciál využitia v priemyselnej praxi.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Získané výsledky projektu v nadväznosti na stanovené ciele projektu možno zhrnúť do nasledovných bodov:

1. výskum najvhodnejšej stratégie sekvenovania novej generácie (NGS) priamo z hostiteľských rastlín s cieľom obohatenia podielu vírusových sekvencií na pozadí hostiteľských sekvencií, výber najvhodnejších bioinformatických nástrojov a algoritmov pre efektívnu identifikáciu nízkokópiových vírusových sekvencií v prípade absencie dát hostiteľského genómu - výsledky: Optimalizácia stratégie pre NGS analýzu bola iniciovaná komparatívnou analýzou viacerých metód izolácie celkovej RNA. Celková RNA bola izolovaná klasickou fenol/chloroform metódou, využitím komerčných kolónkových izolačných kitov Macherey-Nagel a Sigma. Vzorky boli následne opracované deplečným kitom na odstránenie, čo najväčšieho množstva molekúl cytoplazmatickej, chloroplastovej, aj mitochondriálnej, ribozomálnej RNA z hostiteľa. Táto jednoduchá „enrichment“ stratégia mala za cieľ čo najmenej zasiahnuť do kompozície vírusovej zložky vyizolovaného templátu. Z takto pripraveného templátu bola pripravená sekvenačná cDNA knižnica, ktorá bola následne analyzovaná sekvenáciou novej generácie na platforme Illumina Miseq. Tento algoritmus bol využívaný na identifikáciu vírusových nukleových kyselín počas celej doby riešenia projektu.
2. NGS analýza cieľových rastlín Papaveraceae a Solanaceae s rôznym stupňom prejavu vírusovej infekcie, vrátane bezpríznakových rastlín, charakterizácia ich „virómu“ a prípadná identifikácia nových vírusov alebo vysokodivergentných variant známych vírusových patogénov- výsledky: NGS analýza dokázala prítomnosť vírusu mozaiky kvaky (TuMV) z rodu Potyvirus. Ide o prvý report o výskyte tohto vírusu na maku na Slovensku. Analýzou NGS dát z rajčiaka (*S. lycopersicum*), papriky ročnej, durmanu obyčajného sa nám podarilo určiť úplnú sekvenciu vírusu zakrpatenosti rajčiaka (Tomato bushy stunt virus, rod Tobamovirus), vírusu miernej zakrpatenosti papriky (Pepper mild mottle virus PMMoV, rod Tobamovirus), vírusu mozaiky uhorky (CMV), vírusu zemiaka M (Potyvirus), vírusu mozaiky vodného melónu (watermelon mosaic virus, WMV), kryptický vírus papriky -2 (pepper cryptic virus-2, PCV-2) a endornavírus papriky (bell pepper endornavirus, BPEV). Uvedené detekované vírusy patria do rôznych rodov (cucumovirus – CMV, potyvirus – WMV, endornavirus – BPEV a deltapartitivirus - PCV-2) a ide pri každom o prvú genomickú sekvenciu vírusu na Slovensku!
3. úplná alebo parciálna molekulárna charakterizácia genómu najrozšírenejších vírusov, analýza ich molekulárnej variability a evolučných faktorov vplývajúcich na ich šírenie a diverzifikáciu- výsledky: pri všetkých spomenutých vírusoch bola realizovaná genomová charakterizácia a boli určené otvorené čítacie rámce, čo je dokladované v publikovaných prácach.
4. vývoj molekulárnych nástrojov pre špecifickú a citlivú detekciu významných vírusov a štúdium ich epidemiológie na prirodzených hostiteľských druhoch rastlín v rôznych agroekologických podmienkach Slovenska a etiológie a biologických vlastností v kontrolovaných podmienkach - výsledky: pri všetkých vírusoch boli sekvencie získané prostredníctvom NGS sekvenovania verifikované pomocou Sanger sekvenovania PCR produktov, čím sme získali sady primerov na detekcie príslušných vírusov. Takisto boli

vírusy detegované aj imunochemicky.

5. analýza vplyvu vírusovej infekcie na produkciu alkaloidov v modelových rastlinách na úrovni expresie génov kódujúcich vybrané enzýmy metabolickej dráhy alkaloidov - výsledky:- v rámci riešenia projektu sme zistili, že Tobamovírusy využívajú divorastúce rastlinné druhy čeľade Solanaceae (durman obyčajný) ako depozitá pre svoju existenciu a šírenie. Pri umelej infekcii durmanu obyčajného tobamovírusmi sme zaznamenali zvýšenú expresiu génov zahrnutých v biosyntéze tropánových alkaloidov a to konkrétne putresceínmetyltransferázu (pmt) a hyoscyamín-6-hydroxylázu (H6H). Takže tobamovírusy môžeme považovať za elicitory produkcie tropánových alkaloidov.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The obtained results of the project in connection with the set goals of the project can be summarized in the following points:

1. Research into the most appropriate next generation sequencing strategy (NGS) directly from host plants to enrich the contribution of viral sequences to host sequences, selection of the most appropriate bioinformatics tools and algorithms for efficient identification of low copy viral sequences in the absence of host genome data - results: The optimization of the strategy for NGS analysis was initiated by comparative analysis of several methods for isolating total RNA. As plant material, we used fully developed poppy and poppy leaves, and total RNA was isolated by the classical phenol / chloroform method, using commercial Macherey-Nagel and Sigma column isolation kits. The samples were then treated with a depletion kit to remove as many cytoplasmic, chloroplast, and mitochondrial, ribosomal RNA molecules as possible from the host. This simple "enrichment" strategy aimed to interfere as little as possible with the composition of the viral component of the isolated template. A sequencing cDNA library was prepared from the template thus prepared, which was subsequently analyzed by next generation sequencing on the Illumina Miseq platform. This algorithm was used to identify viral nucleic acids throughout the project.
2. NGS analysis of Papaveraceae and Solanaceae target plants with varying degrees of viral infection, including asymptomatic plants, characterization of their "virus" and possible identification of new viruses or highly divergent variants of known viral pathogens - results: NGS analysis showed the presence of turnip mosaic virus (TuMV) genus Potyvirus. This is the first report on the occurrence of this virus in poppies in Slovakia. By analyzing NGS data from tomato (*S. lycopersicum*), pepper, datura, we were able to determine the complete sequence of Tomato bushy stunt virus, genus Tobamovirus, Pepper mild mottle virus PMMoV, Cucumber mosaic virus (CMV), potato virus M (Potyvirus), watermelon mosaic virus (WMV), pepper cryptic virus-2 (PCV-2) and bell pepper endornavirus, BPEV). These detected viruses belong to different genera (cucumovirus - CMV, potyvirus - WMV, endornavirus - BPEV and deltapartitivirus - PCV-2) and each of them are the first genomic sequences of the virus in Slovakia!
3. complete or partial molecular characterization of the genome of the most widespread viruses, analysis of their molecular variability and evolutionary factors influencing their spread and diversification - results: genomic characterization was performed for all mentioned viruses and open reading frames were determined, as documented in published articles.
4. development of molecular tools for specific and sensitive detection of important viruses and study of their epidemiology on natural host plant species in different agroecological conditions of Slovakia and etiology and biological properties in controlled conditions - results: for all viruses sequences obtained by NGS sequencing were verified by Sanger sequencing PCR products, thus obtaining primer sets for the detection of the respective viruses. Viruses have also been detected immunochemically.
5. Analysis of the effect of viral infection on alkaloid production in model plants at the level of expression of genes encoding selected enzymes of the alkaloid metabolic pathway - results: - in the project we found that Tobamoviruses use wild plant species of the family Solanaceae (*Datura stramonium*) as deposits for their existence and dissemination. In artificial infection of *Datura stramonium* with tobamoviruses, we observed increased expression of genes involved in the biosynthesis of tropane alkaloids, namely putresceín methyltransferase (pmt) and hyoscyamine-6-hydroxylase (H6H). Thus, tobamoviruses can

be considered as elicitors of tropane alkaloid production.