

Prijenos viroida i biljnih virusa vodom

Žagar, Mirta

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:961006>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-12-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

PRIJENOS VIROIDA I BILJNIH VIRUSA VODOM

TRANSMISSION OF VIROIDS AND PLANT VIRUSES BY
WATER

SEMINARSKI RAD

Mirta Žagar

Preddiplomski studij molekularne biologije

Mentorica: prof. dr. sc. Dijana Škorić

Zavod za mikrobiologiju

Zagreb, 2021.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2.1. STARE METODE	2
2.1.1. BILJNI VIRUSI U VODAMA ENGLJSKE	3
2.1.2. BILJNI VIRUSI U VODAMA NJEMAČKE I MAĐARSKE	4
2.1.3. BILJNI VIRUSI HRVATSKIH EKOSUSTAVA	6
2.2. NOVE METODE	7
2.3. METODE DANAS	8
3. BILJNI VIRUSI U TLU	10
5. BILJNI VIRUSI U POLJOPRIVREDI	13
6. ZAKLJUČAK	15
7. LITERATURA	15
8. SAŽETAK	17
9. SUMMARY	18

1. UVOD

Biljni virusi se, kao i svi ostali virusi, moraju prenijeti s jednog domaćina na drugog kako bi opstali budući da su obligatni paraziti. Stoga oni imaju širok spektar načina prenošenja. Jedan od načina je putem letećih insekata i grinja kao vektora. Osim toga, biljni virusi prelaze s biljke na biljku kroz tlo, preko gljivičnih pokretnih zoospora i nematoda. Biljni virusi mogu se prenositi i samim dodiranjem zaraženih biljaka s onim zdravima, pri čemu dolazi do mehaničkih oštećenja koja olakšavaju ulazak virusa u stanicu (Jones, 2018). Takav način prenošenja može se odnositi na nadzemne, ali i na podzemne dijelove biljaka. Međutim, zadnjih godina posebno se daje na značaju biljnim virusima koji se prenose vodom. Prije toga znanstvenici su se više posvećivali istraživanju virusa koji se pojavljuju u vodama, a mogu biti patogeni za čovjeka. Ljudski patogeni virusi tražili su se aktivno u moru, rijekama, jezerima, izvorskoj i pitkoj vodi te u bazenima (Sevik, 2011).

Razlog zašto je pojavnost biljnih virusa u vodama bila toliko zanemarivana leži u činjenici da biljni virusi, za razliku od ljudskih, ne utječu direktno na zdravlje ljudi (Koenig, 1986). Međutim, prije 40 godina znanstvenici su otkrili mnoštvo biljnih virusa u kopnenim vodama (Tomlinson i sur., 1983; Tomlinson i Faithfull, 1984; Koenig i Lesemann, 1985; Piazzola i sur., 1986) te koliko je njihova prisutnost bitna za ljude. Osim toga, biljne je viruse bilo teško detektirati prije pojave visokoprotocnog sekvenciranja (HTS, *high throughput sequencing*), što je obeshrabrivalo znanstvenike u njihovim istraživanjima.

Prisutnost biljnih virusa u okolišnim vodama bitna je jer oni mogu doći u dodir s poljoprivrednim površinama te se tamo rasprostraniti među usjevima (Sevik, 2011). Biljke upijaju vodu kroz korijen u zemlji, a ako su u vodi virusi, infekcija se može proširiti na cijelu biljku, a onda i na ostatak usjeva (Koenig, 1986). To može dovesti do velikih ekonomskih gubitaka. Stoga je bitno obratiti pozornost na čistoću vode koja se koristi za navodnjavanje površina, a posebno one vode koja se koristi u hidroponskim sustavima (Sevik, 2011).

2. METODE DETEKCIJE BILJNIH VIRUSA U VODI

Značaj prijenosa biljnih virusa vodom spoznao se tek 80-ih godina prošloga stoljeća kada počinju prva istraživanja. Nedostatak tehnologije otežavao je znanstvenicima detekciju biljnih virusa koje su uspjeli izolirati iz sakupljenih uzoraka. Međutim, pojavom novih tehnologija, a posebice HTS-a, ubrzao se postupak kojim se različiti biljni virusi detektiraju u vodenim uzorcima. U ovom poglavlju opisane su metode kojima su se znanstvenici koristili nekada i danas.

Princip je ostao isti, prvo uzorak vode treba koncentrirati, a zatim iz njega detektirati viruse. Metode koncentracije virusa trebaju biti isplative, brze, jednostavne za primjenu, uspješne za svaki tip virusa te se njima trebaju ukloniti sve vrste inhibitora koji bi mogli utjecati na kasnije metode (Mehle i sur., 2018). Mehle i suradnici (2018) tvrde da ne postoje potpuno učinkovite metode koncentracije virusa referirajući se na ranija istraživanja, međutim moguće je postići dobre rezultate na nekoliko načina koji će biti opisani dalje u tekstu.

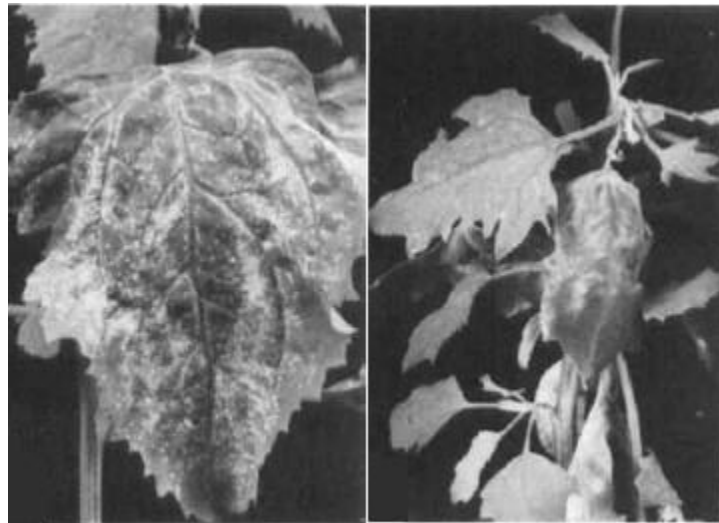
2.1. STARE METODE

Osamdesetih godina prošloga stoljeća znanstvenici širom svijeta otkrili su način kako izolirati biljne viruse iz rijeka i jezera. Kako bi se odredilo koji točno biljni virusi postoje u sakupljenim uzorcima vode, potrebno ih je prvo koncentrirati budući da je njihova koncentracija u vodi relativno mala. Koncentriranje se vrši raznim metodama. Na primjer, istraživači iz Engleske (Tomlinson i sur., 1983; Tomlinson i Faithful, 1984) prvo su filtrirali velike volumene vode (60 L) kako bi je pročistili, a zatim je koncentrirali ultracentrifugiranjem. Oni iz Mađarske, Hrvatske i Njemačke (Koenig i Lesemann, 1985; Koenig i suradnici, 1989; Juretić i sur., 1986; Horvath i sur., 1986) centrifugirali su puno manje uzorke vode bez prethodne filtracije. Moguće je primijeniti i ultrafiltraciju za velike volumene vode (50 L), kako su napravili njemački istraživači osamdesetih godina dvadesetog stoljeća (Mehle i Ravnkar, 2012). Postoje i koncentratori za viruse (Tomlinson i sur., 1983; Tomlinson i Faithful, 1984). Osim toga, postoji i metoda koncentriranja virusa taloženjem polietilen glikolom (PEG). Uz to, PEG služi i za izolaciju virusa sa sedimenata nakon niskookretajnog centrifugiranja (Piazzola i sur., 1986; Pleše i sur., 1996).

Nakon koncentriranja virusa moguće je mehanički inokulirati listove određenih biljaka posutih s karborundumom, najčešće kvinoje (*Chenopodium quinoa*). Osim kvinoje, kao pokusne biljke za

biotest koriste se i *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Nicotiana glutinosa* i *Nicotiana clevelandii* (Koenig, 1986). Ponekad se već nakon inokulacije određenih biljaka, tj. pojave simptoma na određenim biljkama, što pokazuje krug domaćina virusa i njegove biološke značajke, može zaključiti koji su virusi prisutni u uzorcima.

Na temelju reakcija koje nastanu na pokusnim biljkama (Slika 1.), nastanka i tipa virusnih kristala u stanicama inokuliranih biljaka, elektronsko mikroskopskih i imunoelektronsko mikroskopskih istraživanja ili seroloških pokusa koji slijede, zaključuje se koji su virusi bili prisutni u sakupljenim uzorcima.



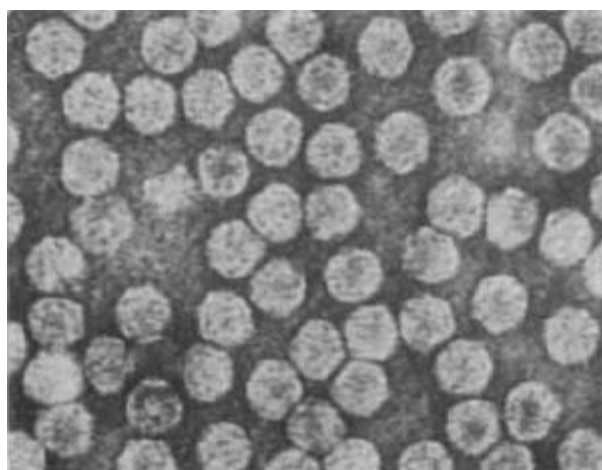
Slika 1. Lokalne lezije prouzročene virusom grmolike kržljavosti rajčice (TBSV, Tomato bushy stunt virus) na *Chenopodium amaranticolor* (lijevo) i sistemična infekcija na *Ch. quinoa* (desno). Preuzeto iz Tomlinson i Faithful, 1984.

2.1.1. BILJNI VIRUSI U VODAMA ENGLJSKE

Tomlinson i suradnici (1983) te Tomlinson i Faithful (1984) radili su s velikim volumenima vode kako bi istražili neke biljne viruse u engleskim rijekama. Uzorci volumena 60 L prvo su bili koncentrirani koncentратором за viruse, a zatim su pročišćeni filtracijom. Takva, prefiltrirana voda, filtrirana je kroz Zeta-Plus pozitivno nabijene filtere. Na filterima su zaostali virusi koji su eluirani goveđim ekstraktom. Konačni koncentrat dobio se nakon što su se zaostali virusi dodatno ultrafiltrirali. Pet mL tako dobivenog koncentrata razrijedio se destiliranom vodom te se

centrifugirao 90 minuta pri centrifugalnoj sili od 65 000 g. Talozi su otopljeni u fosfatnom puferu prije inokulacije listova kvinoje. Nakon infekcije pokusnih biljaka, imunoelektronskom mikroskopijom potvrdila se prisutnost nekih virusa.

U rijeci Avon ovim je metodama potvrđena prisutnost TNV-a (*Tobacco necrosis virus*) (Tomlinson i sur., 1983; Slika 2.). TNV je uz virus grmolike kržljivosti rajčice (TBSV, *Tomato bushy stunt virus*) također izoliran iz rijeka Cam i Temze te iz jezera Esthwaite. Istim metodama sljedeće je godine izoliran TBSV iz Temze blizu Oxforda (Tomlinson i Faithfull, 1984; Slika 1.).



Slika 2. Elektronsko mikroskopska snimka čestica virusa nekroze duhana (TNV, *Tobacco necrosis virus*). Preuzeto iz Tomlinson i sur., 1983.

2.1.2. BILJNI VIRUSI U VODAMA NJEMAČKE I MAĐARSKE

U Njemačkoj i Mađarskoj istraživači su se koristili sličnim metodama detekcije kao i autori iz Engleske, razlika je jedino u tome što su koristili manje volumene za ultracentrifugiranje.

Koenig i Lesemann (1985) bavili su se detekcijom biljnih virusa u njemačkim rijekama i jezerima dok su Koenig i suradnici (1989) proučavali viruse iz uzoraka uzetih iz jaraka i kanala zapadne Njemačke, iz regije poznate kao Falačko Porajnje i mjestu uzgoja vinove loze. Iste metode detekcije korištene su u oba istraživanja. Sakupljeni uzorci volumena 200 do 300 mL ultracentrifugirani su 2 sata pri centrifugalnoj sili od 100 000 g. Talog je resuspendiran u puferu te utrljan na listove biljaka *Ch. quinoa* i *N. clevelandii* zajedno s karborundumom. Nastale

pojedinačne lezije izolirane su te homogenizirane u puferu, a homogenat se utrljao na nove pokusne biljke. Uzorci zaraženih listova obradili su se na specifičan način kako bi se mogli promatrati elektronskim mikroskopom. Također, istraživala su se i serološka svojstva, testom precipitacije na predmetnom stakalcu za anizometrične, te dvostrukom radijalnom imunodifuzijom (DRID, *double radial immunodiffusion*) za izometrične virusne čestice. Antiserum za DRID dobio se iz krvnog seruma kunića nakon njihova imuniziranja pročišćenim biljnim virusima. Potvrdila se velika količina već od prije poznatih biljnih patogena, kao što su soj TBSV-a BS3 i virus mozaika duhana (TMV, *Tobacco mosaic virus*; Slika 3.), ali i neki nepoznati tobamovirusi koji su proglašeni „novima“. Otkriven je tada novi poteksvirus u rijeci Sieg te je nazvan *Potexvirus Sieg*, a novi virus u rijeci Neckar nazvan je *Tombusvirus Neckar*.

U Mađarskoj su se dva istraživanja provela iste godine. Jedno (Juretić i sur., 1986) se bavi učestalošću tobamovirusa nalik na virus mozaika trputca (RiMV, *Ribgrass mosaic virus*) u rijeci Zali, dok drugo (Horvath i sur., 1986) istražuje prisutnost TMV-a u dijelu Dunava koji prolazi kroz Mađarsku.

Juretić i suradnici (1986) koristili su slične metode kao i Koenig i Lesemann (1985). Uzorke vode su ultracentrifugirali, a taloge resuspendirali u nekoliko kapi vode te njima inokulirali biljke *Ch. murale* i *Ch. quinoa*. Od zaraženih listova dobiven je homogenat kojim su se inokulirale ostale pokusne biljke. Virus su stvorili inkluzije koje su se mogle promatrati u živim biljnim stanicama pod svjetlosnim mikroskopom. Nakon što su na taj način u uzorcima listova *N. megalosiphon* i *N. tabacum* uočene kristalne inkluzije u obliku zaobljenih diskova, zaključeno je da virusi u homogenatu pripadaju tobamovirusima kao što je RiMV, iako je metodom DRID jača precipitacijska linija bila vidljiva uspoređujući uzorak s TMV-om.

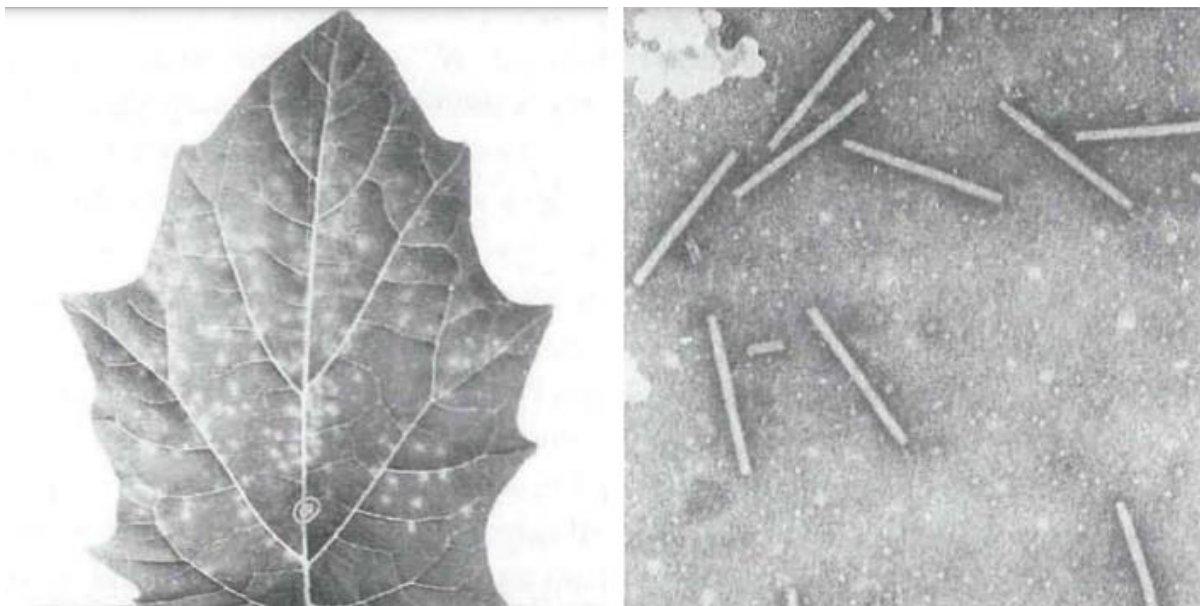
Horvath i suradnici (1986) su uzorke vode iz rijeke Dunav centrifugirali dva puta. Prvi put 90 minuta pri sili od 90 000 g, a zatim se talog centrifugirao otopljen u nekoliko kapi vode 15 minuta na 3 000 g. Supernatantom su se inokulirale *Ch. quinoa* i *N. megalosiphon*. Te su biljke bile izvor inokuluma za daljnje inokulacije. U ovom su se istraživanju autori također koristili svjetlosnim mikroskopom za proučavanje inkluzija te metodom DRID kako bi potvrdili prisutnost TMV-a. Sve pokusne biljke zaražene dobivenim inokulumom pokazivale su simptome tipične za TMV, kao što su nekrotične i klorotične lokalne lezije te sistemski mozak (Slika 3.). Promatranjem pripravaka pročišćenih virusa pod elektronskim mikroskopom uočene su čestice u obliku rigidnih

štapića koji odgovaraju morfologiji TMV-a (Slika 3.). Također, u stanicama biljaka iz biotesta pod svjetlosnim mikroskopom uočene su inkluzije oblika heksagonske prizme tipične za TMV.

2.1.3. BILJNI VIRUSI HRVATSKIH EKOSUSTAVA

Na našim prostorima prvi koji su provodili istraživanja na virusima šumskih površinskih voda bili su Pleše i suradnici (1996). Uzorci vode sakupljeni su iz šumskih potoka Medvednice, potoka u području Vukomeričkih Gorica te iz odvodnih kanala na području Turopolja. Istraživači su se koristili istim metodama koncentracije i detekcije kao i kolege iz Njemačke i Mađarske. Uzorci volumena 250 mL koncentrirani su ultracentrifugiranjem, a zatim su inokulirane pokusne biljke.

Rezultati su potvrdili prisutnost dva tobamovirusa u svim uzorcima: TMV i ToMV. TMV je bio izoliran iz uzoraka čak i nakon niskookretajnog, bez prethodnog visookretajnog centrifugiranja, što je navelo autore na zaključak da tobamovirusa u hrvatskim šumskim površinskim vodama ima u vrlo visokim koncentracijama (Slika 3.).



Slika 3. Nekrotične i klorotične lezije prouzročene virusom mozaika duhana (TMV, *Tobacco mosaic virus*) na listu biljke *Datura stramonium* (lijevo) i elektronsko mikroskopska snimka čestica TMV-a (desno). Preuzeto iz Pleše i sur., 1996.

2.2. NOVE METODE

Što se tiče koncentriranja virusa, gore navedene „stare“ metode nisu praktične te zahtijevaju previše vremena. Također, korištenje malih volumena uzoraka vode može dovesti do krivih zaključaka te nereprezentativnih rezultata (Mehle i Ravnikar, 2012). Kako navode Mehle i Ravnikar (2012), slovenski istraživači i njihovi suradnici osmislili su novu metodu koncentriranja ljudskih virusa, i prvi je iskoristili kako bi koncentrirali biljni virus ToMV. Metoda se temelji na primjeni kolone s monolitnim nosačem pod nazivom *Convective Interaction Media* (CIM). Tom se metodom virusne čestice vežu za CIM-monolit, a zatim se ispiru puferom s visokom koncentracijom soli.

Kako bi se dobili što vjerodostojniji rezultati, preporučuje se korištenje najmanje dviju metoda za detekciju virusa nakon njihovog koncentriranja. Elektronska i imunoelektronska mikroskopija još su uvijek prihvatljive metode vizualizacije virusa, kao i serološke metode kojima se detektira protein virusne kapside (imunodifuzija, imunoprecipitacija i *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)). Imunodifuzija i imunoprecipitacija koriste se za indirektnu detekciju virusa izoliranih iz pokusnih biljaka (Tomlinson i sur., 1983; Tomlinson i Faithful, 1984; Koenig i Lesemann, 1985; Koenig i sur., 1989), a ELISA za direktnu detekciju virusa iz koncentriranih uzoraka vode (Mehle i Ravnikar, 2012).

Osim detekcije proteinske kapside moguće je i detektirati virusne nukleinske kiseline što postaje sve popularnije razvojem molekularnih tehnika. Testovi *Northern blot* i *dot* testovi koristili su se još od 1988. godine nakon izoliranja virusa s pokusnih biljaka (Mehle i Ravnikar, 2012). Međutim, sve su se više počele razvijati tehnike kao što su lančana reakcija polimeraze (PCR, *polymerase chain reaction*), reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR, *reverse transcription PCR*) i PCR ili RT-PCR u realnom vremenu (RT-qPCR tj. *real-time RT-PCR*) kojima je moguće umnožavati nukleinsku kiselinu te pratiti njeno umnažanje tj. količinu u stvarnom vremenu. Osim toga, RT-qPCR je tehnika koja oduzima puno manje vremena za provedbu od konvencionalnih PCR-tehnika budući da ne zahtijeva dodatnu elektroforezu na agaroznom gelu (Mehle i sur., 2018). RT-qPCR primijenjen je u kvantifikaciji PMMoV (*Pepper mild mottle virus*) iz koncentriranih uzoraka morske i riječne vode (Mehle i sur., 2018). RT-qPCR upotrijebljen je i za detekciju virusa mozaika pepina (PepMV, *Pepino mosaic virus*), Y-virusa krumpira (PVY, *Potato virus Y*) i viroida vretenastog gomolja krumpira (PSTVd, *Potato spindle*

tuber viroid) u hranjivoj otopini hidroponskih sustava u radu Mehle i suradnika (2014). PCR-metode puno su osjetljivije i preciznije od ELISA-e (Mehle i Ravnkar, 2012).

Gore navedene molekularne metode pogodnije su za detekciju jednog ili nekoliko virusa u isto vrijeme. Međutim, ako je potrebno detektirati milijune virusa, odnosno mnoštvo virusnih vrsta odjednom, koriste se mikročipovi (engl. *microarrays*). Osim mikročipova, biljni virusi se, među ostalim mikroorganizmima, sve više detektiraju korištenjem metagenomskih metoda pri čemu se koriste tehnike HTS-a. U kombinaciji s bioinformatikom, detekcija ne samo biljnih, već i animalnih virusa, virusa arheja, različitih planktonskih organizama ili bakterija iz vodenih uzoraka postaje sve raširenija i pristupačnija.

2.3. METODE DANAS

Nakon što se početkom 21. stoljeća shvatilo koliko su zapravo virusi zastupljeni u morskim vodama, započinje masovno korištenje HTS-tehnika koje se sve više razvijaju. Danas su HTS-metode potpuno prihvaćene metode za detekciju virusa. Ove metode omogućile su da se milijuni sekvenci nukleinskih kiselina izoliraju, sekvenciraju i pohrane u neku od genskih knjižnica. U tome veliku ulogu igra sekvenciranje „*shotgun*“, koje omogućuje da se kompletna DNA iz uzoraka nasumično pocijepa, a zatim sekvencira (Mehle i sur., 2018; www.yourgenome.org). Problem kod primjene ovih metoda u detekciji virusa općenito je činjenica da se u sakupljenom uzorku vode ne nalaze samo virusne nukleinske kiseline, već i ostale DNA koje potječu od drugih mikroorganizama, na primjer vrlo brojnih bakterija. Stoga se prije korištenja HTS-a uzorak treba obogatiti virusima nekim od prethodno opisanih načina koncentracije virusa ili amplifikacijom virusnih nukleinskih kiselina (Mehle i sur., 2018; Slika 4.).

Bačnik i suradnici (2020) proučavali su prisutnost biljnih virusa u vodi koja ulazi i izlazi iz postrojenja za obradu otpadnih voda. Pri tome su kombinirali CIM za koncentriranje virusa, „*shotgun*“-metagenomiku za njihovu detekciju te biološke testove infektivnosti. Autori smatraju da kombinacija ove brze i učinkovite metode koncentracije i metagenomike omogućuje proučavanje populacija biljnih virusa koji se nalaze u otpadnim vodama te smatraju kako postoji mogućnost da se ovom metodom otkriju novi patogeni virusi. Među ostalim metodama koristio se i RT-qPCR kojim se procjenjivala učinkovitost kromatografskih metoda koncentriranja virusa.

Metagenomske analize su u istraživanju Bačnik i suradnika (2020) uključivale prvo izolaciju nukleinskih kiselina, kvantifikaciju Nanodrop-spektrofotometrom i sekvenciranje RNA pri čemu se koristio uređaj Illumina MiSeq. Koristeći program DIAMOND, uspoređivale su se dobivene sekvence s kompletnom bazom podataka NCBI. Za taksonomsku klasifikaciju koristio se program MEGAN (*Metagenome Analyzer*).

Iako su opisane „nove“ metode općeprihvaćene metode za detekciju virusa u uzorcima vode, one „stare“ nisu pale u zaborav. Bačnik i suradnici (2020) su sve uzorke otpadnih voda podvrgnuli elektronskoj mikroskopiji. Osim toga, inokulirali su odabrane biljke nasumičnim uzorcima otpadnih voda pa su i one listove koji su razvile određene simptome iskoristili za pripremu uzoraka koje su promatrali pod elektronskim mikroskopom. Ovo pokazuje kako metode kojima su se koristili znanstvenici u prvim istraživanjima biljnih virusa u vodenim okruženjima nisu danas zaboravljene ni beskorisne, već se koriste kao komplementarne, odnosno kao dodatan korak provjere rezultata.



Slika 4. Prikaz slijeda korištenja današnjih metoda u istraživanju virusa u vodenim uzorcima. Prilagođeno iz Mehle i sur., 2018.

Sekvenciranjem nukleinskih kiselina izoliranih iz uzoraka vode, stvara se sve veća baza podataka koja omogućuje sve bržu i jednostavniju detekciju virusa. To bi moglo biti iznimno korisno u budućim istraživanjima budući da svaka biljna vrsta ili porodica ima svoj vlastiti virom (Rivarez i sur., 2021). Upotrebom HTS-tehnika moguće će biti i povezivanje viroma usjeva s viromima insekata koji su vektori te s viromima samoniklih biljaka. Moguće će biti i povezivanje različitih viroma s različitim geografskim područjima što bi olakšalo dijagnozu biljnih bolesti izazvanih virusima te sprječavanje potencijalnih epidemija među usjevima. Na taj način spriječili bi se veliki ekonomski gubici.

3. BILJNI VIRUSI U TLU

Smatra se da se animalni i ljudski virusi ne nalaze slobodni u vodi, već se najčešće nalaze u agregatima ili adsorbirani na čvrste materijale kao što su glina, silikati, organske čestice, bakterije ili alge (Koenig, 1986). To je dokazano i za neke biljne viruse. Istraživanje adsorpcije biljnih virusa na čestice tla je korisno budući da se biljke apsorbacijom vode iz tla mogu zaraziti virusima koji se u njemu nalaze.

Tomlinson i Faithful (1984) istraživali su povezanost tla s biljnim virusima. Oni su htjeli provjeriti zadržavaju li se biljni virusi, specifično TBSV u vodi koja se procijedi kroz tlo u kojem su rasle zaražene biljke. U tu svrhu su inokulirali listove mlade kvinoje (*Ch. quinoa*) s TBSV-om. Nakon pojave lezija, listovi su se odstranili, a neinokulirani listovi počeli su razvijati simptome 20 dana nakon inokulacije prvih listova. Tada su posude u kojima su rasle biljke stavljene u stakleni lijevak obložen filter-papirom, a destilirana voda se cijedila kroz tlo. Sakupljeni filtrat se centrifugirao, a dobiveni su se talozi resuspendirali u fosfatnom puferu. Takva otopina koristila se za inokulaciju novih listova kvinoje koji su razvili lokalne lezije karakteristične za TBSV. Ovim pokusom je pokazano da se virus može „isprati“ iz tla koje sadrži sistemsko inficirane biljke. Također, rajčice zalijevane vodom koja sadrži TBSV inficirale su se virusom. Ti rezultati upućuju na to da za prijenos mnogih biljnih virusa vodom nisu potrebni vektori kao što je gljivični obligatni parazit *Ospidium brassicae* kao što se do tada mislilo. Vjerojatno virusi prolaze kroz korijenje inficirane biljke, ulaze u tlo te se ispiru vodom, a onda ulaze u neinficirane biljke preko korijenja koje se vjerojatno ošteti samim rastom ili nematodama.

Piazzola i suradnici su u svom radu (1986) pokušali pokazati utjecaj korištenja talijanskih riječnih voda za navodnjavanje usjeva na razvoj bolesti. Oni su podvrgnuli uzorke niskookretajnom centrifugiranju. Na taj način izbjegli su koncentriranje neželjenih ljudskih patogena sa željenim biljnim virusima. Talog koji su dobili utrljali su u listove kvinoje. Daljnjim metodama potvrđeno je da su nađeni virusi bili TMV i virus mozaika krastavca (CMV, *Cucumber mosaic virus*). To je bilo zanimljivo otkriće budući da se smatralo da CMV zbog svoje nestabilnosti ne može opstati na vrlo nabijenim česticama tla. Ta činjenica objašnjena je pretpostavkom da čestice tla i virus djeluju jedno na drugo interakcijama koje štite viruse od destabilizacije i omogućuju im da ostanu u infektivnom obliku. To bi značilo da bi se epidemija mogla vrlo brzo proširiti ako se kao vektor koristi voda, čestice tla kao stabilizatori te virus kao izvor infekcije.

S druge strane, Juretić i Horvath (1991) su nešto kasnije pokušali istražiti stupanj adsorpcije dva virusa, TMV-a i virusa žutog mozaika postrne repe (TYMV, *Turnip yellow mosaic virus*), na dvije vrste tla, humus i pješčano tlo. Ti virusi u tlo dospijevaju iz zaraženih biljaka te se adsorbiraju na čestice tla. Nakon što su dobili dva različita biljna pripravka bogata TMV-om, odnosno TYMV-om, pokus su proveli na dva različita načina. U prvom slučaju se pripravak provlačio kroz kolonu ispunjenom vlažnim tlom dok se u drugom slučaju biljni infektivni sok homogenizirao sa steriliziranom zemljom, a zatim miješao 8 sati. Iz prvog se slučaja eluat iz kolone koristio kako bi se inokulirale biljke, a u drugom slučaju se nakon miješanja provelo niskookretajno centrifugiranje, a supernatant se koristio za infekciju pokusnih biljaka. Zaključilo se da oba tipa tla, i humus i pješčano, adsorbiraju viruse u vrlo visokim postotcima: TMV 95%, a TYMV skoro pa 100%. Ove vrste tala sadrže vrlo nabijene čestice velikih površina te su stoga dobri adsorbensi za viruse. Autori ovog rada također su zaključili da velik broj biljnih virusa koji se pojavljuju u površinskim vodama dospije u zemlju adsorbirajući se na čestice tla u gornjim slojevima. Kada virusi dođu do podzemnih voda koje prolaze kroz zemlju, adsorbiraju se na koloidne čestice tla. Na ovaj način je dolazak virusa u rijeke ili jezera zapravo ograničen, a virusi nađeni u rijekama vjerojatno su dospjeli iz površinskih voda.

Pleše i suradnici (1996) proveli su još jedno istraživanje kako bi ustanovili koji se virusi nalaze u tlima hrvatskih šuma. Pri bazi stabla potrebno je uzeti uzorak od otprilike 10 kg tla, na dubini od 20 do 50 cm. Osim tla, bitno je da uzorak sadrži i sitno korijenje te drvenaste biljke. U stakleniku se u to tlo sade pokusne biljke za koje se očekuje prelazak potencijalnih virusa iz tla. Uvijek se u

isti uzorak sadi više različitih biljaka-mamaca u stadiju kada posjeduju nekoliko prvih listića, a to su najčešće *Ch. quinoa*, *Cucumis sativus*, *N. megalosiphon* i *Plantago lanceolata*. Pet do šest tjedana kasnije se korijenje svih biljaka-mamaca sađene u istom uzorku tla izmrvi u tekućem dušiku, a zatim homogenizira u fosfatnom puferu. Dobivenim se homogenatom inokuliraju pokusne biljke za biotest. Uzorci su sakupljeni s tri različita šumska, nenaseljena područja: Turopolja, Vukomeričkih Gorica i Medvednice. U tlima svih triju lokacija bio je prisutan TNV. To se zaključilo prema brznoj pojavi nekrotičnih lezija na pokusnim biljkama *Ch. amaranticolor* i *Ch. quinoa* te prema nekrotičnim i klorotičnim lezijama na listovima biljaka *N. glutinosa*, *N. megalosiphon* i *N. tabacum*. Također, elektronskim mikroskopom uočene su poliedrične čestice promjera 30 nm, koje odgovaraju morfologiji TNV-a (Slika 2.). Osim toga provedeno je i serološko istraživanje kojim je dodatno potvrđeno da se radi o dotičnom virusu.

4. STABILNOST BILJNIH VIRUSA U VODI

O stabilnosti virusa adsorbiranih na čestice zemlje (Piazzola i sur., 1986) već je bilo riječi u prethodnom poglavlju, no postavlja se pitanje zadržavaju li biljni virusi svoju infektivnost u vodenom okruženju. Virus se ne mogu replicirati bez stanice domaćina, stoga njihov opstanak ovisi o biološkim, kemijskim i fizičkim faktorima kao što su sama struktura virusa, prisutnost ostalih mikroorganizama, prisutnost nekih organskih tvari, temperatura, ultraljubičaste zrake, pH, soli i antivirusne tvari (Mehle i suradnici, 2018).

Postoji malo podataka o „preživljavanju“, tj. očuvanju strukture i infektivnosti biljnih virusa u vodi (Mehle i sur., 2018). Još je Koenig 1986. godine pisala o velikoj stabilnosti biljnih virusa koji prolaze kroz probavni trakt kralježnjaka, ostaju infektivni i prenose se na velike udaljenosti. Mehle i Ravnikar (2012) navode kako većina biljnih virusa ostaje infektivna nakon izolacije iz vodenih uzoraka. Na primjer, ToMV, TMV, virus prstenaste pjegavosti karanfila (CRSV, *Carnation ringspot virus*), TBSV, virus pjegavosti karanfila (CarMV, *Carnation mottle virus*) i X-virus krumpira (PVX, *Potato virus X*) ostaju infektivni u uvjetima *in vitro* između 50 i 3000 dana, TNV između 7 i 28, a CMV između 1 i 10 dana. S druge strane Mehle i Ravnikar (2012) navode kako su istraživači ranije pokazali da je dugovječnost infektivnosti za TMV 5 dana u uvjetima *in vitro*. Moguće je da su razlike dugovječnosti infektivnosti za TMV rezultat drugačijih eksperimentalnih

uvjeta. Također, dokazano je da se TNV inaktivira brže u suhim nego u vlažnim uvjetima (Mehle i Ravnikar, 2012).

Mehle i suradnici (2014) istraživali su mogućnost preživljavanja dva virusa i jednog viroida u vodi. Pokus su izveli s PepMV, PVY i s PSTVd. Svakim patogenom posebno inokulirale su se pokusne biljke, a zaraženo je lišće homogenizirano i inkubirano u vodi iz slavine. Nakon filtracije kroz gazu, dobio se infektivni filtrat. Svaki tjedan se filtrat testirao pomoću RT-qPCR-a na prisutnost virusa i viroida. Osim toga, infektivnost infektivnog biljnog soka pratila se mehaničkom inokulacijom na pokusne biljke svaki tjedan, a nakon razvoja simptoma koristile su se molekularne i serološke metode za dodatnu potvrdu. Rezultati su pokazali da je PepMV ostao infektivan u vodi do 3 tjedna, PVY do 1 tjedna, a PSTVd do 7 tjedana.

Mehle i suradnici (2014) pretpostavljaju da dugovječnost „preživljavanja“ PepMV, PVY i PSTVd ovisi o njihovim različitim strukturama. PepMV i PVY su virusi s proteinskom kapsidom koja se puno brže raspada od PSTVd koji je viroid, to jest jednolančana prstenasta RNA-molekula. Međutim, u neobjavljenim rezultatima pokazalo se da ovi virusi i viroid „preživljavaju“ puno duže kad se pohrane na 4 °C, čak i do 10 tjedana. Osim toga, RT-qPCR-om su se detektirale nukleinske kiseline dugo nakon što su ove čestice izgubile infektivnost, što je navelo autore na zaključak da su RNA puno stabilnije i da je to razlog dulje infektivnosti viroida.

Manje stabilni virusi ne bi mogli „preživjeti“ slobodni u vodi, kao ni prolazak kroz probavni trakt kralježnjaka, ali bi mogli preživjeti na sporama gljiva ili u sjemenkama (Mehle i Ravnikar, 2012). U budućnosti bi se moglo istražiti vrijeme „preživljavanja“ i ostalih biljnih virusa u vodi, hranjivim otopinama i ostalim vektorima kao što su kukci, nematode, gljive, alge i sjemenke, kako bi se spriječio prijenos virusa na usjeve, a time i propadanje usjeva. Nažalost, takva istraživanja traju dugo te je njihova izvedba komplicirana. Također bi korisno bilo istražiti koji sve faktori utječu na stabiliziranje biljnih virusa te njihovu inaktivaciju.

5. BILJNI VIRUSI U POLJOPRIVREDI

U pravilu su ljudski virusi oni koji se stavljaju u prvi plan istraživanja, dok su oni biljni bitni u poljoprivredi često bili zanemarevani. Međutim, biljni virusi su jednako važni budući da uzrokuju

epidemije od kojih propadaju čitavi usjevi. Stoga je važno pobrinuti se da voda za navodnjavanje usjeva bude čista i bez patogena (Sevik, 2011). Kontaminirana voda može biti izvor različitih infekcija koje uzrokuju gubitak poljoprivrednih dobara. Preko korijena biljke upijaju vodu i hranjive tvari te na taj način virusi dospijevaju u biljku. Virus ulazi u biljku nakon što se stanice korijena oštete (Koenig, 1986). Iako je koncentracija virusa u vodi mala (Koenig, 1986), ona može biti dovoljno velika da zarazi jednu biljku u kojoj se virusi mogu umnožiti i proširiti na druge usjeve (Sevik, 2011).

Prema Koenig (1986), biljni virusi u vodu dospijevaju na tri načina: otpuštanjem virusa iz zdravog korijenja, iz ozlijeđenog ili raspadajućeg biljnog materijala te iz kanalizacije. Virus se ispuštaju u odvodne vode iz inficiranih biljaka što je dokazano za TNV i neke sojeve TMV-a, ali ne i za CMV. Također, dokazano je i da neke aktivno rastuće biljke otpuštaju više virusa nego one kojima je dio otkinut, u procesu su starenja ili mrtve. Dakako, problem je i biološki otpad. Otkriveno je da koncentracija CGMMV-a u odvodnim kanalima naglo poraste u rujnu kada se zemlja iz staklenika ispire (Koenig, 1986). Što se tiče virusa u kanalizaciji, oni se u pravilu nađu tamo nakon što su prošli kroz probavni trakt čovjeka ili životinje. Na primjer, Koenig (1986) navodi kako su nađeni TBSV, ToMV i CMV u rajčici koja je rasla u mulju korita odvodnih potoka koji potječu iz kanalizacijskih postrojenja u Engleskoj. To upućuje na to da su se prvotno ti virusi nalazili u sjemenu koje je prošlo kroz probavni trakt (Tomlinson i Faithful, 1984). Osim toga, virus može i slobodan prolaziti kroz ljudski probavni trakt i ostati u infektivnom stanju. Nadalje, virusi koji se nalaze u inficiranom lišću također mogu proći kroz probavni trakt miševa i zečeva te ostati infektivni (Koenig, 1986).

Zbog svih ovih saznanja, sve se više pažnje obraća na čistoću vode kojom se zalijevaju usjevi u poljoprivredi. Međutim, zbog oskudnih izvora vode, ona se u poljoprivredi često ponovno iskorištava. Korištenje otpadnih voda za navodnjavanje nosi posljedice ne samo za zdravlje biljaka, već i ljudi. Upotreba čiste, nekontaminirane vode za navodnjavanje posebno je bitna za povrće koje se konzumira sirovo (Sevik, 2011). Stoga Sevik predlaže korištenje metode kapanja kao sustav navodnjavanja, umjesto metode poplave ili metode navodnjavanja brazda. Osim toga, potrebno je čišćenje spremnika vode koja se koristi u svrhu navodnjavanja. Također, kako navodi Sevik, neka istraživanja pokazuju da je preporučljivo i korištenje natrijevog hipoklorita ako se voda ponovo iskorištava u staklenicima, no u principu najbolje je koristiti čistu, nekontaminiranu

vodu. O dezinfekciji vode natrijevim hipokloritom pišu i Mehle i Ravnikar (2012), te spominju još i zagrijavanje vode na 95 °C, korištenje UV-svjetla, elektrolizu deionizirane vode i filtraciju u svrhu pročišćavanja vode za navodnjavanje.

Zbog sve bržeg razvoja gradova i manjka plodnih površina zadnjih godina razvio se sustav hidroponike. Ona omogućuje uzgoj biljaka bez korištenja zemlje u zatvorenim prostorima. Umjesto zemlje koristi se vodena otopina bogata hranjivim tvarima (www.umass.edu). Na ovaj način izbjegavaju se problemi kao što su nematode, patogeni koji žive u tlu te nedostatak nutrijenata. Međutim, u takvim se sustavima virusi lakše mogu prenijeti vodom i inficirati biljku kroz korijenje (Mehle i sur., 2014). Neki virusi koji se prenose vodom u hidroponskim sustavima su ToMV, *Pelargonium flower break virus* (PFBV), europski soj PepMV i *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Mehle i Ravnikar, 2012). ToMV može inficirati rajčicu, ali i papriku. Također, Mehle i suradnici (2014) su dokazali da se PepMV, PVY i PSTVd mogu ispustiti iz korijena u otopinu hranjivih tvari, a zatim inficirati druge biljke preko korijena. Zbog svega navedenog preporučuju se higijenske mjere za radnike, dezinfekcija alata i kemijska dezinfekcija cirkulirajuće vode u hidroponskim sustavima (Mehle i Ravnikar, 2012). Ako epidemija među usjevima ipak izbije, inficirane biljke treba ukloniti te odmah poduzeti mjere dezinfekcije za opremu, alate, odjeću radnika i samih konstrukcija staklenika (Mehle i Ravnikar, 2012). U budućnosti bi se trebalo više istražiti kako spriječiti širenje biljnih virusa u hidroponskim sustavima budući da bi upravo on mogao biti budućnost uzgoja poljoprivrednih dobara.

6. ZAKLJUČAK

Iako biljni virusi ne utječu direktno na zdravlje ljudi, bitno je istražiti njihovu prisutnost u kopnenim vodama budući da mogu biti odgovorni za izbijanje epidemije i propadanje usjeva. Zato treba pripaziti na izvor vode za navodnjavanje te poduzeti mjere čišćenja spremnika vode kojom se usjevi zalijevaju. Biljni virusi se zbog svoje strukture također vrlo dobro zadržavaju na česticama tla te, ispiranjem tla vodom, i na taj način mogu zaraziti biljku. Istraživanja koja će se raditi u budućnosti trebala bi se temeljiti na rasprostranjivanju biljnih virusa u hidroponskim sustavima koji se sve više počinju koristiti zbog manjka plodnih površina i ostalih prednosti nad

konvencionalnim uzgojem. Osim toga, buduća istraživanja koja se temelje na detekciji virusa i dijagnozi biljne bolesti bit će jednostavnija upotrebom HTS-metoda.

7. LITERATURA

- Bačnik, K., Kutnjak, D., Pecman, A., Mehle, N., Tušek Žnidarič, M., Gutiérrez 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.
- Horváth, J., Juretić, N., Krajačić, M., Mamula, Đ., 1986. Tobacco Mosaic Virus in Danube Water in Hungary. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 21, 337-340.
- Jones, R. A. C., 2018. Plant and Insect Viruses in Managed and Natural Environments: Novel and Neglected Transmission Pathways. *Advances in Virus Research* 101, 149-187.
- Juretić, N., Horváth, J., Krajačić, M., 1986. Occurrence of a Tobamovirus Similar to Ribgrass Mosaic Virus in Water of the Hungarian River Zala. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 21, 291-295.
- Juretić, N., Horváth, J., 1991. Some Data on Adsorption of Two Plant Viruses to Soil. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 26, 423-426.
- Juretić, N., Mamula, Đ., Pleše, N., 1996. Plant viruses in soil and water of some forest ecosystems in Croatia with a review of viruses found in forest and ornamental woody plants. *Šumarski list* 120, 477-485.
- Koenig, R., Lesemann, D.-E., 1985. Plant Viruses in German Rivers and Lakes. I. Tombusviruses, a Potexvirus and Carnation Mottle Virus. *Journal of Phytopathology* 112, 105-116.
- Koenig, R., 1986. Plant viruses in rivers and lakes. *Advances in Virus Research* 31, 321-333.
- Koenig, R., Rüdell, M., Lesemann D.-E., 1989. Detection of Petunia Asteroid Mosaic, Carnation Ringspot and Tobacco Necrosis Viruses in Ditches and Drainage Canals in a Grapevine-Growing Area in West Germany. *Journal of Phytopathology* 127, 169-172.
- Mehle, N., Ravnikar, M., 2012. Plant viruses in aqueous environment - Survival, water mediated transmission and detection. *Water Research* 46, 4902-4917.
- Mehle, N., Gutiérrez-Aguirre, I., Prezelj, N., Delić, D., Vidic, U., Ravnikar, M., 2014. Survival and Transmission of Potato Virus Y, Pepino Mosaic Virus, and Potato Spindle Tuber Viroid in Water. *Applied and Environmental Microbiology* 80, 1455-1462.

- Mehle, N., Gutiérrez-Aguirre, I., Kutnjak, D., Ravnikar, M., 2018. Water-Mediated Transmission of Plant, Animal, and Human Viruses. *Advances in Virus Research* 101, 85-128.
- Piazzolla, P., Castellano, M. A., De Stradis, A., 1986. Presence of Plant Viruses in some Rivers of Southern Italy. *Journal of Phytopathology* 116, 244—246.
- Pleše N., Juretić. N., Mamula, Đ., Polák, Z., Krajačić, M., 1996. Plant Viruses in Soil and Water of Forest Ecosystems in Croatia. *Phyton (Horn, Austria)* 36, 135-143.
- Rivarez, M. P. S., Vučurović, A., Mehle, N., Ravnikar, M., Kutnjak, D., 2021. Global Advances in Tomato Virome Research: Current Status and the Impact of High-Throughput Sequencing. *Frontiers in Microbiology* 12, 671925.
- Sevik, M. A., 2011. Water Pollution: Water-Borne Plant Viruses. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 27, 40-47.
- Tomlinson, J. A., Faithfull, E. M., Webb, M. J. W., Fraser, R. S. S., 1983. *Chenopodium* necrosis: a distinctive strain of tobacco necrosis virus isolated from river water. *Annals of applied Biology* 102, 135-147.
- Tomlinson, J. A., Faithfull, E. M., 1984. Studies on the occurrence of tomato bushy stunt virus in English rivers. *Annals of applied Biology* 104, 485-495.
- <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-shotgun-sequencing> (pristupljeno 9.8.2021.)
- <https://ag.umass.edu/greenhouse-floriculture/fact-sheets/hydroponic-systems> (pristupljeno 11.8.2021.)

8. SAŽETAK

Biljni virusi i viroidi prenose se na razne načine, a onaj vodom pogotovo je zanimljiv budući da direktno utječe na poljoprivrednu proizvodnju. Istraživanje biljnih virusa u okolišnim vodama započelo je 80-ih godina dvadesetog stoljeća, a od tada su se metode koncentriranja i detekcije znatno razvile. Ove „stare“ metode ipak su se zadržale kao komplementarne novima. Danas se HTS-metode već učestalo primjenjuju u detekciji virusa i dijagnozama biljnih bolesti. Biljni virusi se najčešće ne nalaze slobodni u vodama, već u agregatima ili adsorbirani na čvrste materijale. Adsorbirani na čestice tla, biljni virusi mogu dugo sačuvati svoju infektivnost budući da interakcije s koloidnim česticama djeluju stabilizirajuće na njih. Neki biljni virusi relativno dugo mogu ostati stabilni i u vodi, čak i do nekoliko tjedana, međutim svoju infektivnost u vodi najduže zadržavaju

viroidi sastavljeni samo od RNA-molekule. Sve više istraživanja usmjerava se na istraživanje uloga biljnih virusa u poljoprivredi, a posebice na hidroponske sustave koji će u budućnosti možda morati zamijeniti polja.

Ključne riječi: adsorpcija u tlu, biljne bolesti, biotestovi, hidroponija, koncentriranje virusa, navodnjavanje, sekvenciranje, zadržavanje infektivnosti

9. SUMMARY

Plant viruses and viroids are transmitted in various ways, but transmission by water is especially interesting because it directly affects agricultural production. The research of plant viruses in environmental waters began in the 1980s and since then, methods of concentration and detection have evolved significantly. However, the “old” methods have been retained as complementary to the new ones. Today, HTS methods are increasingly used for virus detection and plant disease diagnoses. Plant viruses are usually not found free in waters, but in aggregates or adsorbed on solid materials. Plant viruses which are adsorbed to soil particles can retain their infectivity for a long period of time since the interaction with colloidal particles has a stabilizing effect on them. Some plant viruses can remain stable in water for a relatively long period of time, even up to several weeks. However, viroids, composed only of RNA molecules, can retain their infectivity for the longest time. Research efforts have been increasingly focused on the role of plant viruses in agriculture, and especially in the hydroponic systems that may have to replace fields in the future.

Key words: adsorption in soils, plant diseases, biotesting, hydropony, infectivity retention, virus concentration, irrigation, sequencing