

VIROMSKA ANALIZA RNA VIRUSOV V VZORCIH TRIGLAVSKEGA LEDENIKA IN LEDENIKA POD SKUTO

VIROMICS ANALYSIS OF RNA VIRUSES IN SAMPLES FROM THE TRIGLAV AND SKUTA GLACIER

Kristina ANDREJC¹, Maša JARČIČ^{2,3}, Ion GUTIERREZ-AGUIRRE¹, Denis KUTNJAK¹, Katarina BAČNIK¹

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0116>

IZVLEČEK

V ledenikih se kljub nizkim temperaturam in omejeni količini dosegljive vode ter hranil skriva velika biološka raznolikost. V ledeniških mikrobni skupnostih prevladujejo bakterije, alge in glive. Znanje o virusih v teh ekstremnih okoljih pa je omejeno, kar smo želeli nasloviti z viromsko analizo slovenskih ledenikov: Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto. Iz koncentriranih vzorcev staljenega ledeniškega ledu smo izolirali ribonukleinske kisline (RNA), jih pomnožili z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki in netačno določili njihova zaporedja s platformo Illumina. S pomočjo bioinformatičnih analiz smo v pridobljenih podatkih poiskali virusna zaporedja in jih taksonomsko uvrstili. Odstotki odčitkov, ki so se klasificirali kot virusni, so bili pričakovano nizki. Kljub osredotočenosti na opis raznolikosti RNA virusnih zaporedij, smo v vseh vzorcih slovenskih ledenikov najbolj pogosto zaznali virusne odčitke, ki so pripadali DNA bakteriofagom, klasificiranim v svet *Duplodnaviria*. Virusna zaporedja odkrita v vzorcih slovenskih ledenikov so večinoma izkazovala nizke identitete z znanimi virusnimi zaporedji iz podatkovnih baz, kar kaže na prisotnost številnih novih virusnih vrst. Daljša sestavljena virusna zaporedja verjetno predstavljajo celotne genome novo odkritih RNA virusov (npr. virusna zaporedja iz skupine toti-podobnih in picorna-podobnih virusov). Za taka zaporedja smo s filogenetskimi analizami pokazali, katerim znanim virusom so najbolj sorodni in kakšne organizme potencialno okužujejo. Raziskava viroma slovenskih ledenikov predstavlja prvi vpogled v prisotnost virusov v teh okoljih pri nas in razkriva, da se v njih skriva velika in neraziskana raznolikost teh bioloških entitet.

Ključne besede: virusi, viromska analiza, Triglavski ledenik, ledenik pod Skuto

ABSTRACT

Despite low temperatures and limited availability of water and nutrients, there is a high level of biological diversity hidden in the glaciers. Glacial microbial ecosystems are primarily composed of bacteria, algae, and fungi. However, knowledge about viruses in these extreme environments remains limited. To address this gap, we conducted virome analysis on two Slovenian glaciers: Triglavski ledenik (Triglav glacier) and ledenik pod Skuto (glacier below Skuta). From concentrated samples of melted glacial ice, we isolated ribonucleic acids (RNA), amplified them using random oligonucleotide primers, and performed untargeted sequencing using the Illumina platform. Through bioinformatic analyses, we identified viral sequences in the obtained data and classified them taxonomically. As expected, the proportion of reads classified as viral was low. Despite focusing on the description of RNA viral diversity, the most frequently detected viral reads in all glacier samples were those belonging to DNA bacteriophages, classified within the realm *Duplodnaviria*. Most of the viral sequences discovered in the Slovenian glacier samples showed low identity with known viral sequences in databases, indicating the presence of numerous novel viral species. Longer assembled viral sequences likely represent complete genomes of newly discovered RNA viruses (e.g., sequences related to toti-like and picorna-like virus groups). For these sequences, phylogenetic analyses revealed their closest known viral relatives and potential host organisms. This study represents the first insight into the presence of viruses in Slovenian glacier environments and reveals a large, previously unexplored diversity of these biological entities.

Key words: viruses, virome analysis, Triglav glacier, glacier below Skuta

¹ Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Večna pot 121, 1000 Ljubljana, kristina.andrejca@gmail.com, ion.gutierrez@nib.si, denis.kutnjak@nib.si, katarina.bacnik@nib.si

² Biotehniška fakulteta, Oddelek za mikrobiologijo, Večna pot 111, 1000 Ljubljana

³ Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Oddelek za mikrobiološke raziskave, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor, masa.jarcic@gmail.com

UVOD

Ledeniki se nahajajo v hladnih območjih z obilnimi snežnimi padavinami, predvsem na visokih geografskih širinah in nadmorskih višinah (DEBEER et al. 2020). Njihovo oblikovanje je dolgotrajen proces, ki vključuje akumulacijo snega in ablacijo zaradi taljenja, evaporacije ter lomljenja ledu (BENN & EVANS 2014). Ledeniki imajo ključno vlogo v alpskem hidrološkem sistemu (LAMBRECHT & KUHN 2007) ter služijo kot indikatorji podnebnih sprememb (RAPER & BRAITHWAITE 2009). V Sloveniji se nahajata dva ledenika; Triglavski ledenik leži v Julijskih Alpah, severovzhodno pod Triglavom, ledenik pod Skuto pa se nahaja tik pod najvišjimi vrhovi na obojni strani v Kamniško-Savinjskih Alpah. Oba ledenika se že več desetletij hitro manjšata (PAVŠEK 2007). Ob nadaljevanju svetovnega trenda dvigovanja temperatur lahko v naslednjih desetletjih pričakujemo, da bosta tudi Triglavski ledenik in ledenik pod Skuto, tako kot številni drugi po svetu, izginila (PAVŠEK 2007).

Ledeniška okolja so ena izmed biološko najmanj raziskanih okolij na Zemlji, saj so za njih značilni zahtevni življenjski pogoji, kot so nizke temperature, omejena dostopnost hranil in tekoče vode. Ledeniške ekosisteme naseljujejo skoraj izključno mikroorganizmi, predvsem bakterije in mikrobní evkarionti (ANESIO & LAYBOURN-PARRY 2012; HODSON et al. 2008). O raznolikosti in strukturah virusnih skupnosti v ledeniških okoljih je trenutno na voljo malo raziskav, ki pa nakazujejo na veliko genetsko kompleksnost in raznolikost virusov. Na primer (LÓPEZ-BUENO et al. 2009) so v antarktičnem sladkovodnem jezeru Limnopolar na otoku Livingston zaznali veliko morfološko in taksonomsko raznolikost virusov, katerih prevladujoč delež predstavljajo virusi evkariontov, vključno z enoverižnimi (ss)DNA virusi sorodnimi virusom, ki okužujejo živali in rastline, in dvoverižnimi (ds)DNA virusi, ki okužujejo alge. Leta 2015 so poročali o prvi metagenomski študiji RNA virusov v zgoraj imenovanem antarktičnem jezeru. V raziskavi so pokazali, da so v vzorcih prevladovali ssRNA virusi sorodni predstavnikom redu *Picornavirales*, in opisali njihovo časovno-prostorsko spreminjanje (LÓPEZ-BUENO et al. 2015). Nedavno so raziskali DNA in RNA virom kriosfere tibetanskega platoja (Liu et al.

2023, 2024). V vzorcih ledenikov, proglacialnih jezerskih sedimentov, permafrosta in gorskih tal so zaznali več kot 4900 novih RNA virusnih operacijskih taksonomskih enot. Med njimi tudi številne predstavnike povsem novih, divergentnih skupin RNA virusov, ki okužujejo prokarionte, kar pogloblja naše razumevanje njihove raznolikosti (Liu et al. 2024).

Virusi v ledeniških okoljih so maloštevilni in razpršeni, zato je potrebno koncentriranje virusov iz večje količine vzorca, da pridobimo dovolj materiala za nadaljnje analize (RASSNER 2017). To lahko predstavlja tako metodološki kot tudi logistični problem. Poznamo različne postopke virusnega koncentriranja (npr. ultracentrifugiranje, flokulacija ali filtracija), v tej raziskavi pa smo se odločili za uporabo CIM monolitne kromatografije, ki je pokazala visoko učinkovitost pri koncentriranju virusov iz različnih vodnih vzorcev, kot so pitna voda, rečna voda, ustekleničena voda, prečiščene odpadne vode in morska voda (GUTIÉRREZ-AGUIRRE et al. 2018). Za karakterizacijo viromov vodnih vzorcev najpogosteje uporabljamo netarčno visokozmogljivo sekvenciranje (ROSE et al. 2016) oziroma t.i. metagenomski pristop, ki omogoča vpogled v prisotnost znanih in novih virusnih zaporedij, njihovo taksonomsko klasifikacijo ter karakterizacijo virusnih genomov. Z bioinformatičnimi orodji lahko pridobljena kratka zaporedja (odčitke) ali pa sestavljena zaporedja primerjamo z zaporedji znanih virusov oziroma zaporedja vključimo v filogenetske analize.

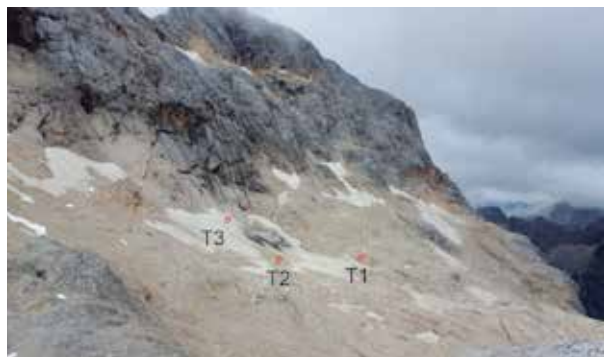
Z tej raziskavi smo želeli zapolniti vrzel v poznavanju virusnih skupnosti v slovenskih ledenikih, ki kljub svoji majhnosti predstavljata pomemben del slovenske naravne dediščine. To znanje želimo pridobiti dokler je to, zaradi njunega pospešenega izginjanja, še mogoče. Naš cilj je bil določiti prisotnost in raznolikost virusnih zaporedij z uporabo visokozmogljivega sekvenciranja. Poglobljena analiza nabora metagenomskih podatkov je potrdila, da so ledeniške virusne skupnosti raznolike, pri čemer večji del predstavljajo virusi brez bližnjih sorodnikov v obstoječih zbirkah podatkov. Viromi opisani v naši raziskavi se razlikujejo od prej opisanih sladkovodnih viromov.

MATERIALI IN METODE

Lokacije in potek vzorčenja

Vzorci ledu s Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto smo pridobili septembra 2018 (JARČIČ 2021) (Pre-

glednica 1). Triglavski ledenik smo vzorčili na lokacijah z geografskimi koordinatami 46°22'43.6"N in 13°50'35.7"E. Vzorec T1 smo odvzeli na najnižji točki ledeniške zaplate (globina 20 cm), vzorec T2 na osrednjem delu (globina



Slika 1: Triglavski ledenik z označenimi mesti vzorčenja (JARČIČ 2021)

Figure 1: Triglav glacier with marked sampling sites (JARČIČ 2021)



Slika 2: Ledenik pod Skuto z označenimi mesti vzorčenja (JARČIČ 2021)

Figure 2: Glacier under Skuta with marked sampling sites (JARČIČ 2021)

30–40 cm), vzorec T3 pa na najvišje ležečem delu ledenika (Slika 1). Ledenik pod Skuto smo vzorčili na mestih z geografskimi koordinatami 46°21'57.4"N in 44°33'33.7"E. Vzorec S1 smo odvzeli na spodnjem levem delu ledenika, S2 na zgornjem desnem robu, S3 pa na najvišji točki (Slika 2). Pri vzorčenju smo uporabili cepine in lopate. Vzorci so merili približno 35 cm × 30 cm × 20 cm. Shranili smo jih v sterilne vrečke. Na terenu smo jih delno odtajali (40 minut), nato smo jih sprali s sterilno vodo, ponovno zaprli v sterilne vrečke in jih prenesli v laboratorij za nadaljnje analize (JARČIČ 2021).

Koncentriranje vzorcev in izolacija RNA

Koncentriranje vzorcev ledenikov smo izvedli takoj po vzorčenju leta 2018 po postopku opisanem v (BAČNIK et

al. 2020). Pred koncentriranjem smo vzorce filtrirali preko filter papirja in celulozno acetatne membrane z velikostjo por 0,8 µm (Sartorius, Nemčija). Koncentriranje smo izvedli s CIM QA (ang. quaternary amine) 8 mL monolitno kolono (BIA Separations, Ajdovščina, Slovenija) na hitrem proteinsko tekočinskem kromatografskem sistemu AKTA Purifier 100 (GE Healthcare, Chicago, IL, ZDA). Po nalaganju vzorcev ledenikov (2 L) in spiranju kolone je sledila elucija s 50 mM pufrom HEPES (pH = 7) z 1 M NaCl v dve 15 mL elucijski frakciji (E1, E2). Kolono smo očistili z dvournim prečrpavanjem 1 M raztopine NaOH. Sledilo je nalaganje 200 mL ultračiste (Mili-Q) vode na kolono ter elucija s 50 mM pufrom HEPES (pH = 7) z 1 M NaCl. Eluat z dodatkom sintetične RNA luciferaze (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA) v nadaljevanju predstavlja negativno kontrolo sistema AKTA Purifier 100.

Za izolacijo RNA iz koncentriranih vzorcev slovenskih ledenikov smo uporabili reagent TRIzol LS (Invitrogene, Waltham, Massachusetts, ZDA) po protokolu proizvajalca z dodatkom glikogena (100 mg) v 400 µL vzorca na začetku izolacije in z uporabo mikrocentrifugirka z gelom MaxTract (Qiagen, Hilden, Nemčija). V protokol izolacije smo vključili tudi negativno kontrolo, kateri smo namesto vzorca dodali enako količino vode brez ribonukleaz ter sintetično RNA luciferaze (Promega, Madison, Wisconsin, ZDA). S kasnejšo analizo te kontrole smo preverili možne kontaminacije med postopkom izolacije in sekvenciranja. Koncentracijo celokupne RNA v vzorcih po izolaciji smo izmerili z uporabo fluorometra Qubit 2.0 in visoko občutljivega kita za zaznavanje (ang. high sensitivity) (hs)RNA (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Pomnoževanje z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki in sekvenciranje

Po izolaciji RNA smo zaradi nizke koncentracije RNA v vzorcih izvedli naključno pomnoževanje nukleinskih kislin. Postopek pomnoževanja z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki smo povzeli po FERNÁNDEZ-CASSI et al. (2018) ter WANG et al. (2003) in zajema več korakov. Prvi korak predstavlja sinteza komplementarne DNA - sinteza prve verige z reverzno transkriptazo (SuperScript III; Life Technologies, Massachusetts, ZDA) in uporabo oligonukleotidnega začetnika A (5'-GTTTCCCAGTCACGATANNNNNNNN-3') ter sinteza druge verige s sekvencazo (Sequenase 2.0; Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA). Temu sledi pomnoževanje DNA z uporabo oligonukleotidnega začetnika B (5'-GTTTCCCAGTCACGATA0-3') in DNA polimera-

ze (AmpliQGold; Thermo Fisher, Massachusetts, ZDA). Produkta PCR smo očistili in koncentrirali z uporabo Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, Kalifornija, ZDA). Preden smo vzorce shranili na -80°C , smo izmerili koncentracijo nukleinskih kislin v vzorcih po pomnoževanju z uporabo fluorometra Qubit 2.0 in visoko občutljivega kita za zaznavanje hsDNA (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, ZDA) po navodilih proizvajalca.

Po izolaciji nukleinskih kislin in pomnoževanju z naključnimi oligonukleotidnimi začetniki smo pridobeno DNA iz obeh elucijskih frakcij, ki sta pripadali istemu vzorcu ledenika, združili v en vzorec. Združevanje smo izvedli tako, da smo iz vsake frakcije dodali enako maso (ng) DNA, ki smo jo izračunali iz izmerjenih koncentracij DNA v posameznih elucijskih frakcijah po pomnoževanju. Vzorce smo nato poslali na netačno sekvenciranje (ang. shotgun sequencing) v podjetje Novogene Europe (Cambridge, Združeno kraljestvo) vključ-

no z negativno kontrolo izolacije ter negativno kontrolo sistema AKTA Purifier 100. V podjetju Novogene so vzorce pripravili po delotoku PA WGS in jih sekvencirali na platformi Illumina (NovaSeq PE150). V Preglednici 1 so zbrani podatki o vzorcih slovenskih ledenikov. Natančnejša lokacija posameznih vzorcev (T1-3 in S1-3) je razložena v poglavju »lokacije in potek vzorčenja« in prikazana na Slikah 1 in 2.

Analize viromskih podatkov

Po sekvenciranju smo preverili kakovost podatkov s programsko opremo CLC Genomics Workbench (verzija 22.0.2). S tem orodjem smo izvedli rezanje koncev (ang. trimming) za odstranitev preostalih adapterskih zaporedij in zaporedij začetnih oligonukleotidov uporabljenih za pomnoževanje. Odstranili smo zaporedja z nizko kakovostjo (meja = 0,01) in kratka zaporedja (dol-

Preglednica 1: Informacije o vzorcih slovenskih ledenikov.

Ledenik:	Triglavski ledenik						Ledenik pod Skuto					
Čas vzorčenja:	začetek septembra (2018)						začetek septembra (2018)					
Koordinate vzorčenja:	46°22'43.6"N 13°50'35.7"E						46°21'57.4"N 44°33'33.7"E					
Oznaka elucijske frakcije po koncentriranju	T1E1	T1E2	T2E1	T2E2	T3E1	T3E2	S1E1	S1E2	S2E1	S2E2	S3E1	S3E2
Koncentracija RNA po izolaciji [ng/μL]	*	*	11,2	*	7,76	*	*	*	6,6	*	12,7	4,0
Koncentracija DNA po pomnoževanju [ng/μL]	74,8	14,9	56,6	67,4	78,0	100,0	63,2	53,0	75,0	92,8	70,4	104,0
Oznaka vzorca po združenju elucijskih frakcij	T1		T2		T3		S1		S2		S3	

* Pod mejo detekcije

Table 1: Information about samples from Slovenian glaciers.

Glacier:	Triglav glacier						Glacier below Skuta					
Sampling time:	Early September (2018)						Early September (2018)					
Sampling coordinates:	46°22'43.6"N 13°50'35.7"E						46°21'57.4"N 44°33'33.7"E					
Elution fraction name after concentration	T1E1	T1E2	T2E1	T2E2	T3E1	T3E2	S1E1	S1E2	S2E1	S2E2	S3E1	S3E2
RNA concentration after isolation [ng/μL]	*	*	11.2	*	7.76	*	*	*	6.6	*	12.7	4.0
DNA concentration after random preamplification [ng/μL]	74.8	14.9	56.6	67.4	78.0	100.0	63.2	53.0	75.0	92.8	70.4	104.0
Sample name after pooling of elution fractions	T1		T2		T3		S1		S2		S3	

* Below detection limit

žina < 25 nukleotidov). Pridobljena zaporedja smo nato uporabili za *de novo* sestavljanje zaporedij z uporabo programske opreme SPAdes 3.15.5 (BANKEVICH et al. 2012). Zaporedja odčitkov in *de novo* sestavljena zaporedja smo z uporabo DIAMOND BLASTx (Buchfink et al. 2015) primerjali s celotno ne-redundantno (nr) proteinsko podatkovno bazo NCBI (julij 2022). Taksonomsko klasifikacijo odčitkov in vizualizacijo rezultatov smo izvedli z uporabo programske opreme MEGAN Community Edition (verzija 6.24.0) (HUSON et al. 2016) z uporabo baze NCBI-nr vnosov posodobljenih februarja 2022, z analizo najnižjega skupnega prednika (ang. Lowest Common Ancestor).

Identiteto z znanimi virusnimi zaporedji, ki so depenirana v podatkovnih bazah, smo za daljša sestavljena zaporedja dodatno določili z uporabo NCBI BLASTx (2023-09-11). Njihovo pokritost z odčitki smo določili z CLC Genomics Workbench (orodje imenovano „Map reads to contigs“; dolžinsko ujemanje = 0,90, ujemanje podobnosti = 0,90). Prisotnost virusnih družin v vzorcih smo v obliki tabele izvozili iz programa MEGAN na podlagi taksonomske določitve odčitkov in sestavljenih zaporedij. Tekom pregledovanja prisotnosti virusnih družin smo ročno popravili nekatere napake v uporabljeni verziji programske opreme MEGAN (Community Edition, verzija 6.24.0), pri čemer smo upoštevali takrat veljavno klasifikacijo (Current ICTV Taxonomy Release 2023).

Filogenetske analize izbranih virusnih zaporedij

Za izgradnjo filogenetskih dreves smo se omejili na RNA virusom podobna zaporedja, ki so se pojavila v več vzorcih slovenskih ledenikov in so bila daljša od 1.000 nukleotidov. Izbrana sestavljena zaporedja so spadala v toti-podobno (zaporedje_T1_NODE282, zaporedje_T2_NODE2220, zaporedje_T3_NODE103) ter picorna-podobno (zaporedje_S2_NODE1003, zaporedje_S3_NODE129) virusno skupino. Izbranim nukleotidnim zaporedjem (Priloga A) smo z orodjem ORFfinder določili odprte bralne okvirje (ORF; ang. open reading frame). Proteinska zaporedja smo primerjali s podatko-

vno bazo NCBI nr proteinskih zaporedij z orodjem BLASTp. Analizo smo izvedli aprila 2023. Za izgradnjo filogenetskih dreves smo uporabili proteinska zaporedja. Ta so glede na analizo BLASTp predstavljala zaporedja od RNA odvisne RNA polimeraze (RdRp; ang. RNA-dependent RNA polymerase), ki velja za najbolj ohranjeno zaporedje pri RNA virusih (CHARON et al. 2020; SHI et al. 2016). Glede na rezultate analiz BLASTp smo za vsako virusno skupino pridobili zaporedja znanih virusov, ki so bila najbolj podobna našim zaporedjem (pridobili smo do 50 takih zaporedij).

Za vsako virusno skupino smo pridobljena zaporedja, skupaj z zaporedji pridobljenimi v naši raziskavi, uvozili v program MEGA (TAMURA et al. 2021). Dodali smo tudi zaporedje, ki predstavlja zunanjo skupino (ang. outgroup). Za zunanje skupine smo izbrali primerna sorodna virusna zaporedja, glede na predhodno objavljeno literaturo (CHARON et al. 2020; LEFKOWITZ et al. 2018; Shi et al. 2016). Vsa zaporedja smo poravnali z orodjem ClustalW (samodejni parametri) v MEGA, ter jih ročno pregledali. Nato smo jih dodatno poravnali z orodjem MAFFT (v. 7) z uporabo strategije »auto« (KATO & STANDLEY 2013). Pridobljeno poravnavo smo nato obdelali z orodjem za rezanje sekvenc TrimAL (v. 1.3) (CAPELLA-GUTIÉRREZ et al. 2009) z uporabo metode »automated 1«. Tako pridobljene poravnave (dolžina aminokislinske poravnave za toti-podobno skupino je bila 633 nukleotidov in za picorna-podobno skupino 339 nukleotidov), smo uporabili za izgradnjo dreves po metodi največjega verjetja (ang. Maximum Likelihood) z uporabo IQ-Tree z avtomatsko določitvijo substitucijskega modela in z določitvijo statistične podpore vej z metodo zankanja s 1000 ponovitvami (ang. bootstrap) (NGUYEN et al. 2015). Za prikaz filogenetskih dreves smo uporabili spletno orodje iTOL (ang. Interactive Tree Of Life) (Letunic & Bork 2021). Tekom poravnave zaporedij smo izločili taka, ki so bila identična ali pa se niso dobro prilegala poravnavi (so bila prekratka ali preveč različna). NCBI (eng. National Center for Biotechnology Information) identifikacijske oznake za zaporedja znanih virusov vključena v filogenetske analize so razvidna iz filogenetskih dreves.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Pregled rezultatov sekvenciranja in viromske analize

S sekvenciranjem šestih vzorcev ledenikov in dveh kontrol smo skupno pridobili 34.3 giga baz podatkov. Število

odčitkov se je za posamezni vzorec gibalo med 19.263.088 in 34.328.752, s povprečno dolžino 143 nukleotidov (Preglednica 2). Število odčitkov, ki so se z analizo DIAMOND/MEGAN klasificirali kot virusni se je gibalo med 35.812 in 162.372. Pri vzorcih Triglavskega ledeni-

Preglednica 2: Rezultati sekvenciranja za vzorce slovenskih ledenikov. Celokupno število odčitkov ter število odčitkov, ki so se klasificirali kot virusni.

Identifikacijska oznaka	SRA* Identifikacijska oznaka	Št. odčitkov	Št. odčitkov po rezanju koncev	Št. virusnih odčitkov	Virusni odčitki [%]
T1	SRR33121138	19263088	18565601	44137	0,23
T2	SRR33121137	34328752	32771522	134932	0,41
T3	SRR33121136	28789468	27718269	35812	0,12
S1	SRR33121135	33035406	31981686	162372	0,49
S2	SRR33121134	28411040	27035177	82848	0,29
S3	SRR33121133	27831094	26706246	98437	0,35

* Sequence Read Archive (SRA)

Table 2: Sequencing results for Slovenian glacier samples. Total read numbers and numbers of reads classified as viral.

Sample	SRA* accession number	Raw Reads	Reads after Trimming	No. of reads classified as viral	Reads classified as viral [%]
T1	SRR33121138	19,263,088	18,565,601	44,137	0.23
T2	SRR33121137	34,328,752	32,771,522	134,932	0.41
T3	SRR33121136	28,789,468	27,718,269	35,812	0.12
S1	SRR33121135	33,035,406	31,981,686	162,372	0.49
S2	SRR33121134	28,411,040	27,035,177	82,848	0.29
S3	SRR33121133	27,831,094	26,706,246	98,437	0.35

* Sequence Read Archive (SRA)

ka, število takih virusnih odčitkov predstavlja povprečno $0,26 \pm 0,12$ (standardni odklon) % vseh odčitkov, pri vzorcih ledenika pod Skuto pa $0,38 \pm 0,08$ (standardni odklon) % (Preglednica 2).

Nizki odstotki virusnih odčitkov v vzorcih ledenikov so pričakovani in v skladu s predhodnimi raziskavami okoljskih vzorcev (DE CÁRCER et al. 2015; Prado et al. 2022). Najverjetneje je to posledica nizke koncentracije virusov in njihovih nukleinskih kislin v vzorcih, omejitev virusnih podatkovnih baz, kratkih dolžin odčitkov nastalih pri sekvenciranju s platformo Illumina ter novosti tipa podatkovnih setov (BELLAS & ANESIO 2013). Zaradi omejenih informacij o virusih v ekstremnih okoljih, je njihova zastopanost v podatkovnih bazah nizka (EDWARDS et al. 2013). V raziskavi antarktičnih vodnih okolij večine odčitkov in sestavljenih zaporedij ni bilo možno taksonomsko določiti, kar nakazuje, da ima velik del analizirane virusne raznolikosti nizko podobnost z zaporedji prisotnimi v podatkovnih bazah in predstavlja nove še ne odkrite virusne vrste (De Cárcer et al. 2016).

V vseh vzorcih slovenskih ledenikov se je največje število odčitkov klasificiralo znotraj virusnega sveta *Duplodnaviria*, kamor spadajo virusi z linearnimi dsDNA genomi in značilnimi kapsidnimi proteini s t.i.

»HK97 fold« (DUDA & TESCHKE 2019). Temu pa so sledili svetovi: *Riboviria* z RNA virusi, ki kodirajo homologno od RNA odvisno polimerazo (KUHN et al. 2017), *Monodnaviria* z virusi s krožnimi ssDNA genomi (KAZLAUSKAS et al. 2019) in *Varidnaviria*, kamor spadajo virusi z dsDNA, za katere so značilni homologni kapsidni proteini, ki vsebujejo t.i. »jelly roll« proteinsko strukturo (Woo et al. 2021) (Slika 3).

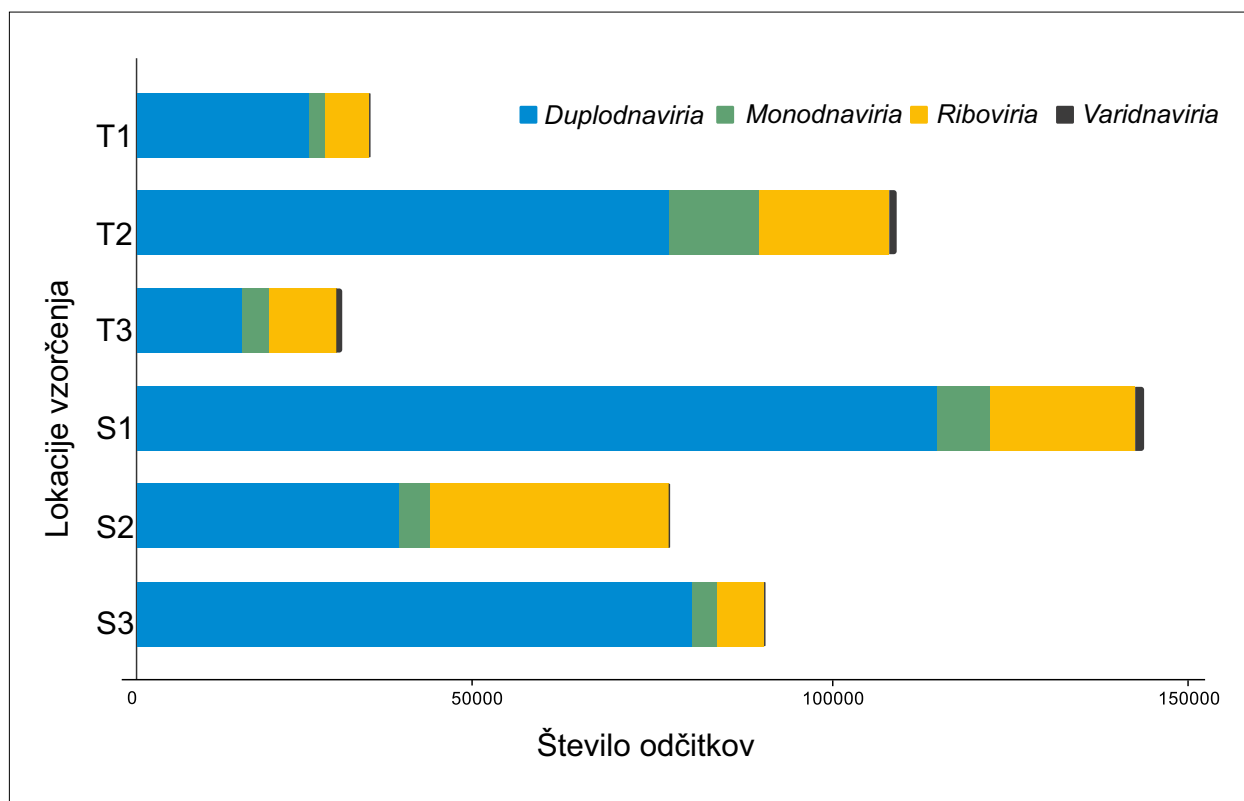
Postopek priprave vzorcev slovenskih ledenikov pred sekvenciranjem (zlasti izolacija nukleinskih kislin) smo usmerili v opis raznolikosti RNA virusnih zaporedij, ki spadajo v svet *Riboviria*. Kljub temu v vzorcih prevladujejo odčitki, ki so se klasificirali znotraj sveta *Duplodnaviria*, natančneje kot razred *Caudoviricetes*, kamor spadajo dsDNA bakteriofagi (Slika 3). Za zaznavo virusne DNA obstajajo različni razlogi, npr. izolacija DNA skupaj z RNA, saj po izolaciji nismo izvedli reakcije z DNazo ali pa zaznava informacijske RNA DNA virusov. Predstavniki razreda *Caudoviricetes* so ena izmed najbolj razširjenih bioloških entitet na svetu, zaradi česar so dobro zastopani v podatkovnih bazah (KRUPOVIC et al. 2011). V viromskih raziskavah antarktične prsti so v vseh vzorcih prevladovali predstavniki razreda *Caudoviricetes* (ADRIAENSSENS et al. 2017).

Taksonomska določitev zaporedij RNA virusov

V nadaljevanju rezultatov in diskusije se bomo osredotočili na RNA virusna zaporedja, ki so se v analizi podatkov klasificirala znotraj sveta *Riboviria*. V vseh vzorcih slovenskih ledenikov smo zaznali naslednje virusne družine: *Totiviridae*, *Leviviridae*, *Narnaviridae* in *Partitiviridae* (Slika 4). Predstavniki družine *Totiviridae* okužujejo glive in praživali (KING et al. 2011), nedavno pa so bili odkriti tudi v številnih nevretenčarjih (ZHAO et al. 2022). Virusi iz virusne družine *Narnaviridae* okužujejo predvsem kvasovke in oomicete (HILLMAN & CAI 2013), predstavniki virusne družine *Partitiviridae* pa so povezani z okužbami gliv, praživali ter rastlin (VAINIO et al. 2018). Levivirusi so ssRNA bakteriofagi brez ovojnice. Red *Picornavirales* trenutno združuje 9 virusnih družin, od katerih se je v vsaj enem izmed vzorcev slovenskih ledenikov pojavilo 5 družin - *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Picornaviridae* in *Secoviridae*. Predstavniki virusnih družin znotraj reda okužujejo zelo različne gostitelje (KING et al. 2011). V raziskavi antark-

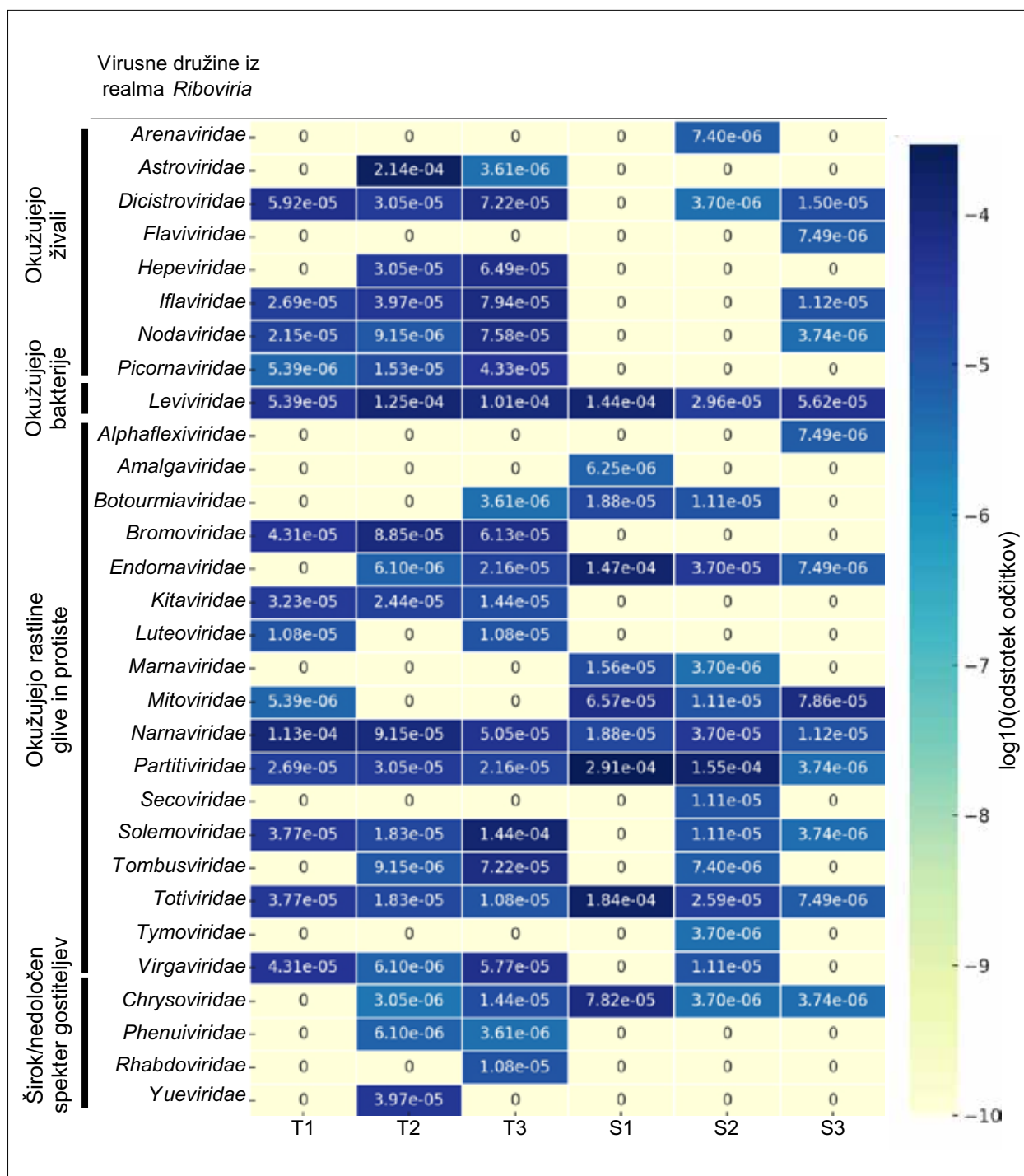
tičnega jezera Limnopolar so odkrili, da med RNA virusi prevladujejo ssRNA virusi iz reda *Picornavirales*. Identificirali so štiri skoraj popolne virusne genome; eden je najbolj soroden virusom žuželk, trije pa so glede na filogenetsko analizo najbolj podobni drugim predstavnikom reda, ki okužujejo protiste. (LÓPEZ-BUENO et al. 2015).

Kratki odčitki pridobljeni s sekvenciranjem na platformi Illumina nam lahko podajo omejeno količino informacij o taksonomski sestavi virusne skupnosti, saj številni odčitki pripadajo zelo divergentnim regijam virusnih genomov, ki imajo nizko podobnost s tistimi, ki so na voljo v bazah podatkov. Drugačen vpogled lahko dobimo, če odčitke sestavimo v daljša zaporedja, ki jim lahko bolj zanesljivo določimo podobnost z že znanimi virusnimi zaporedji, jih taksonomsko klasificiramo in vključimo v filogenetsko analizo. Pogosto pa so nekatera virusna zaporedja, kljub temu, da predstavljajo skoraj celoten virusni genom, tako drugačna od znanih virusnih zaporedij, da jih ne moremo uvrstiti v nobeno znano virusno družino (RASTROJO & ALCAMÍ 2017).



Slika 3: Klasifikacija odčitkov pridobljenih z viromsko analizo vzorcev slovenskih ledenikov v različne virusne svetove. Identifikacijske oznake lokacij vzorčenja so razložene v Preglednici 1.

Figure 3: Classification of reads obtained from viromic analysis of Slovenian glacier samples into different viral realms. Identification labels for sampling locations are explained in Table 1.



Slika 4: Virusne družine iz sveta *Riboviria* (v vrsticah) zaznane v vzorcih slovenskih ledenikov (v stolpcih) na podlagi analize odčitkov. Predstavljeni so odstotki odčitkov klasificiranih v virusne družine znotraj sveta *Riboviria* glede na število vseh odčitkov pridobljenih pri sekvenciranju posameznih vzorcev. Barvna intenzivnost odraža logaritemsko transformirane vrednosti. Imena družin virusov na levi so združena v skladu s kategorijami gostiteljev.

Figure 4: Viral families from the realm *Riboviria* (in lines) detected in Slovenian glacier samples (in columns) based on reads analysis. The percentage of reads classified into viral families within the realm *Riboviria* are presented according to the number of all reads obtained by sequencing of individual Slovenian glacier samples. Color intensity reflects logarithmically transformed values. Viral family names on the left are grouped according to the host-based categories.

Analiza izbranih RNA virusnih sestavljenih zaporedij in rezultati filogenetskih analiz

V vzorcih analiziranih ledenikov se je število sestavljenih zaporedij gibalo med 18.966 in 116.375. Zaporedja smo taksonomsko določili z analizo s programoma DIAMOND in MEGAN ter tako zaznali od 887 do 2.912 virusnih sestavljenih zaporedij na vzorec. V vseh vzorcih Triglavskega ledenika smo zaznali sestavljena zaporedja, ki so se klasificirale znotraj RNA virusnih družin *Leviviridae*, *Narnaviridae* in *Solemoviridae*. V vseh vzorcih ledenika pod Skuto pa zaporedja, ki so se klasificirala znotraj RNA virusnih družin *Totiviridae*, *Endornaviridae*, *Mitoviridae* in *Partitiviridae* (Priloga B). Številnim virusnim družinam sta se v posameznem ledeniškem vzorcu pripisala samo en ali dva sestavljena zaporedja. Za nadaljnje analize vzorcev Triglavskega ledenika smo izbrali sestavljena zaporedja, ki so se v analizi klasificirala kot pripadniki sveta *Riboviria* in so bila daljša od 3.000 nukleotidov (identificirali smo 29 takšnih zaporedij, Priloga A). Pri vzorcih ledenika pod Skuto pa smo v analizi vključili sestavljena zaporedja daljša od 1.000 nukleotidov (identificirali smo 19 takšnih virusnih zaporedij). Daljša virusna zaporedja so imela nizko podobnost z znanimi virusnimi zaporedji (Priloga A), kar je v skladu z že objavljenimi študijami (DE CÁRCER et al. 2015, 2016). Za sestavljena zaporedja iz vzorcev Triglavskega ledenika so bile identitete aminokislinskih zaporedij v primerjavi z najbolj podobnimi znanimi zaporedji med 27 % in 57 %, pri ledeniku pod Skuto pa med 24 % in 87 %. Nizke vrednosti identitet pridobljene v analizi BLASTx nakazujejo na to, da gre za zaporedja novih divergentnih virusov, ki se razlikujejo od zaporedij že objavljenih virusnih genomov. Najvišjo identiteto z znanimi zaporedji (87 %) smo določili zaporedju iz vzorca ledenika pod Skuto (zaporedje_S1_NODE2809, 2.579 nt). Analiza BLASTx je kot najbližji zadetek podala kratko zaporedje RdRp poimenovano *Riboviria* sp. (QRQ90237.1, 165 aa), ki so ga zaznali v raziskavi vodnih vzorcev iz pristanišč kitajske reke Jangce (LU et al. 2022).

Nekatera daljša virusna zaporedja bi lahko predstavljala skoraj celotne virusne genome, glede na to, da sta dolžina in genomska organizacija podobni znanim virusom, ki predstavljajo najboljše zadetke iz analize BLASTx. Na primer, najdaljše virusno sestavljeno zaporedje (zaporedje_S2_NODE85, 9.730 nt) je imelo glede na rezultate BLASTx najvišjo identiteto (28 %) z zaporedjem poliproteina, uvrščenega kot *Picornaviridae* sp. (URGI4946.1, 2622 aa), iz raziskave kopenskih RNA viromov na Kitajskem (CHEN et al. 2022). Največje število dolgih virusnih sestavljenih zaporedij, ki smo jih klasificirali znotraj sveta *Riboviria*, smo odkrili v vzorcu T3 (odkrili smo 15 takšnih virusnih zaporedij).

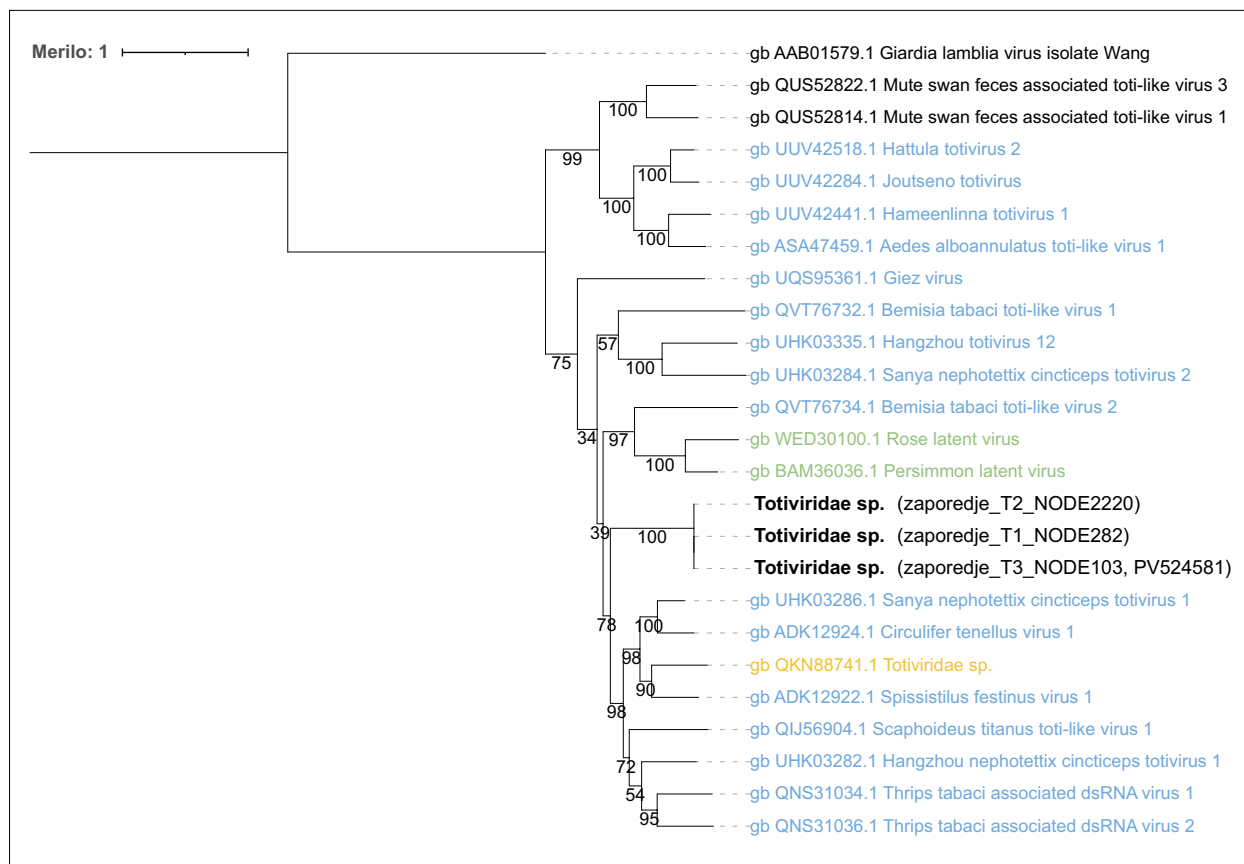
Nekaj sestavljenih zaporedij iz analiziranih vzorcev (zaporedje_T1_NODE249, zaporedje_T3_NODE81, zaporedje_T3_NODE208, zaporedje_S1_NODE6362 in zaporedje_S2_NODE1026) je imelo najvišjo identiteto z zaporedji, ki so jih Shi et al. (2016) pridobili pri preučevanju nevretenčarskih RNA viromov. To ne pomeni, da omenjena sestavljena zaporedja zagotovo pripadajo virusom nevretenčarjev, saj je določanje gostiteljev na podlagi metagenomskih študij težavno. Da bi dobili vpogled v sorodnost odkritih virusnih zaporedij z že znanimi virusi ter dodatno informacijo o možnih gostiteljskih organizmih, smo s filogenetskimi analizami analizirali dve skupini virusnih zaporedij, ki smo jih zaznali v različnih preučevanih vzorcih. V vzorcih Triglavskega ledenika smo odkrili skupino toti-podobnih virusnih zaporedij, v vzorcih ledenika pod Skuto pa picorna-podobna virusna zaporedja.

Toti-podobna virusna zaporedja

Predstavniki virusne družine *Totiviridae* imajo dsRNA genome (dolge 4,6 - 7,0 kbp), ki vsebujejo dva bralna okvirja. Virusi te družine, ki jih uvrščamo v pet različnih rodov, so bili prvotno povezani z latentnimi okužbami gliv ali protistov (KING et al. 2011). Nedavno pa je bilo odkritih veliko toti-podobnih virusov iz vzorcev nevretenčarjev (npr. v vinskih mušicah, komarjih, mravljah in rakah). Nekateri novo opisani toti-podobni virusi imajo dodatne gene, ki so lahko posledica evolucijske prilagoditve na mehanizme za okuževanje in širjenje v omenjenih gostiteljih (SANDLUND et al. 2021). Predlaganih je bilo več novih rodov; *Artivirus* (pri členonožcih) (ZHAI et al. 2010), *Tricladivirus* (pri ploskih črvih) (BURROWS et al. 2020) in *Pistolvirus* (pri ribah) (SANDLUND et al. 2021), vendar se večina živalskih toti-podobnih virusov filogenetsko ne uvršča znotraj predlaganih rodov.

V analizi smo v vseh treh vzorcih Triglavskega ledenika zaznali toti-podobna sestavljena zaporedja in sicer naslednje: zaporedje_T1_NODE282 (4.073 nt), zaporedje_T2_NODE2220 (4.143 nt) in zaporedje_T3_NODE103, 7.306 nt). Ta tri sestavljena zaporedja so si bila na prekrivajočem delu nukleotidnega zaporedja podobne več kot 99,5 %. Analiza BLASTx je kot najboljši zadetek z identiteto 42,63 % podala RdRp zaporedje Hangzhou nephotettix cincticeps totivirusa 1, najdeno v riževi zeleni ščitkariki (*Nephotettix cincticeps*). Najdaljše toti-podobno zaporedje (zaporedje_T3_NODE103, 7.306, GenBank accesion: PV524581) vsebuje dva bralna okvirja in po dolžini ustreza celotni dolžini genoma.

V filogenetski analizi so se odkrita toti-podobna virusna zaporedja gručila s toti-podobnimi virusi, ki so glede na obstoječo literaturo povezani z žuželkami



Slika 5: Filogenetsko drevo zgrajeno po metodi največjega verjetja za toti-podobna virusna zaporedja najdena v vzorcih Triglavskega ledenika. Osnova je poravnava virusnih sestavljenih zaporedij, ki so bila z analizo BLASTx najbolj podobne »Hangzhou *nephotettix cincticeps* totivirus 1« (UHK03282.1) ter drugih najbolj sorodnih zaporedij. Izbrana virusna zaporedja vsebujejo zaporedja klasificirana kot od RNA odvisna polimeraza (RdRp). Za koreninjenje drevesa smo uporabili zunanjo skupino (virusno zaporedje »*Giardia lamblia* virus isolate Wang«). Virusna zaporedja pridobljena iz vzorcev Triglavskega ledenika so označena odebeljeno. Številke ob vejah predstavljajo statistično podporo skupin, pridobljeno z metodo zanka; dolžine vej pa predstavljajo povprečno število aminokislinskih zamenjav na mesto. Legenda predstavlja povezavo posameznih virusnih zaporedij z izvirnim materialom.

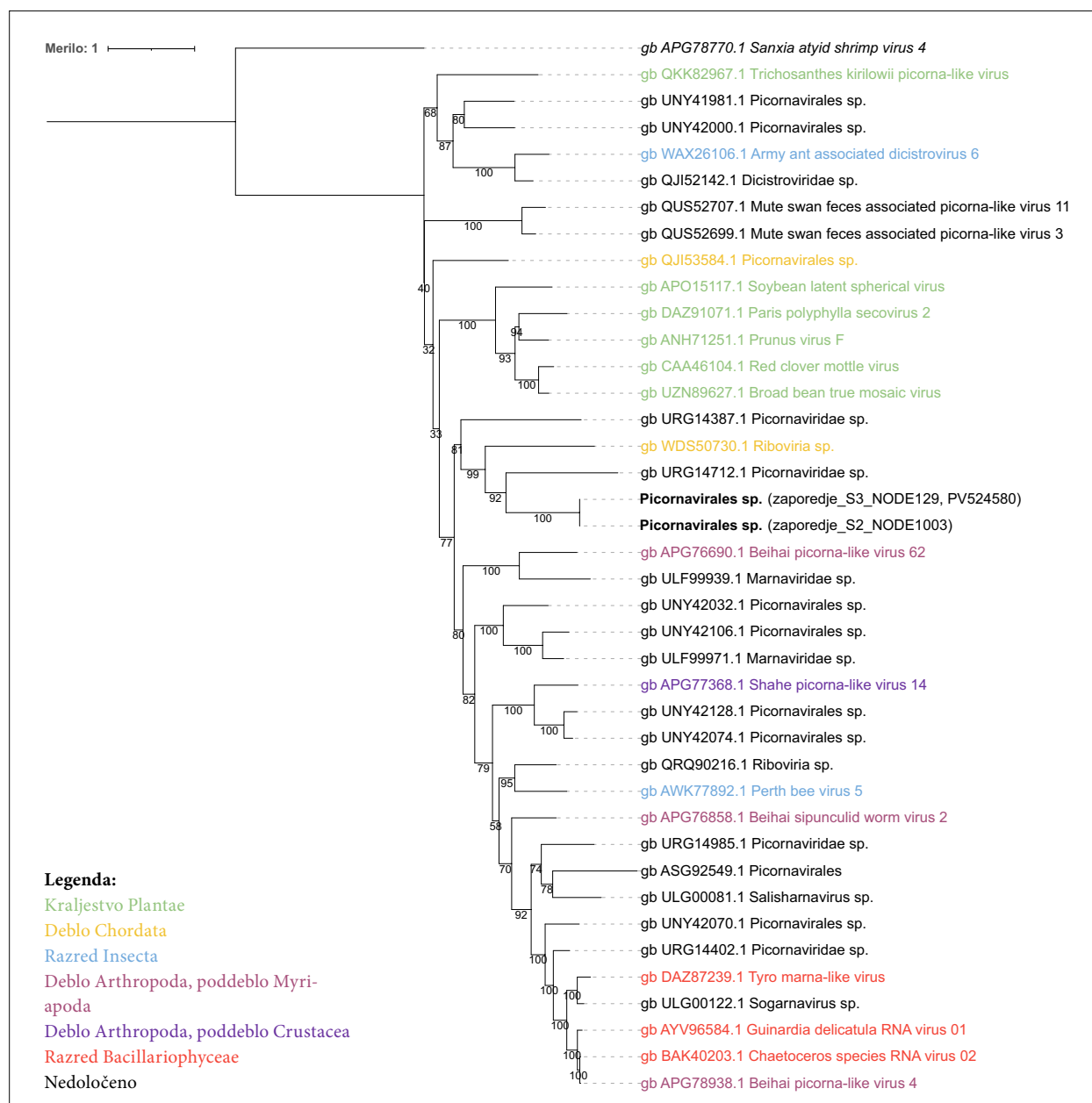
Figure 5: Maximum likelihood phylogenetic tree created for toti-like viral sequences found in samples from Triglav Glacier. The tree is based on an alignment of viral contigs that showed the highest similarity to "Hangzhou *Nephotettix cincticeps* totivirus 1" (UHK03282.1) in the BLASTx analysis, as well as other closely related sequences. The selected viral sequences include those classified as encoding RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was rooted using an outgroup sequence ("*Giardia lamblia* virus isolate Wang"). Viral sequences obtained from Triglav Glacier samples are marked in bold. Numbers on branches represent bootstrap support values, and branch lengths indicate the average number of amino acid substitutions per site. The legend shows the association between individual viral sequences and their source material.

(Slika 5). *Scaphoideus titanus* toti-like virus 1 so našli v fitoplazemskem vektorju *Scaphoideus titanus* (OTTATI et al. 2020), *Thrips tabaci* associated dsRNA virus 1 so našli v tobakovem resarju (CHIAPELLO et al. 2021) in *Spissistilus festinus* virus 1 ter *Circulifer tenellus* virus 1 v gostiteljih iz rodu stenice (SPEAR et al. 2010). Zaporedja zaznana v vzorcih Triglavskega ledenika in pa genomi omenjenih znanih virusov kodirajo protein bogat z pro-

linom in alaninom (eng. proline-alanine rich protein, PARp) ter RdRp.

Picorna-podobna virusna zaporedja

Predstavniki virusnih družin znotraj reda *Picornavirales* so majhni virusi ikozaedrične oblike s ssRNA geno-



Slika 6: Filogenetsko drevo zgrajeno po metodi največjega verjetja za picorna-podobna virusna zaporedja najdena v vzorcih ledenika pod Skuto. Osnova je poravnava virusnih sestavljenih zaporedij, ki so bile z analizo BLASTx najbolj podobne zaporedju uverščenem kot Picornaviridae sp. (URG14712.1). Izbrana virusna zaporedja vsebujejo zaporedja klasificirana kot RdRp. Za koreninjenje drevesa smo uporabili zunanjo skupino (virusno zaporedje »Sanxia atyid shrimp virus 4«). Virusna zaporedja izolirana iz vzorcev ledenika pod Skuto so označena odebeljeno. Številke ob vejah predstavljajo statistično podporo skupin, pridobljeno z metodo zankanja; dolžine vej pa predstavljajo povprečno število aminokislinskih zamenjav na mesto. Legenda predstavlja povezavo posameznih virusnih zaporedij z gostiteljskimi organizmi oziroma izvornim materialom.

Figure 6: Maximum likelihood phylogenetic tree constructed for picorna-like viral sequences identified in samples from the glacier below Mount Skuto. The tree is based on an alignment of viral contigs that showed the highest similarity in the BLASTx analysis to a sequence named Picornaviridae sp. (URG14712.1). The selected viral sequences include those classified as encoding RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The tree was rooted using an outgroup sequence ("Sanxia atyid shrimp virus 4"). Viral sequences isolated from the Skuto Glacier samples are indicated in bold. Numbers next to the branches represent statistical support values obtained through bootstrapping, while branch lengths indicate the average number of amino acid substitutions per site. The legend links individual viral sequences to their host organisms or source material.

mi. Okužujejo zelo različne gostitelje vključno z vretenčarji (družina *Picornaviridae*), višjimi rastlinami (družina *Secoviridae*), nevretenčarji (družini *Dicistroviridae* in *Flaviridae*) ter protisti (družina *Marnaviridae*) (KING et al. 2011). Kljub različnim gostiteljem in številnim razlikam v strukturi genoma imajo vsi predstavniki redu *Picornavirales* in mnogi še neklasificirani picorna-podobni virusi skupni nabor filogenetsko sorodnih proteinov (ZELL et al. 2022).

V analizi smo v dveh vzorcih ledenika pod Skuto zaznali picorna-podobna virusna sestavljena zaporedja in sicer: zaporedje_S2_NODE1003 (2.686 nt) in zaporedje_S3_NODE129 (8.375 nt), ki sta si bili na prekrivajočem delu nukleotidnega zaporedja podobni več kot 99,8 %. Analiza BLASTx je kot najboljši zadetek z identiteto 29,74 % (zaporedje_S2_NODE1003) in 27,38 % (zaporedje_S3_NODE129) podala zaporedje RdRp uvrščeno kot *Picornaviridae* sp. (URG14712.1, 1841 aa), ki izvira iz metagenoma sedimenta (CHEN et al. 2022). Na podlagi dolžine genomov znanih picorna-podobnih virusov sklepamo, da eno izmed sestavljenih zaporedij

(zaporedje_S3_NODE129, 8.375 nts, GenBank accesson: PV524580) predstavljala celoten virusni genom.

V filogenetski analizi sta bili picorna-podobni zaporedji iz vzorcev ledenika pod Skuto najbolj sorodni z zaporedji, ki so jih odkrili v treh metagenomskih študijah: študiji kopenskih RNA viromov na Kitajskem (CHEN et al. 2022), študiji picorna-podobnih virusov v nemški reki Havel (ZELL et al. 2022) in v študiji virusov pri pticah iz divjine in živalskega vrta na Kitajskem (DAI et al. 2023) (Slika 6). V filogenetsko analizo picorna-podobnih zaporedij smo vključili številna virusna zaporedja, ki so bila pridobljena iz metagenomskih študij okoljskih vzorcev. Pri teh raziskavah gostitelji virusov pogosto niso znani oziroma obstaja določena mera negotovosti glede določitve resničnega gostitelja – na primer, ali so živali, pri katerih so viruse zaznali, res njihovi gostitelji, ali pa so ti virusi povezani z mikrobiomom teh živali. To poudarja potrebo po nadaljnjih raziskavah, ki bi razjasnile povezavo novo odkritih virusov z njihovimi gostitelji in ekološko vlogo picorna-podobnih virusov v različnih okoljih.

ZAKLJUČKI

V okviru raziskave smo iz vzorcev Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto po koncentriranju vzorcev uspešno izolirali nukleinske kisline, jih pomnožili in analizirali z uporabo netarčnega sekvenciranja na platformi Illumina. Kljub pričakovano nizkemu številu odčitkov, ki jih je bilo mogoče zanesljivo klasificirati kot virusna zaporedja, so vzorci slovenskih ledenikov razkrili prisotnost nukleinskih kislin, pripadajočih različnim virusnim svetovom in družinam. Ta raznolikost nakazuje, da ledeniški habitati, čeprav izrazito neprijazni za večino življenja, gostijo kompleksne virusne skupnosti. Čeprav je bil eksperimentalni pristop osredotočen na zaznavanje RNA virusov, so rezultati pokazali, da so bili v vzorcih najpogosteje prisotni odčitki, pripadajoči DNA bakteriofagom iz sveta *Duplodnaviria*, kar lahko kaže na prevladujočo mikrobo sestavo ledeniških ekosistemov. V manjšem obsegu so bili prisotni tudi RNA virusi iz sveta *Riboviria*, kot tudi predstavniki svetov *Monodnaviria* (ssDNA virusi) in *Varidnaviria*. Z nadaljnjo analizo daljših sestavljenih RNA virusnih zaporedij smo ugotovili, da imajo pridobljena zapo-

redja nizko podobnost s sekvencami znanih virusov (24 - 87 %), kar potrjuje domnevo o visoki neraziskanosti virusov v ledeniških okoljih ter kaže na prisotnost številnih do sedaj neznanih virusnih vrst. Z uporabo filogenetskih analiz smo podrobneje raziskali dve skupini virusnih zaporedij: toti-podobne RNA viruse, ki smo jih zaznali v vzorcih Triglavskega ledenika, ter picorna-podobne RNA viruse, ki so bili prisotni v vzorcih ledenika pod Skuto.

Ta raziskava predstavlja prvi vpogled v virom slovenskih ledenikov in s tem pomembno razširja obzorje razumevanja virusne raznolikosti v ledeniških ekosistemih. Glede na hitro krčenje ledenikov zaradi podnebnih sprememb, pridobljeni podatki predstavljajo dragocen prispevek k razumevanju biotske raznovrstnosti v teh habitatih. Nadaljnje raziskave virusov v ledenikih bi lahko osvetlile njihove interakcije z mikrobnimi gostitelji, njihov pomen v evolucijskem kontekstu ter ekološko vlogo ledeniških virusov, vključno z vplivom na strukturo in dinamiko mikrobnih skupnosti v ledenikih in kroženje snovi, kar je še posebej za RNA viruse slabo raziskano.

SUMMARY

We successfully isolated nucleic acids from samples collected from the Triglav Glacier and the glacier beneath

Skuta, following sample concentration. The nucleic acids were amplified and analyzed using shotgun sequencing

on the Illumina platform. In total, the six glacier samples and two negative controls yielded 34.3 gigabases of sequencing data, with read counts per sample ranging from 19 to 34 million and an average read length of 143 nucleotides. Using the DIAMOND and MEGAN tools, we identified between 36,000 and 162,000 viral reads per sample, representing 0.12 % to 0.49 % of the total reads. Despite the expectedly low number of reliably classifiable viral sequences, the samples from Slovenian glaciers revealed the presence of nucleic acids belonging to various viral realms and families. This diversity indicates that glacier habitats—although extremely inhospitable to most life—harbor complex viral communities. Although our experimental approach focused on the detection of RNA viruses, the most frequently detected reads belonged to DNA bacteriophages from the realm *Duplodnaviria*, likely reflecting the dominant microbial composition of glacier ecosystems. To a lesser extent, RNA viruses from the realm *Riboviria*, as well as representatives of *Monodnaviria* (ssDNA viruses) and *Varidnaviria*, were also present. Further analysis of longer assembled RNA viral contigs using BLASTx revealed that the obtained sequences had low similarity to known viruses. Amino acid sequence identities compared to the

closest known references ranged from 24 % to 87 %, supporting the hypothesis of a largely unexplored virosphere in glacial environments and indicating the presence of numerous previously unknown viral species. Using phylogenetic analyses, we further investigated two groups of viral sequences: toti-like RNA viruses detected in the Triglav Glacier samples and picorna-like RNA viruses found in the Skuta Glacier samples.

This research provides the first insight into the virome of Slovenian glaciers and significantly expands our understanding of viral diversity in glacial ecosystems. In addition to documenting the presence of numerous potentially novel viruses, it highlights the methodological challenges of studying viral communities in low-biomass environments. Given the rapid retreat of glaciers due to climate change, the data offers a valuable contribution to understanding biodiversity in these habitats. Further research on viruses in glaciers could shed light on their interactions with microbial hosts, their significance in an evolutionary context, and the ecological roles of glacial viruses — including their impact on the structure and dynamics of microbial communities in glaciers and on nutrient cycling — which remain particularly poorly explored for RNA viruses.

ZAHVALA

Delo je financirala Agencija RS za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost (ARIS), v okviru raziskovalnega programa št. P4-0407.

			Rezultati BLASTx
Identifikacijske oznake sestavljenih zaporedij	Dolžina sestavljenega zaporedja [nt]	Število odčitkov, ki pokrivajo zaporedje	Znanstveno ime
zaporedje_T1_NODE221	4.703	5826	hipotetični protein 1 [ssRNA positive-strand virus sp.]
zaporedje_T1_NODE282	4.073	1276	RdRp [Hangzhou nephotettix cinctineps totivirus 1]
zaporedje_T1_NODE256	4.278	325	nestrukturni protein 1b [Stellavirales sp.]
zaporedje_T1_NODE62	9.138	3085	domnevni poliprotein [Picornavirales]
zaporedje_T1_NODE249	4.376	4357	hipotetični protein 3 [Hubei sobemo-like virus 2]
zaporedje_T2_NODE1923	4.484	268	RdRp [Enontekio yuevirus]
zaporedje_T2_NODE2220	4.143	2793	RdRp [Hangzhou nephotettix cincticeps totivirus 1]
zaporedje_T2_NODE4122	3.007	390	protein bogat z prolinom in alaninom [Scaphoideus titanus toti-like virus 1]
zaporedje_T2_NODE4073	3.024	260	protein A RdRp [Nodaviridae sp.]
zaporedje_T2_NODE1229	5.578	1528	hipotetični protein [Nelson Astrovirus-like 1]
zaporedje_T2_NODE470	8.978	2798	domnevni poliprotein [Picornavirales sp.]
zaporedje_T2_NODE572	8.229	4771	kapsularni protein [Picornaviridae sp.]
zaporedje_T2_NODE2032	4.342	1680	hipotetični protein [Tombusviridae sp.]
zaporedje_T2_NODE448	9.111	6863	ORF1 [Ngewotan negevirus]
zaporedje_T3_NODE103	7.306	6331	RdRp [Hangzhou nephotettix cincticeps totivirus 1]
zaporedje_T3_NODE203	5.087	445	nestrukturni poliprotein [Hepelivirales sp.]
zaporedje_T3_NODE84	8.200	856	poliprotein [Hypera postica associated iflavirus 1]
zaporedje_T3_NODE86	8.149	2135	nestrukturni poliprotein [Arabidopsis halleri dicistro-like virus 1]
zaporedje_T3_NODE392	3.353	1111	RdRp [Leviviridae sp.]
zaporedje_T3_NODE214	4.854	998	poliprotein 2ab [Solemoviridae sp.]
zaporedje_T3_NODE448	3.115	418	domnevni poliprotein [Picornaviridae sp.]
zaporedje_T3_NODE193	5.192	594	RdRp [Riboviria sp.]
zaporedje_T3_NODE234	4.600	984	domnevna RdRp [Narnaviridae sp.]
zaporedje_T3_NODE81	8.346	615	hipotetični protein [Beihai picorna-like virus 57]
zaporedje_T3_NODE208	4.974	1323	poliprotein [Beihai zhaovirus-like virus 1]
zaporedje_T3_NODE68	9.262	326	ORF 1 [Ngewotan negevirus]
zaporedje_T3_NODE218	4.752	4385	hipotetični protein [Narnaviridae sp.]
zaporedje_T3_NODE293	4.050	1651	domnevna RdRp [Tombusviridae sp.]
zaporedje_S1_NODE14414	1.201	5294	hipotetični protein [Hubei alphaflexivirus]
zaporedje_S1_NODE16976	1.121	154	domnevna RdRp [Partitiviridae sp.]
zaporedje_S1_NODE21322	1.018	53	plaščni protein [Erysiphe necator associated totivirus 5]
zaporedje_S1_NODE8994	1.482	124	RdRp [Asopus mito-like virus]
zaporedje_S1_NODE2809	2.579	232	RdRp [Riboviria sp.]
zaporedje_S1_NODE7723	1.596	602	hipotetični protein [Beihai picorna-like virus 97]
zaporedje_S1_NODE6362	1.755	309	hipotetični protein [Changjiang crawfish virus 4]
zaporedje_S2_NODE1003	2.686	98	RdRp [Picornaviridae sp.]
zaporedje_S2_NODE85	9.730	102	poliprotein [Picornaviridae sp.]
zaporedje_S2_NODE1751	2.086	16932	RdRp A [Nodaviridae sp.]
zaporedje_S2_NODE2437	1.813	62	RdRp [Flumine sobemo-like virus 7]
zaporedje_S2_NODE7277	1.094	84	domnevna RdRp [Sanya botourmia-like virus 12]
zaporedje_S2_NODE1026	2.657	27	hipotetični protein 1 [Beihai picorna-like virus 64]
zaporedje_S2_NODE1180	2.488	252	hipotetični protein [Riboviria sp.]
zaporedje_S2_NODE2878	1.670	200	hipotetični protein 2 [Sichuan sediment noda-like virus 6]
zaporedje_S3_NODE9717	1.383	233	RdRp [Bolbocoleon piliferum mito-like virus]
zaporedje_S3_NODE4353	2.105	51	RdRp [Asopus mito-like virus]
zaporedje_S3_NODE129	8.375	315	RdRp [Picornaviridae sp.]
zaporedje_S3_NODE11337	1.261	6963	hipotetični protein [Pseudoglobivirus]

* število prekrivajočih se aminokislin/dolžina aminokislinskega zaporedja najbližjega zadetka (odstotek identitete)

* number of matching amino acids/number of total amino acids of the closest protein hit (percentage of amino acid identity)

	E-vrednost	Identiteta*	Številka NCBI vnosa
	1,00 x 10 ⁻⁸³	178/497 (36%)	QVG74697.1
	2,00 x 10 ⁻¹⁶⁹	180/499 (36%)	UHK03282.1
	3,00 x 10 ⁻¹⁵	83/310 (27%)	WAY16543.1
	0	496/1222 (41%)	ULF99687.1
	2,00 x 10 ⁻¹⁵	85/278 (31%)	APG75904.1
	0	371/1045 (36%)	UYE93960.1
	3,00 x 10 ⁻¹⁶⁹	321/753 (43%)	UHK03282.1
	6,00 x 10 ⁻⁶⁶	203/717 (28%)	QIJ56905.1
	4,00 x 10 ⁻⁶⁷	245/844 (29%)	QGL06818.1
	0	469/1401 (33%)	QZZ63399.1
	0	496/1222 (41%)	ULF99687.1
	3,00 x 10 ⁻⁴⁷	189/706 (27%)	URG14713.1
	6,00 x 10 ⁻³⁰	122/377 (32%)	UHS72369.1
	2,00 x 10 ⁻¹⁰⁶	318/1046 (30%)	QIH12214.1
	9,00 x 10 ⁻¹⁶³	321/753 (43%)	UHK03282.1
	3,00 x 10 ⁻¹⁶⁹	369/1138 (32%)	WAY16518.1
	0	841/2651 (32%)	QUS52852.1
	0	597/1549 (39%)	DAZ89854.1
	0	320/559 (57%)	URG15442.1
	8,00 x 10 ⁻⁵⁹	147/404 (36%)	QXV86403.1
	7,00 x 10 ⁻⁹⁰	165/309 (53%)	ULF99687.1
	5,00 x 10 ⁻⁷⁴	176/484 (36%)	QDH88311.1
	2,00 x 10 ⁻²⁹	176/639 (28%)	UJQ92819.1
	0	861/2396 (36%)	APG76773.1
	1,00 x 10 ⁻²⁴	111/356 (31%)	APG78145.1
	2,00 x 10 ⁻¹⁰⁶	318/1046 (30%)	QIH12214.1
	3,00 x 10 ⁻³⁸	121/347 (35%)	UJQ92733.1
	1,00 x 10 ⁻⁵³	135/368 (37%)	USC30226.1
	4,00 x 10 ⁻¹²⁶	183/358 (51%)	QYF50141.1
	2,00 x 10 ⁻¹⁹	51/138 (37%)	USE08318.1
	3,00 x 10 ⁻¹²⁷	178/262 (68%)	QJW70334.1
	3,00 x 10 ⁻⁷¹	163/443 (37%)	DAZ87262.1
	1,00 x 10 ⁻⁶⁵	122/141 (87%)	QRQ90237.1
	9,00 x 10 ⁻⁴⁶	119/412 (29%)	APG78902.1
	1,00 x 10 ⁻²⁵	114/482 (24%)	APG77911.1
	4,00 x 10 ⁻⁵²	163/548 (30%)	URG14712.1
	2,00 x 10 ⁻¹⁶⁹	430/1529 (28%)	URG14946.1
	5,00 x 10 ⁻⁵³	159/511 (31%)	QGL06818.1
	7,00 x 10 ⁻³²	120/379 (32%)	UQB76119.1
	1,00 x 10 ⁻⁴⁶	120/360 (33%)	UUW21031.1
	3,00 x 10 ⁻²¹	73/287 (25%)	APG76815.1
	0	300/693 (43%)	QRQ90169.1
	2,00 x 10 ⁻²¹	65/225 (29%)	QYF49936.1
	1,00 x 10 ⁻¹¹³	196/439 (45%)	CAH2951190.1
	5,00 x 10 ⁻⁸⁴	185/534 (35%)	DAZ87262.1
	2,00 x 10 ⁻⁸⁹	351/1282 (27%)	URG14712.1
	5,00 x 10 ⁻³⁰	89/348 (26%)	DAZ87741.1

← Priloga A: izbranih daljših virusnih sestavljenih zaporedij iz sveta Riboviria iz vzorcev slovenskih ledenikov
Appendix A: of selected longer viral contigs from the realm Riboviria from Slovenian glacier samples

↓ Priloga B: Virusne družine zaznane v vzorcih slovenskih ledenikov na podlagi analize sestavljenih zaporedij. Predstavljena so števila zaporedij klasificiranih v virusne družine iz sveta Riboviria. Identifikacijske oznake vzorcev so razložene v Preglednici 1.

Appendix B: Viral families detected in Slovenian glacier samples based on analysis of contig sequences. The numbers of contigs classified into viral families from the realm Riboviria are presented. Sample identification codes are explained in Table 1.

Virusne družine iz sveta Riboviria	T1	T2	T3	S1	S2	S3
Birnaviridae	1	0	0	0	0	0
Chrysoviridae	0	0	0	1	0	0
Totiviridae	1	0	0	1	1	1
Cystoviridae	0	1	0	0	0	0
Endornaviridae	0	2	1	3	1	2
Virgaviridae	1	0	2	0	0	0
Nodaviridae	0	1	0	0	1	0
Luteoviridae	0	0	0	0	1	0
Tombusviridae	0	1	2	0	0	0
Leviviridae	2	4	4	2	0	2
Narnaviridae	2	4	1	0	9	0
Mitoviridae	0	0	0	3	1	3
Botourmiaviridae	0	0	0	0	2	0
Chuviridae	0	1	0	0	0	0
Peribunyaviridae	0	0	0	0	0	1
Partitiviridae	2	0	3	4	5	1
*Picobirnaviridae	8	15	12	8	20	0
Dicistroviridae	1	1	0	0	0	0
Iflaviridae	0	0	0	0	0	1
Marnaviridae	0	0	0	0	1	0
Picornaviridae	2	2	0	0	0	0
Secoviridae	0	0	0	0	1	0
Barnaviridae	1	0	0	0	0	0
Solemoviridae	2	2	1	0	2	0
Astroviridae	0	2	1	0	0	0
Retroviridae	1	0	1	1	0	0

* napaka pri klasifikaciji

* classification error

LITERATURA
REFERENCES

- ADRIAENSSENS, E M, KRAMER, R, VAN GOETHEM, M W, MAKHALANYANE, T P, HOGG, I, & COWAN, D A 2017: *Environmental drivers of viral community composition in Antarctic soils identified by viromics*. Microbiome, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0301-7>
- ANESIO, A M, & LAYBOURN-PARRY, J 2012: *Glaciers and ice sheets as a biome*. Trends in Ecology and Evolution, 27(4), 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.09.012>
- BACNIK, K, KUTNJAK, D, PECMAN, A, MEHLE, N, TUSEK ZNIDARIC, M, GUTIERREZ AGUIRRE, I, & RAVNIKAR, M 2020: *Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment*. Water Research, 177, 115628. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115628>
- BANKEVICH, A, NURK, S, ANTIPOV, D, GUREVICH, A A, DVORKIN, M, KULIKOV, A S, LESIN, V M, NIKOLENKO, S I, PHAM, S, PRJIBELSKI, A D, PYSHKIN, A V, SIROTKIN, A V, VYAHHI, N, TESLER, G, ALEKSEYEV, M A, & PEVZNER, P A 2012: *SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. Journal of Computational Biology, 19(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- BELLAS, C M, & ANESIO, A M 2013: *High diversity and potential origins of T4-type bacteriophages on the surface of Arctic glaciers*. Extremophiles, 17(5), 861–870. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0569-x>
- BENN, D, & EVANS, D J A 2014: *Glaciers and Glaciation*, Second Edition, 1–802. <https://doi.org/10.4324/9780203785010>
- JARČIČ, M. 2021: *Osamitev in identifikacija psihrofilnih in psihrotolerantnih bakterij in gliv iz Triglavskega ledenika in ledenika pod Skuto*. Biotehniška fakulteta. Univerza v Ljubljani. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=78707>
- BUCHFINK, B., XIE, C., & HUSON, D. H. 2015: *Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND*. Nature Methods, 12(1). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3176>
- BURROWS, J. T. A., DEPIERREUX, D., NIBERT, M. L., & PEARSON, B. J. 2020: *A Novel Taxon of Monosegmented Double-Stranded RNA Viruses Endemic to Triclad Flatworms*. Journal of Virology, 94(22). <https://doi.org/10.1128/JVI.00623-20>
- CAPELLA-GUTIÉRREZ, S., SILLA-MARTÍNEZ, J. M., & GABALDÓN, T. 2009: *trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses*. Bioinformatics, 25(15), 1972–1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- CHARON, J., MARCELINO, V. R., WETHERBEE, R., VERBRUGGEN, H., & HOLMES, E. C. 2020: *Meta-transcriptomic detection of diverse and divergent RNA viruses in green and chlorarachniophyte algae*. Viruses, 1–54. <https://doi.org/10.3390/v12101180>
- CHEN, Y. M., SADIQ, S., TIAN, J. H., CHEN, X., LIN, X. D., SHEN, J. J., CHEN, H., HAO, Z. Y., WILLE, M., ZHOU, Z. C., WU, J., LI, F., WANG, H. W., YANG, W. D, XU, Q. Y., WANG, W., GAO, W. H., HOLMES, E. C., & ZHANG, Y. Z. 2022: *RNA viromes from terrestrial sites across China expand environmental viral diversity*. Nature Microbiology, 7(8), 1312–1323. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01180-2>
- CHIAPELLO, M., BOSCO, L., CIUFFO, M., OTTATI, S., SALEM, N., ROSA, C., TAVELLA, L., & TURINA, M. 2021: *Complexity and Local Specificity of the Virome Associated with Tospovirus-Transmitting Thrips Species*. Journal of Virology, 95(21), e00597-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00597-21>
- DAI, Z., WANG, H., WU, H., ZHANG, Q., JI, L., WANG, X., SHEN, Q., YANG, S., MA, X., SHAN, T., & ZHANG, W. 2023: *Parvovirus dark matter in the cloaca of wild birds*. GigaScience, 12, 1–10. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giad001>
- DE CÁRCER, D. A., LÓPEZ-BUENO, A., ALONSO-LOBO, J. M., QUESADA, A., & ALCAMÍ, A. (2016). Metagenomic analysis of lacustrine viral diversity along a latitudinal transect of the Antarctic Peninsula. FEMS Microbiology Ecology, 92(6), 1–10. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw074>
- DE CÁRCER, D. A., LÓPEZ-BUENO, A., PEARCE, D. A., & ALCAMÍ, A. 2015: *Biodiversity and distribution of polar freshwater DNA viruses*. Science Advances, 1(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400127>
- DEBEER, C. M., SHARP, M., & SCHUSTER-WALLACE, C. 2020: *Glaciers and Ice Sheets*. Encyclopedia of the World's Biomes: Volumes 1-5, 1-5, V4-182-V4-194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.12441-8>
- DUDA, R. L., & TESCHKE, C. M. 2019: *The amazing HK97 fold: versatile results of modest differences*. Current Opinion in Virology, 36, 9–16. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2019.02.001>
- EDWARDS, A., PACHEBAT, J. A., SWAIN, M., HEGARTY, M., HODSON, A. J., IRVINE-FYNN, T. D. L., RASSNER, S. M. E., & SATTLER, B. 2013: *A metagenomic snapshot of taxonomic and functional diversity in an alpine glacier cryoconite ecosystem*. Environmental Research Letters, 8(3). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/3/035003>

- FERNANDEZ-CASSI, X., TIMONEDA, N., MARTINEZ-PUCHOL, S., RUSINOL, M., RODRIGUEZ-MANZANO, J., FIGUEROLA, N., BOFILL-MAS, S., ABRIL, J. F., & GIRONES, R. 2018: *Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance*. Science of the Total Environment, 618(8), 870–880. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.249>
- GUTIÉRREZ-AGUIRRE, I., KUTNJAK, D., RAČKI, N., RUPAR, M., & RAVNIKAR, M. 2018: *Monolith Chromatography as Sample Preparation Step in Virome Studies of Water Samples*. In V. PANTALEO & M. CHIUMENTI (Eds.), *Viral metagenomics : methods and protocols, (Methods in molecular biology)* (pp. 63–75). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7683-6_6
- HILLMAN, B. I., & CAI, G. 2013: *The Family Narnaviridae. Simplest of RNA Viruses*. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 86). Copyright © 2013, Elsevier Inc. All Rights Reserved. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394315-6.00006-4>
- HODSON, A., ANESIO, A. M., TRANTER, M., FOUNTAIN, A., OSBORN, M., PRISCU, J., LAYBOURN-PARRY, J., & SATTLER, B. 2008: GLACIAL ECOSYSTEMS. *Ecological Monographs*, 78(1), 41–67. <https://doi.org/10.1890/07-0187.1>
- HUSON, D. H., BEIER, S., FLADE, I., GÓRSKA, A., & EL-HADIDI, M. 2016: *MEGAN Community edition - Interactive exploration and analysis of larges-scale microbiome sequencing data*. Plos Computational Biology, 12(6), 1–12. <https://doi.org/DOI:10.1371/journal.pcbi.1004957>
- KATOH, K., & STANDLEY, D. M. 2013: *MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability*. Molecular Biology and Evolution, 30(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- KAZLAUSKAS, D., KOONIN, E. V., & KRUPOVIC, M. 2019: *Multiple origins of prokaryotic and eukaryotic single-stranded DNA viruses from bacterial and archaeal plasmids*. Nature Communications, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11433-0>
- KING, A. M. Q., ADAMS, M. J., CARSTENS, E. B., & LEFKOWITZ, E. J. 2011: *Virus taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier. <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780123846846/virus-taxonomy>
- KRUPOVIC, M., PRANGISHVILI, D., HENDRIX, R. W., & BAMFORD, D. H. 2011: *Genomics of Bacterial and Archaeal Viruses: Dynamics within the Prokaryotic Virosphere*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 75(4), 610–635. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00011-11>
- KUHN, J. H., GORBALENYA, A., KRUPOVIC, M., SIDELL, S., & VARSANI, A. 2017: *Establishing a single taxon that comprises RNA viruses at the basal rank of virus taxonomy*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34193.94562>
- LAMBRECHT, A., & KUHN, M. 2007: *Glacier changes in the Austrian Alps during the last three decades, derived from the new Austrian glacier inventory*. Annals of Glaciology, 46, 177–184. <https://doi.org/10.3189/172756407782871341>
- LEFKOWITZ, E. J., DEMPSEY, D. M., HENDRICKSON, R. C., ORTON, R. J., SIDDELL, S. G., & SMITH, D. B. 2018: *Virus taxonomy : the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Nucleic Acids Research, 46, 708–717. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- LETUNIC, I., & BORK, P. 2021: *Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation*. Nucleic Acids Research, 49(W1), W293–W296. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB301>
- LIU, Y., JIAO, N., XU ZHONG, K., ZANG, L., ZHANG, R., XIAO, X., SHI, Y., ZHANG, Z., TAO, Y., BAI, L., GAO, B., YANG, Y., HUANG, X., JI, M., LIU, J., LIU, P., & YAO, T. 2023: *Diversity and function of mountain and polar supraglacial DNA viruses*. Science Bulletin, 68(20), 2418–2433. <https://doi.org/10.1016/J.SCIB.2023.09.007>
- LIU, Y., ZHANG, Z., JIAO, N., ZHU, Y., ZHANG, R., DOMINGUEZ-HUERTA, G., WANG, H., FENG, M., WEN, R., JI, M., ZHENG, Q., LIU, P., & YAO, T. 2024: *Diversity and ecological roles of RNA viral communities in the cryosphere of the Tibetan Plateau*. BioRxiv, 2024.08.30.610425. <https://doi.org/10.1101/2024.08.30.610425>
- LÓPEZ-BUENO, A., RASTROJO, A., PEIRÓ, R., ARENAS, M., & ALCAMÍ, A. 2015: *Ecological connectivity shapes quasispecies structure of RNA viruses in an Antarctic lake*. Molecular Ecology, 24(19), 4812–4825. <https://doi.org/10.1111/MEC.13321>
- LÓPEZ-BUENO, A., TAMAMES, J., VELÁZQUEZ, D., MOYA, A., QUESADA, A., & ALCAMÍ, A. 2009: *High diversity of the viral community from an Antarctic lake*. Science, 326(5954), 858–861. <https://doi.org/10.1126/science.1179287>
- LU, J., YANG, S., ZHANG, X., TANG, X., ZHANG, J., WANG, X., WANG, H., SHEN, Q., & ZHANG, W. 2022: *Metagenomic analysis of viral community in the Yangtze River expands known eukaryotic and prokaryotic virus diversity in freshwater*. Virologica Sinica, 37(1), 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.01.003>
- NGUYEN, L. T., SCHMIDT, H. A., VON HAESELER, A., & MINH, B. Q. 2015: *IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies*. Molecular Biology and Evolution, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

- OTTATI, S., CHIAPELLO, M., GALETTO, L., BOSCO, D., MARZACHÌ, C., & ABBÀ, S. 2020: *New viral sequences identified in the flavescence dorée phytoplasma vector scaphoideus titanus*. *Viruses*, 12(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/v12030287>
- PAVŠEK., M. 2007: *Vpogled v Ledenik pod Skuto kot pokazatelj podnebnih sprememb v slovenskem delu Alp*. Dela 28, 207–219)
- PRADO, T., BRANDÃO, M. L., FUMIAN, T. M., FREITAS, L., CHAME, M., LEOMIL, L., MAGALHÃES, M. G. P., DEGRAVE, W. M. S., LEITE, J. P. G., & MIAGOSTOVICH, M. P. 2022: *Virome analysis in lakes of the South Shetland Islands, Antarctica*. *Science of the Total Environment*, 852(March), 158537. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158537>
- RAPER, S. C. B., & BRAITHWAITE, R. J. 2009: *Glacier volume response time and its links to climate and topography based on a conceptual model of glacier hypsometry*. *Cryosphere*, 3(2), 183–194. <https://doi.org/10.5194/TC-3-183-2009>
- RASSNER, S. M. E. 2017: Viruses in Glacial Environments. *Psychrophiles: From Biodiversity to Biotechnology: Second Edition*, 111–131. https://doi.org/10.1007/978-3-319-57057-0_6
- RASTROJO, A., & ALCAMÍ, A. 2017: *Aquatic viral metagenomics: Lights and shadows*. *Virus Research*, 239, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.021>
- ROSE, R., CONSTANTINIDES, B., TAPINOS, A., ROBERTSON, D. L., & PROSPERI, M. 2016: *Challenges in the analysis of viral metagenomes*. *Virus Evolution*, 2(2), 1–11. <https://doi.org/10.1093/ve/vew022>
- SANDLUND, L., MOR, S. K., SINGH, V. K., PADHI, S. K., PHELPS, N. B. D., NYLUND, S., & MIKALSEN, A. B. 2021: *Comparative molecular characterization of novel and known piscine toti-like viruses*. *Viruses*, 13(6), 1–20. <https://doi.org/10.3390/v13061063>
- SHI, M., LIN, X. D., TIAN, J. H., CHEN, L. J., CHEN, X., LI, C. X., QIN, X. C., LI, J., CAO, J. P., EDEN, J. S., BUCHMANN, J., WANG, W., XU, J., HOLMES, E. C., & ZHANG, Y. Z. 2016: *Redefining the invertebrate RNA virosphere*. *Nature*, 540(7634), 539–543. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
- SPEAR, A., SISTERTON, M. S., YOKOMI, R., & STENGER, D. C. 2010: *Plant-feeding insects harbor double-stranded RNA viruses encoding a novel proline-alanine rich protein and a polymerase distantly related to that of fungal viruses*. *Virology*, 404(2), 304–311. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.015>
- TAMURA, K., STECHER, G., & KUMAR, S. 2021: MEGA11: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAB120>
- VAINIO, E. J., CHIBA, S., GHABRIAL, S. A., MAISS, E., ROOSSINCK, M., SABANADZOVIC, S., SUZUKI, N., XIE, J., & NIBERT, M. 2018: ICTV virus taxonomy profile: Partitiviridae. *Journal of General Virology*, 99(1), 17–18. <https://doi.org/10.1099/JGV.0.000985/CITE/REFWORKS>
- WANG, D., URISMAN, A., LIU, Y., SPRINGER, M., KSIAZEK, T. G., ERDMAN, D. D., MARDIS, E. R., HICKENBOTHAM, M., MAGRINI, V., ELDRED, J., LATREILLE, J. P., WILSON, R. K., GANEM, D., & DERISI, J. L. 2003: *Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays*. *PLoS Biology*, 1(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0000002>
- WOO, A. C., GAIA, M., GUGLIELMINI, J., DA CUNHA, V., & FORTERRE, P. 2021: *Phylogeny of the Varidnaviria Morphogenesis Module: Congruence and Incongruence With the Tree of Life and Viral Taxonomy*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 704052. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.704052/BIBTEX>
- ZELL, R., GROTH, M., SELINKA, L., & SELINKA, H. C. 2022: *Picornavirus-like viruses of the Havel river, Germany*. *Frontiers in Microbiology*, 13(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.865287>
- ZHAI, Y., ATTOUL, H., JAAFAR, F. M., WANG, H. Q., CAO, Y. X., FAN, S. P., SUN, Y. X., LIU, L. D., MERTENS, P. P. C., MENG, W. S., WANG, D., & LIANG, G. 2010: *Isolation and full-length sequence analysis of Armigeres subalbatus totivirus, the first totivirus isolate from mosquitoes representing a proposed novel genus (Artivirus) of the family Totiviridae*. *Journal of General Virology*, 91(11), 2836–2845. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.024794-0/CITE/REFWORKS>
- ZHAO, M., XU, L., BOWERS, H., & SCHOTT, E. J. 2022: *Characterization of Two Novel Toti-Like Viruses Co-infecting the Atlantic Blue Crab, Callinectes sapidus, in Its Northern Range of the United States*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 855750. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.855750/BIBTEX>