

# Stari virusi za novo znanje - viromi iz biljnih bioarheoloških uzoraka

---

Mihalić, Valentino

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:217:471534>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Valentino Mihalić

**Stari virusi za novo znanje – viromi iz biljnih  
bioarheoloških uzoraka**

**Old viruses for new knowledge – viruses from  
bioarchaeological plant samples**

Završni rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić.

# Sadržaj

Uvod.....	1
<b>1. Metode i važnost istraživanja drevnih virusa .....</b>	<b>2</b>
1.1. Očuvanje nukleinskih kiselina .....	2
1.2. Visokoprotočno sekvenciranje (HTS).....	3
1.3. Značaj starih virusnih genoma .....	3
<b>2. Virusi iz biljnih bioarheoloških uzoraka.....</b>	<b>4</b>
2.1. BSMV ( <i>Barley stripe mosaic virus</i> ) .....	4
2.2. aCFV ( <i>Ancient caribou feces associated virus</i> ) .....	7
2.3. ZMCV1 ( <i>Zea mays chrysovirus 1</i> ) .....	10
<b>3. Virusi iz herbarijskih zbirki.....</b>	<b>12</b>
3.1. Tobamovirusi australske populacije <i>Nicotiana glauca</i> .....	12
3.2. BYDV virusi u kalifornijskim travama .....	12
3.3. Virusi usjeva u peruanskim Andama .....	13
3.4. PIVX i AVX.....	13
<b>Zaključak .....</b>	<b>15</b>
<b>Literatura.....</b>	<b>16</b>
<b>Sažetak.....</b>	<b>20</b>
<b>Summary .....</b>	<b>20</b>

## Uvod

Poznato je da su virusi jedna od najstarijih skupina živog svijeta na Zemlji. Međutim, zbog svoje veličine i jednostavne građe, postoji malo fosilnih ostataka virusa iz daleke prošlosti, primjerice virusi kukaca sačuvanih u jantaru (Poinar i Poinar, 2005). Kao dokazi prisutnosti biljnih virusa proučavaju se karakteristične lezije ili nerazvijen endosperm u fosilnim ostacima biljaka (Labandeira i Prevec, 2014). Razvojem metoda izolacije, umnožavanja i sekvenciranja genoma krajem 20. i početkom 21. stoljeća, istraživači su napokon pristupili dotad skrivenom svijetu drevnih virusnih genoma. No većina takvih istraživanja fokusirala se na proučavanje virusa kralježnjaka, posebice čovjeka te čovjeku važnih patogena (Duchêne i sur., 2020).

Biljke čine većinu ljudske prehrane te znamo da su nestašice pojedinih gospodarski značajnih biljaka u povijesti dovodile do velikih kriza, gladi i masovnih migracija. Proučavanje biljnih virusa iz tih vremena može nam pružiti širu sliku o podrijetlu virusa te o njihovoj evoluciji i ekologiji, kako bi se spriječili slični događaji u budućnosti. Budući da je danas poljoprivreda i proizvodnja hrane modernizirana te se koristi komercijalno, često i genetički modificirano sjeme, većina biljaka koje se uzgajaju genetički su vrlo slične, odabrane tako da imaju najveći prinos. Stoga bi emergencija nekog dosad nepoznatog virusa mogla učiniti ogromne štete svjetskim zalihama hrane. U ovom radu istražiti će se dosad otkriveni drevni biljni virusi te važnost sekvenci starih virusnih genoma u našem razumijevanju suvremenih virusa.

# 1. Metode i važnost istraživanja drevnih virusa

## 1.1. Očuvanje nukleinskih kiselina

Glavni uzrok manjka drevnih virusnih sekvenci leži u fizikalnim i kemijskim svojstvima nukleinskih kiselina, preciznije u njihovoj sposobnosti da ostanu očuvane kroz dugi vremenski period. Na očuvanje nukleinskih kiselina utječu brojni faktori, primjerice geografski položaj uzorka, neposredni okoliš, odnosno klimatski i mikroklimatski uvjeti.

Oštećenja na DNA počinju odmah nakon smrti organizma, kemijskim procesima kao što su hidroliza, alkilacija, kondenzacija i oksidacija, a razgradnju DNA potiču i vlastiti enzimi te mikroorganizmi, primjerice bakterije i gljive (Duchêne i sur., 2020; Eglinton i Logan, 1991; Pääbo i sur., 2004). Kao rezultat tih procesa, drevne DNA molekule su kratke, obično između 30 i 60 parova baza, ovisno o starosti i količini dostupne vode i drugih reaktanata u okolišu (Duchêne i sur., 2020; Eglinton i Logan, 1991; Lindahl i Nyberg, 1972; Lindahl, 1993; Pääbo, 1989). Također, dušične baze koje sadrže amine, ponajviše citozin te u manjoj mjeri adenin i gvanin, podložne su hidrolitičkoj deaminaciji, čime nastaje uracil. Uracil se pri umnožavanju DNA pogrešno prevodi u timin, te se zbog toga par baza C:G mijenja u T:A, što je jedan od znakova autentičnosti drevne DNA (Duchêne i sur., 2020; Pääbo i sur., 2004; Hofreiter i sur., 2001; Jónsson i sur., 2013).

S druge strane, RNA je podložna brzom degradaciji zbog sveprisutnih RNaza, zbog 2'-hidroksilne skupine otpornija je na depurinacije, ali je isto tako puno osjetljivija na hidrolizu te se procjenjuje da je brzina raspada RNA 50 puta veća od brzine raspada DNA (Smith i sur., 2014; Eigner i sur., 1961; Thompson i sur., 1995; Fordyce i sur., 2013) Ipak, u uvjetima s malo vode zabilježene su drevne virusne RNA stare i do 1000 godina (Smith i sur., 2014; Ng i sur., 2014; Peyambari i sur., 2018).

## **1.2. Visokoprotočno sekvenciranje (HTS)**

Razvoj metoda visokoprotočnog sekvenciranja (HTS; *high throughput sequencing*) doveo je do naglog povećanja broja objavljenih virusnih sekvenci u zadnjih 20 godina. Postoji više komercijalnih metoda raznih proizvođača, no zajedničko im je to da uglavnom sekvenciraju malene fragmente genoma dužine nekoliko desetaka parova baza, koji se međusobno preklapaju, a zatim se poravnavaju i spajaju bioinformatičkim alatima. Dakle, moguće je rekonstruirati fragmentirani drevni virusni genom.

## **1.3. Značaj starih virusnih genoma**

Osim saznanja o evoluciji virusa, drevne sekvence virusnih genoma vrlo su korisne i u nomenklaturi novih te već opisanih virusa. U radu Jonesa i sur. (2021) navodi se mnogo primjera ispravljanja greški u taksonomiji i nomenklaturi pomoću sekvenci virusa iz starijih virusnih kolekcija. Neke od najčešćih grešaka su klasifikacija blisko srodnih virusnih vrsta kao jedne vrste ili klasifikacija dvaju virusa iste vrste kao dvije različite vrste. Prilikom otkrića novog virusa, sekvence tog i njemu srodnih virusa potrebne su kako bi se izbjegle greške u klasifikaciji i kako bi se novi virus pravilno identificirao. Više sekvenci istog virusa različite starosti ključne su za razumijevanje promjena u virusnoj populaciji, kako se vidi iz primjera u radu Fraile i sur. 1997. godine.

## 2. Virusi iz biljnih bioarheoloških uzoraka

### 2.1. BSMV (*Barley stripe mosaic virus*)

Virus prugastog mozaika ječma (*Barley stripe mosaic virus*) – BSMV jedan je od najistraživanijih biljnih virusa koji inficiraju više vrsta jednosupnica značajnih za poljoprivredu (Lee i sur., 2012). Naime, osim ječma i pšenice, može inficirati još stotine drugih vrsta iz porodice *Poaceae*, uključujući kukuruz (*Zea mays*), a također i neke dvosupnice rodova *Nicotiana* i *Chenopodium* (Jackson i Lane, 1981). BSMV je tripartitni RNA-virus iz roda *Hordeivirus*, a prenosi se uglavnom vertikalno, putem peluda i sjemenki (Jackson i sur., 2009). Otkriven je 1950. godine, a najraniji zapisi o njegovim simptomima zabilježeni su prije stotinjak godina (McKinney, 1965).

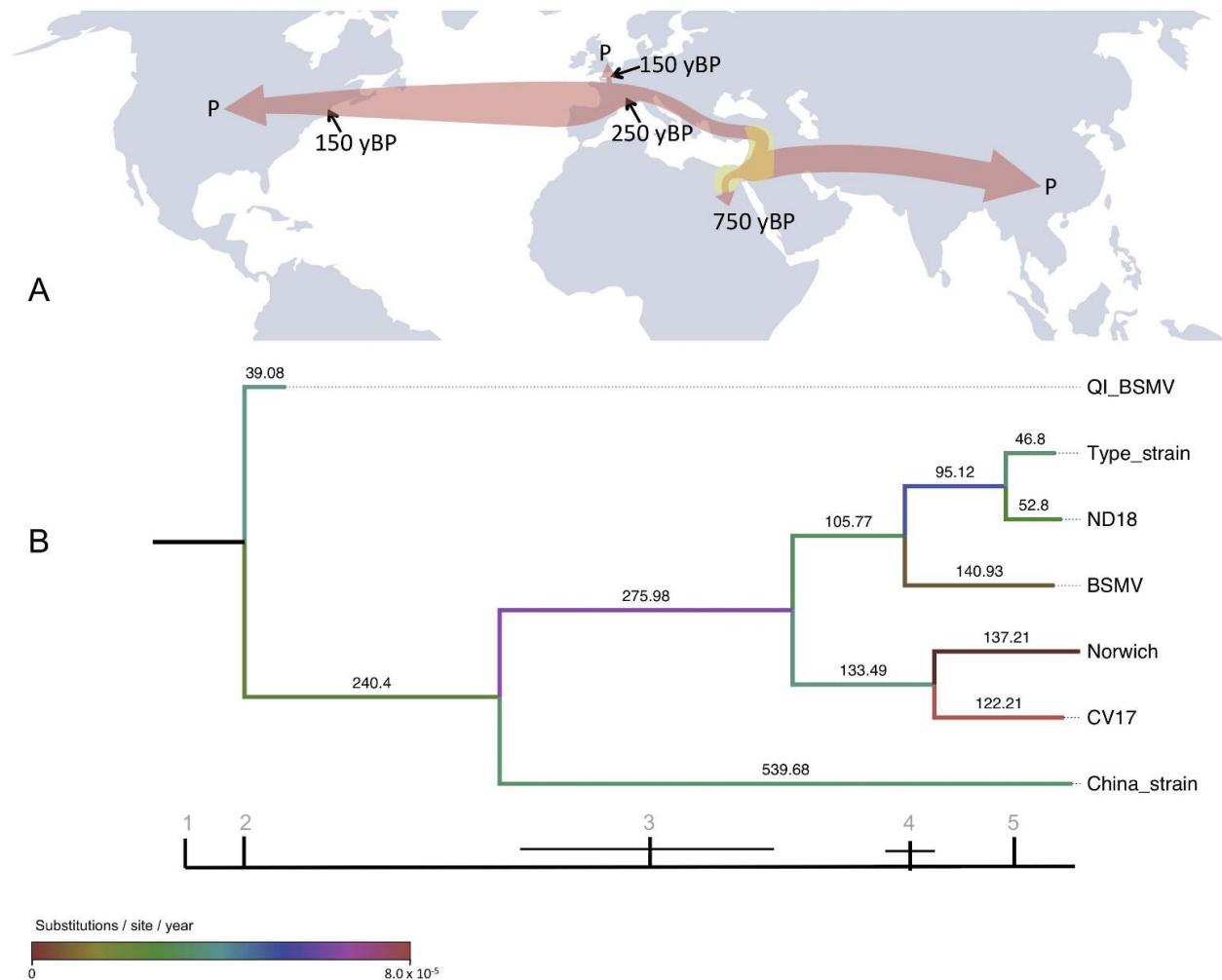
Smith i suradnici (2014) analizirali su arheološke uzorke ječma, prikupljene na lokaciji Qasr Ibrim u sjevernoj Africi, ne bi li u njima utvrdili prisutnost drevne virusne RNA. Ta specifična lokacija odabrana je zbog suhih uvjeta koji vladaju većinu godine, jer su zaključili da je upravo u takvim uvjetima najveća mogućnost pronalaska očuvane RNA koja je osjetljivija na hidrolizu u odnosu na DNA. Uzorci su prikupljeni iz četiriju arheoloških slojeva, od kojih je svaki pripadao određenom vremenskom razdoblju, a zatim umnoženi metodom RT-PCR. Korištene su početnice za svaki od triju dijelova genoma BSMV-a: gen za helikazu, gen beta-C te gen za RNA-polimerazu. Pozitivni rezultati detektirani su samo u uzorku QI84/71, koji pripada sloju iz kasno-kršćanskog perioda, a čija se starost procjenjuje na 600 do 900 godina.

Umnožene molekule RNA sekvencirane su na platformi Illumina Hi-Seq te je iz njih rekonstruiran konsenzusni arheološki genom BSMV-a koji je korišten za daljnju analizu. U svrhu kontrole provjerili su sadrži li konsenzusna sekvenca genomske elemente ječma te zaključili da nije došlo do neočekivane ugradnje virusa u genom ječma. Nadalje, korištenjem metode komparativnih profila modifikacija baza ispitali su vjerojatnost da je ta sekvenca rezultat kontaminacije nekim od suvremenih sojeva. Naime, proučavanjem količine modifikacija citozina u uracil deaminacijom u usporedbi s modernom sekvencom BSMV-a uočene su značajne razlike između dvaju sojeva. Naime, soj koji pripada uzorku QI84/17 sadržavao je mnogo više modifikacija C > U od modernog soja, što je istraživače dovelo do zaključka da se stvarno radi o genomu BSMV-a starom ~750 godina. To ga čini prvim sekvenciranim arheološkim virusnim genomom.



Kako bi rekonstruirali evolucijsku prošlost BSMV-a, usporedili su arheološku sekvencu s još 6 sekvenci genoma suvremenih sojeva koje su prethodno objavljene. Kao vanjsku skupinu za ukorijenjivanje filogenetičkog stabla koristili su semilatentni virus trava (PSLV – *Poa semilatent virus*) jer su otkrili da taj virus čini najbližu sestrinsku skupinu BSMV-u. Na temelju rekonstruiranog stabla i nekih povijesnih činjenica uspjeli su približno odrediti evolucijsku povijest BSMV-a i njegovo rasprostranjivanje u različite dijelove svijeta (Slika 1.). Arheološki genom BSMV-a nalazi se blizu baze stabla te je blisko srodan suvremenim sojevima. Odvajanje se događa otprilike 1234., što se poklapa sa Sedmim križarskim ratom Luja IX (Tyerman, 2006). Nakon toga odvaja se grana kineskog soja, a druga grana kasnije tvori europske i američke sojeve. Ta podjela datira iz 1473. godine, stoljeće nakon što je Mongolsko Carstvo otvorilo Put svile, što dovodi do zaključka da je vjerojatno dospjeće virusa u Aziju upravo trgovačkim putevima u srednjem vijeku. Nova tehnološka postignuća tijekom i nakon Industrijske revolucije omogućila su lakše rasprostranjivanje BSMV-a Europom i u Sjevernu Ameriku. Daljnji razvoj poljoprivrede u poslijeratnom periodu dodatno je potaknuo njegovo rasprostranjivanje na globalnoj razini.

Uključivanje arheološkoga genoma u filogenetičku analizu uvelike je promijenilo dotadašnje pretpostavke o starosti BSMV-a i pokazalo da je prisutan u žitaricama dulje nego što se očekivalo. Također, dobili smo i sasvim novi uvid u evoluciju virusa i njegovo rasprostranjivanje svijetom. Podaci dobiveni ovim istraživanjem ukazuju na to da se BSMV jako rasprostranio tek prije otprilike 800 godina, dok je njegova starost procijenjena na desetak tisuća godina.



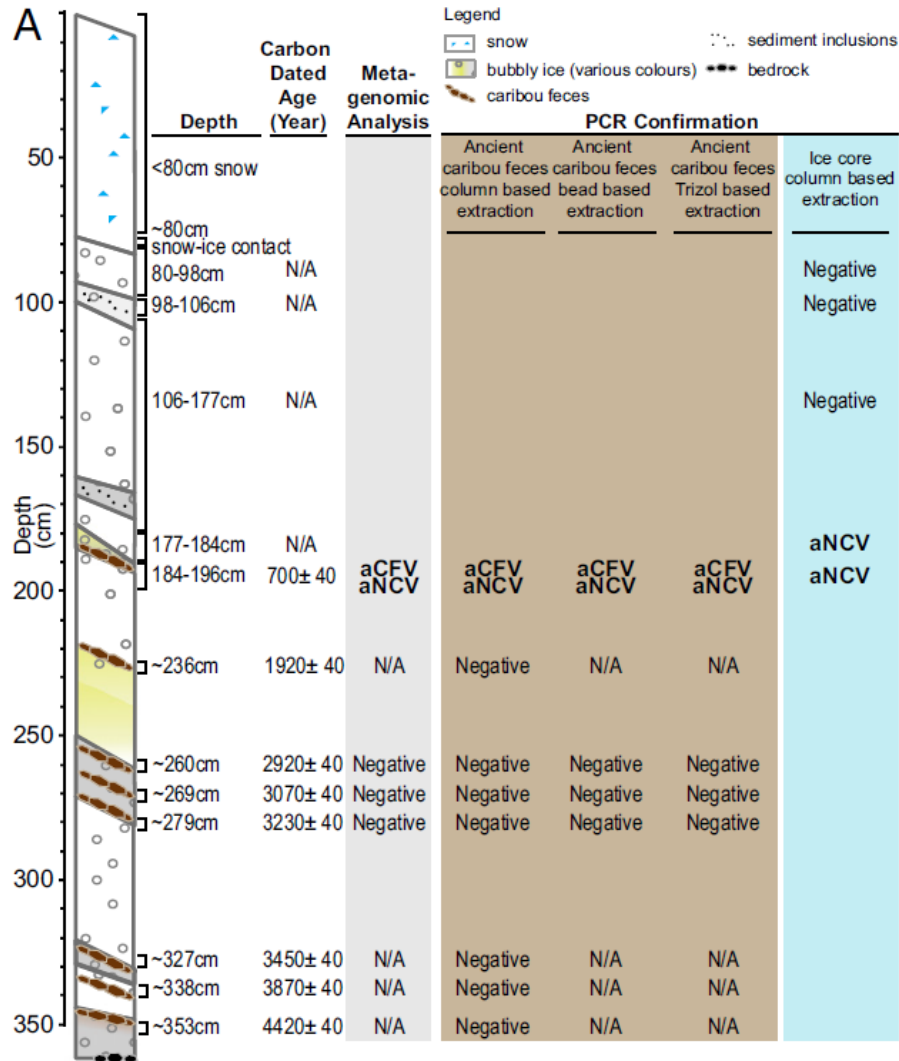
**Slika 1. Pretpostavljeno kretanje populacije i filogenija BSMV-a (preuzeto iz Smith i sur., 2014).** (A): Karta rasprostranjenja BSMV-a od njegovog vjerojatnog mjesta nastanka, Plodnog polumjeseca, od prije ~100 000 godina do danas. Crvene strelice označavaju vjerojatni smjer rasprostranjivanja, a 'yBP' (*years before present*) i 'P' (*present*) označavaju vrijeme. (B): Prikaz evolucije BSMV-a pomoću paketa BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*). Na vremenskoj skali brojevima su označeni relevantni povijesni događaji: 1: Zadnji zajednički predak sojeva BSMV-a (~10 000 god.). 2: Pretpostavljen dolazak virusa u Qasr Ibrim. 3: Ponovno otvaranje Puta svile; prijenos virusa u Aziju. 4: Industrijska revolucija u Europi i SAD-u, koja je potencijalno omogućila prenošenje virusa u Sjevernu Ameriku. 5: Poslijeratna Zelena revolucija; daljnje rasprostranjivanje virusa širom svijeta. Obojena skala prikazuje učestalost mutacija u genomu BSMV-a.

## 2.2. aCFV (*Ancient caribou feces associated virus*)

Kao još jedan dokaz mogućnosti očuvanja arheološkog virusnog genoma u ekstremnim uvjetima, u ovome slučaju potpuno suprotnima vrućim i suhim uvjetima očuvanja drevnog BSMV-a iz prethodnog poglavlja, Ng i sur. (2014) uspjeli su izolirati i rekonstruirati genome dvaju različitih virusa iz izmeta sobova (*Rangifer tarandus*) očuvanog u permafrostu na sjeverozapadu Kanade.

Permafrost je jedinstveno nalazište brojnih arheoloških i bioloških uzoraka. Tako je spomenuti tim istraživača u planinama Selwyn u Kanadi analizirao ledenu jezgru koja sadrži slojeve sobovog izmeta, čija starost seže i do 5 000 godina, ne bi li pronašli drevne virusne nukleinske kiseline. Naime, sobovi posjećuju planinske ledene pojaseve u ljetnim mjesecima kako bi se sklonili od velikog broja insekata te za sobom ostavljaju slojeve fekalnog materijala. Analizirani slojevi uzorkovani su na dubini leda većoj od jednog metra ispod površine (Ion i Kershaw, 1989; Farnell i sur., 2004; Galloway i sur., 2012). Prethodna istraživanja uzorka KfTe-1-C1-5 metodom datiranja radioaktivnim ugljikom pokazala su da jezgra obuhvaća raspon starosti 700 – 4420 godina (Galloway i sur., 2012).

Izolirane su nukleinske kiseline iz zamrznutih fekalnih ostataka iz slojeva starih 700, 2920, 3070 te 3230 godina (Slika 2.). Kako bi se stvorila potpuna slika viroma, proveden je RT-PCR s degeneriranim 3'-početnicama i dobivena DNA sekvencirana je pomoću platforme Roche 454. U sloju starom  $700 \pm 40$  godina identificirane su dvije virusne sekvence od kojih je jedna pripadala DNA-virusu, a druga RNA-virusu. DNA-virus nazvan je „*Ancient caribou feces associated virus*“ (aCFV), a RNA-virus, čija sekvenca nalikuje virusima iz skupine *Cripavirus*, nazvan je prema lokaciji pronalaska „*Ancient Northwest Territories cripavirus*“ (aNCV).



Slika 2. Shema ledene jezgre KfTe-1-C1-5 korištene u analizi (preuzeto iz Ng i sur., 2014). Prikazana je dubina uzoraka, njihova dob određena C14-datiranjem te rezultati metagenomičkih i PCR-analiza.

Genom aCFV-a sadrži 2 otvorena okvira čitanja (ORF) i replicira se dvosmjerno. Jedan ORF kodira protein povezan s replikacijom, Rep, čija aminokiselinska sekvenca dijeli 26% identiteta s Rep-proteinima geminivirusa te 29% identiteta s Rep-proteinima gemycircularvirusa. Drugi ORF svojom sekvencom ne nalikuje značajno nijednom drugom proteinu iz baze podataka, no pretpostavlja se da kodira protein kapside virusa (CP). Filogenetičke analize pokazale su da je aCFV u dalekom srodstvu s biljnim virusima iz skupina geminivirusa i gemycircularvirusa, te da je genom aCFV-a vrlo različit od svih dosad sekvenciranih virusa i ne pripada ni u jednu taksonomsku kategoriju virusa s jednolančanim prstenastim DNA-genomima.

Filogenetička analiza gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RdRp) aNCV-a pokazala je da aNCV pripada rodu *Cripavirus* iz porodice virusa insekata *Dicistroviridae*.

Kako bi istražili biološka svojstva virusa aCFV, umnožili su njegov genom metodom lančane reakcije polimerazom i pokušali inokulirati laboratorijsku modelnu biljku *Nicotiana benthamiana* bombardiranjem zlatnim česticama koje su obložene virusnim genomom. Također, klonirali su i multimerne virusnog genoma u vektor pCAMBIA1300, njime transformirali bakterije *Agrobacterium tumefaciens* te inokulirali drugu skupinu biljaka *N. benthamiana*. U oba slučaja PCR-test potvrdio je prisutnost virusa u većini biljaka, no one nisu pokazivale vidljive simptome. Utvrđeno je tek da se genom aCFV-a umnožava u biljnoj vrsti *N. benthamiana*, i to mehanizmom kotrljajućeg prstena. Manjak patogenosti aCFV-a može se pripisati i relativnoj jednostavnosti njegova genoma, budući da sadrži samo gene za Rep-protein te kapsidni protein. Ipak, za potpunu sliku o svojstvima aCFV-a, potrebno je pronaći njegova izvornog domaćina.

### 2.3. ZMCV1 (*Zea mays chrysovirus 1*)

Jedna od poljoprivredno najznačajnijih biljaka, uz ječam, svakako je i kukuruz (*Zea mays* ssp. *mays*). Divlji predak iz kojega je kultiviran moderni kukuruz dugo je bio nepoznat, no prema novijim istraživanjima to je vjerojatno meksička biljka *teosinte* (*Z. mays* ssp. *parviglumis*) (Doebly i sur., 1990; Doebly, 2004; Matsouka i sur., 2002; Piperno i Flannery, 2001). Tim istraživača Peyambari i sur. (2018) analizirali su moderne i arheološke uzorke kukuruza i *teosinte* u potrazi za virusima koji perzistentno inficiraju biljke („perzistentni virusi“ prema Roossinck, 2012a), a koji dotad nisu bili pronađeni u kukuruзу.

Traženi „perzistentni“ biljni virusi uglavnom su asimptomatski, prenose se samo vertikalno na potomke i prisutni su u svim stanicama zaražene biljke jer su u trenutku stanične diobe nasumično raspoređeni u roditeljskoj stanici (Roossinck, 2015). Najviše takvih virusa ima dvolančani RNA-genom i u srodstvu su s virusima gljiva (Roossinck, 2012a) te su najčešći virusi u divljim biljkama (Roossinck, 2012b). Virusi s dvolančanim RNA-genomom koji perzistentno inficiraju biljke i gljive pripadaju porodici *Chrysoviridae*. Chrysovirusi su građeni od tri do pet monocistronskih segmenata dvolančane RNA koji kodiraju kapsidni protein (CP), RdRp te protein nepoznate funkcije p98 (Li i sur., 2013).

Iskapanje ruševina „Indijanaca“ Anasazi, Antelope House u Arizoni, predvodio je Don P. Morris između 1970. i 1974. godine. Iz tog nalazišta prikupljeno je 312 uzoraka kukuruza, koji su se sastojali od cijelih klipova, pojedinačnih zrna, ljuski, listova i stabljiki, odabranih tako da se pokrije širok vremenski raspon. Prethodnim datiranjem radioaktivnim ugljikom utvrđeno je da uzorci potječu iz razdoblja između 700. i 1300. godine (Peyambari i sur., 2018).

Iz uzoraka su potom izolirane nukleinske kiseline, obogaćene su za dvolančanu RNA i reverzno prepisane u cDNA, a potom sekvencirane platformom Illumina HiSeq 2000. Sekvence su poravnate i uspoređene s podacima iz baze GenBank. Sekvenca koja se najčešće pojavljivala nalikuje sekvenci genoma poznatog chrysovirusa *Anthurium mosaic-associated virus* i njeni su dijelovi pronađeni u ukupno 39 uzoraka, starosti cca 1000 godina, od čega su u tri uzorka pronađene gotovo potpune sekvence. Znanstvenici su taj novootkriveni virus nazvali *Zea mays chrysovirus 1* (ZMCV1).

Genom virusa ZMCV1 sastoji se od tri dvolančana RNA-segmenta, od kojih svaki sadrži po jedan otvoreni okvir čitanja. RNA-segmenti označeni su brojevima (1-3) i kodiraju redom proteine CP, RdRp i p98. Sekvenca duljine otprilike 650 aminokiselina na N-kraju kapsidnog proteina ZMCV1 značajno nalikuje sekvenci pronađenoj u ostalim srodnim chrysovirusima. Nadalje, sekvenca gena za RdRp na N-kraju sadrži konsenzusni slijed zvan phytoreovirus S7-domena, a koji je prisutan u nekoliko virusnih porodica uključujući i *Chrysoviridae* (Li i sur., 2013). Protein nepoznate funkcije p98 sadrži aminokiselinski motiv PGDGXCXXHX, prethodno opisan u virusu povezanom s bolesti trešnje Amasya – *Amasya cherry disease-associated virus* (Covelli i sur., 2004).

Starost triju klipova kukuruza u kojima su pronađene gotovo cjelovite sekvence i dvaju klipova s parcijalnim sekvencama potvrđena je datiranjem radioaktivnim ugljikom i kalibrirana kalendarom. Ispostavilo se da uzorci potječu iz raspona između 1030. i 1290. godine. Tim znanstvenika potom je pokušao izolirati genom ZMCV1 iz suvremenog kukuruza i *teosintea* tako što su dizajnirali specifične početnice prema prethodno pronađenim drevnim sekvencama. Međutim, pozitivni rezultati dobiveni su samo u kukuruzu (kultivar Japonica Striped), ne i *teosinteu*, čak i uz korištenje degeneriranih početnica.

Usporedba sekvenci drevnog i suvremenog genoma virusa ZMCV1 pokazala je 96,7% identiteta u RNA 1, 98% identiteta u RNA 2 te 97,4% identiteta u RNA 3. To dovodi do zaključka da se virus ZMCV1 promijenio za oko 3% u zadnjih 1000 godina evolucije, iako se ne može sa sigurnošću reći da je ZMCV1 pronađen u kultivaru Japonica Striped direktni potomak onoga izoliranog iz drevnog kukuruza u Arizoni.

Analiza *Northern blot* dvolančanih RNA izoliranih iz kukuruza i *teosintea*, koje su potom hibridizirane sa sondama cDNA klonova virusnih RNA, potvrdila je da se u *teosinteu* ne nalaze RNA koje pripadaju virusu ZMCV1, već su one prisutne samo u pravom kukuruzu. Dakle, dvolančane ribonukleinske kiseline prisutne u *teosinteu*, ako su iz skupine chrysovirusa, pripadaju nekom drugom virusu, a ne ZMCV1 (Peyambari i sur., 2018).

### **3. Virusi iz herbarijskih zbirki**

Osim drevnih biljnih virusa, čiji su nalazi relativno rijetki, nakon razvoja novih tehnologija pronađeno je i nekoliko biljnih virusa u biljnim uzorcima herbarijskih zbirki, starosti do 100 godina. Iako se herbariji ne mogu klasificirati kao arheološki uzorci, saznanja o biljnim virusima dobivena iz takvih uzoraka jednako su vrijedna u razumijevanju rasprostranjivanja i evolucije pojedinih virusa.

#### **3.1. Tobamovirusi australske populacije *Nicotiana glauca***

Analizom uzoraka dobivenih iz živućih te iz herbarijskih primjeraka biljke *Nicotiana glauca* na području Novog Južnog Walesa u Australiji, Fraile i suradnici (1997) došli su do zanimljivih spoznaja o zajedničkoj evoluciji dvaju tobamovirusa. Herbarijski uzorci prikupljeni su između 1899. i 1972. godine, dok su izolati iz svježih uzoraka skupljeni između 1985. i 1993. godine. Naime, analiza sekvenci genoma virusa mozaika duhana (TMV) i virusa svijetlozelenog mozaika duhana (*Tobacco mild green mosaic virus* – TMGMV) pokazala je kako je većina najstarijih biljaka bila inficirana i TMV-om i TMGMV-om, dok se u mlađim uzorcima postupno smanjuje koncentracija TMV-a uz povećanje njegove genetičke raznolikosti, tj. stope mutacija. Suprotno tome, koncentracija i genetička raznolikost TMGMV-a ostala je relativno stabilna, što ukazuje na dominaciju tog virusa nad TMV-om. Povećana stopa mutacija u genomu TMV-a dovela je do nakupljanja štetnih mutacija i postupnog gubljenja TMV-a iz populacije *N. glauca*.

#### **3.2. BYDV virusi u kalifornijskim travama**

Virusi žute patuljavosti ječma i žitarica (*Barley yellow dwarf viruses* – BYDV; *Cereal yellow dwarf viruses* – CYDV), nadalje BYDV-ovi, česti su patogeni mnogih vrsta iz porodice trava, *Poaceae*. To su jednolančani RNA-virusi te uzrokuju velike štete na usjevima na svjetskoj razini (Lister i Ranieri, 1995). Malmstrom i sur., (2007) testirali su uzorke divljih trava savezne države Kalifornije (SAD) kako bi u njima istražili prisutnost BYDV-ova i njihov utjecaj na rasprostranjivanje invazivnih europskih vrsta u 18. i 19. stoljeću. Uzorci su prikupljeni iz herbarijskih zbirki nekoliko američkih sveučilišta, a potječu iz perioda između 1894. i 1958. godine. Detektirano je 9 različitih vrsta BYDV-a, s kojima su provedene filogenetičke analize. Rezultati upućuju na to da su ti virusi vjerojatno bili prisutni tijekom invazije kalifornijskih travnjaka europskim vrstama, te da su možda



potpomogli u rasprostranjivanju invazivnih vrsta. Štoviše, raznolikost i rasprostranjenost virusa u biljkama prikupljenima početkom 20. stoljeća vrlo su slične trenutnima, pa se može pretpostaviti da je taj sustav patogena „dobro razvijen i prisutan već neko vrijeme.“

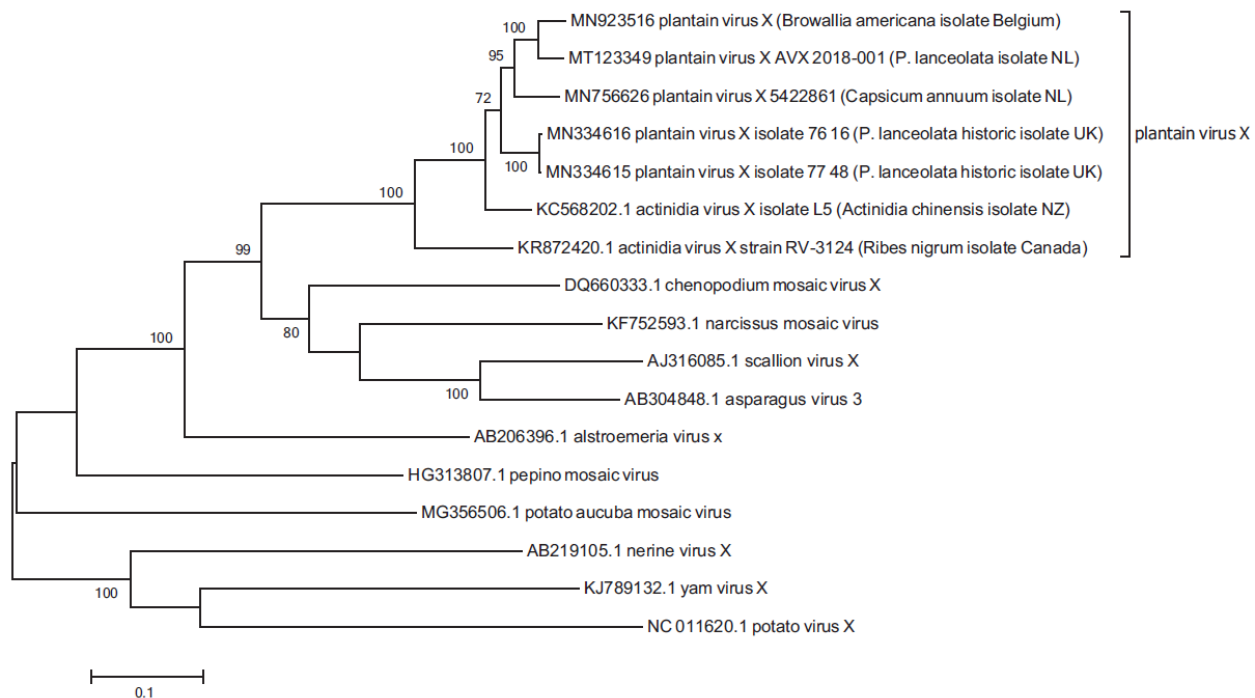
### 3.3. Virusi usjeva u peruanskim Andama

Pohranjeni uzorci usjeva prikupljeni između 1975. i 1986. u peruanskim i bolivijskim Andama poslužili su Ianu P. Adamsu i njegovom timu za objavljivanje nekoliko potpunih, dotad nepoznatih sekvenci genoma nekih biljnih virusa. Naime, objavljene su potpune genomske sekvence dvaju virusa iz porodice *Potyviridae*, izoliranih iz uzoraka biljke *Arracaccia xanthorrhiza*, i to *Arracacha virus A* – AVA (Adams i sur., 2017a) te *Arracacha virus Y* – ArVY, za koji se ispostavilo da je istovjetan prethodno sekvenciranom i objavljenom genomu virusa *Arracacha mottle virus* – AMoV (Adams i sur., 2018a; Orilio i sur., 2009; 2013). Nadalje, iz uzorka biljke *mashua* (*Tropaeolum tuberosum*) starog 33 godine izoliran je i sekvenciran genom potyvirusa *Mashua virus Y*, ali potrebna su dodatna istraživanja da bi se točno odredio njegov položaj u filogenetičkom stablu (Adams i sur., 2017b). Iz uzoraka krumpira (*Solanum tuberosum*), također starih 33 godine, izoliran je i sekvenciran genom virusa roda *Nepovirus*, nazvan *Potato virus U* (Adams i sur., 2018b) te virusa *Potato virus T* iz roda *Tepovirus*, porodice *Betaflexiviridae* (Adams i sur., 2017c).

### 3.4. PIVX i AVX

Virus trputca X (*Plantain virus X* – PIVX) iz skupine potexvirusa prvi je put opisan u domaćinu uskolisnom trputcu (*Plantago lanceolata*) 1981. godine (Hammond, 1981, 1982; Hammond i Hull, 1981). Međutim, sekvenca njegova genoma bila je nepoznata sve do 2020. godine, kada je tim Johna Hammonda podvrgnuo originalne uzroke uskolisnog trputca, stare 43 godine, visokoprotočnom sekvenciranju (Hammond i sur., 2020). Rezultati su bili iznenađujući. Naime, otkrili su da je sekvenca PIVX identična sekvenci nešto ranije opisanog virusa kivija X, (*Actinidia virus X* – AVX) (Blouin i sur., 2013; Pearson i sur., 2011). Blouin i sur. (2013) također su ustanovili da kivi nije najpogodniji domaćin AVX-a, s obzirom da je nakon mehaničke inokulacije biljke kivija virusom titar virusa znatno pao, a 2 mjeseca kasnije nije se moglo ni detektirati njegovu prisutnost. Druga istraživanja pokazala su da je PIVX prisutan u različitim biljkama i u različitim dijelovima svijeta, te su Hammond i sur. (2020) sakupili sekvence i sastavili filogenetičko stablo

virusa (Slika 3.). Budući da je virus prvi put opisan kao PIVX i većinom prisutan u uskolisnom trputcu, predlažu da prednost u nomenklaturi pripadne nazivu PIVX, odnosno virus trputca X.



**Slika 3. Maximum-likelihood filogenetičko stablo genoma PIVX, AVX i srodnih biljnih virusa (preuzeto iz Hammond i sur. 2020).** Uz nazive izolata virusa trputca X navedeni su i domaćini iz kojih je virus izoliran te država pronalaska.

## **Zaključak**

Analiza biljnih bioarheoloških uzoraka često dovodi do otkrića novih, dosad nepoznatih biljnih virusa ili do novih vrijednih spoznaja o već poznatim virusima, njihovom podrijetlu, evoluciji i rasprostranjivanju svijetom. Bolje razumijevanje biljnih virusa omogućuje prilagođavanje pristupa u uzgoju poljoprivrednih kultura u svrhu povećanja prinosa te minimiziranja potencijalne štete na usjevima. S obzirom na mali broj dosadašnjih istraživanja drevnih biljnih virusa, vjerujem da znanstvenu zajednicu očekuje još mnogo važnih i zanimljivih otkrića na tome području. Dodatnim razvojem tehnologije povećat će se preciznost i osjetljivost metoda ekstrakcije nukleinskih kiselina te metoda visokoprotočnog sekvenciranja, što će omogućiti rekonstrukciju drevnih genoma čak i iz vrlo malog uzroka oštećenih, slabo očuvanih bioarheoloških nalaza.

## Literatura

- Adams P.I., Boonham N., Jones R.A.C., 2017a. First complete genome sequence of *Arracacha virus A* from an 38-year-old sample from Peru. *Genome Announc.* 5:e00141-17.
- Adams P.I., Fox A., Boonham N., Jones R.A.C., 2017b. Complete genomic sequence of the potyvirus, *Mashua virus Y*, obtained from a 33-year-old mashua (*Tropaeolum tuberosum*) sample. *Microbiol. Resour. Announc.* 7:e01064-18.
- Adams P.I., Abad J., Fribourg C.E., Boonham N., Jones R.A.C., 2017c. Complete genome sequence of *Potato virus T* from Bolivia obtained from a 33-year-old sample. *Microbiol Resour Announc* 7:e01066-18.
- Adams P.I., Boonham N., Jones R.A.C., 2018a. Full-genome sequencing of a virus from a 33-year-old sample demonstrates that *Arracacha mottle virus* is synonymous with *Arracacha virus Y*. *Microbiol. Resour. Announc.*7:e01393-18.
- Adams P.I., Boonham N., Jones R.A.C., 2018b. A 33-year-old plant sample contributes the first complete genomic sequence of *Potato virus U*. *Microbiol. Resour. Announc.* 7:e01392-18.
- Blouin, A., Pearson, M., Chavan, R., Woo, E.N.Y., Lebas, B.S.M., Veerakone, S. et al., 2013. Viruses of kiwifruit (*Actinidia* species). *Journal of Plant Pathology*, 95, 221–235.
- Covelli L., Coutts R.H.A., Serio F.D., Citir A., Acikoz S., Hernandez C., Ragozzino A., Flores R., 2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. I. Characterization of a new species in the genus *Chrysovirus*. *J Gen Virol* 85:3389-3397.
- Doebley J., Stec A., Wendel J., Edwards M., 1990. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: Implications for the origin of maize. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:9888-9892.
- Doebley J. 2004. The genetics of maize evolution. *Annu. Rev. Genet.* 38:37-59.
- Duchêne, S., Ho, S.Y.W., Carmichael, A.G., Holmes, E.C., Poinar, H., 2020. The Recovery, Interpretation and Use of Ancient Pathogen Genomes. *Curr. Biol.* 30, R1215–R1231.
- Eglinton, G., Logan, G.A., 1991. Molecular preservation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 333, 315–328.
- Eigner, J., Boedtke, H. & Michaels, G., 1961. The thermal degradation of nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 51, 165–168

- Farnell R., Hare P.G., Blake E., Bowyer V., Schweger C., Greer S., Gotthardt R., 2004. Multidisciplinary investigations of alpine ice patches in Southwest Yukon, Canada: Paleoenvironmental and paleobiological investigations. *Arctic* 57(3):247–259.
- Fordyce, S.L., Kampmann, M.L., van Doorn, N.L., Gilbert, M.T.P., 2013. Long-term RNA persistence in post mortem contexts. *Investigative Genetics*. 4, 7.
- Fraile, A., Escriu, F., Aranda, M.A., Malpica, J.M., Gibbs, A.J., García-Arenal, F., 1997. A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J. Virol.* 71, 8316–8320.
- Galloway J.M., Adamczewski J., Schock D.M., Andrews T.D., MacKay G., Bowyer V.E., Meulendyk T., Moorman B.J., Kutz S.J., 2012. Diet and habitat of mountain woodland caribou inferred from dung preserved in 5000-year-old alpine ice in the Selwyn Mountains, Northwest Territories, Canada. *Arctic* 65(5)
- Hammond, J., 1981. Viruses occurring in *Plantago* species in England. *Plant Pathology*, 30, 237–243.
- Hammond, J., 1982. *Plantago* as a host of economically important viruses. *Advances in Virus Research*, 27, 103–140.
- Hammond, J., Adams, I.P., Fowkes, A.R., McGreig, S., Botermans, M., Oorspronk, J.J.A., Westenberg, M., Verbeek, M., Dulleman, A.M., Stijger, C.C.M.M., Blouin, A.G., Massart, S., De Jonghe, K., Heyneman, M., Walsh, J.A., Fox, A., 2020. Sequence analysis of 43-year old samples of *Plantago lanceolata* show that Plantain virus X is synonymous with Actinidia virus X and is widely distributed. *Plant Pathol.* 70, 249–258.
- Hammond, J., Hull, R., 1981. Plantain virus X: a new potexvirus from *Plantago lanceolata*. *Journal of General Virology*, 54, 75–90.
- Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., von Haeseler, A., and Pääbo, S., 2001. DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Res.* 29, 4793–4799.
- Ion P.G., Kershaw P.G., 1989. The selection of snow patches as relief habitat by woodland caribou: *Rangifer tarandus caribou*. *Arct Alp Res* 21(2):203–211.
- Jackson, A. O., Lim, H. S., Bragg, J. Ganesan. & Lee, M. Y., 2009. Hordeivirus replication, movement and pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopath.* 47, 385–422. Jackson, A. O. & Lane, L.

- C., 1981. Hordeiviruses. In Kurstak, E. ed, Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier, Amsterdam, pp 565–625.
- Jónsson, H., Ginolhac, A., Schubert, M., Johnson, P.L.F., and Orlando, L., 2013. mapDamage2.0: fast approximate Bayesian estimates of ancient DNA damage parameters. *Bioinformatics* 29, 1682–1684.
- Labandeira, C.C., Prevec, R., 2014. Plant paleopathology and the roles of pathogens and insects. *Int. J. Paleopathol.* 4, 1–16.
- Lee, W. S., Hammond-Kosack, K. E. & Kanyuka, K., 2012. Barley Stripe Mosaic Virus – mediated tools for investigating gene function in cereal plants and their pathogens: virus-induced gene silencing, host-mediated gene silencing, and virus-mediated overexpression of heterologous protein. *Plant Physiol.* 160, 582–590.
- Li L., Liu J., Xu A., Want T., Chen J., Zhu X., 2013. Molecular characterization of a trisegmented chrysovirus isolated from the radish *Raphanus sativus*. *Vir. Res.* 176:169- 178.
- Lindahl, T., and Nyberg, B., 1972. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11, 3610–3618.
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.
- Lister, R.M., Ranieri, R. (1995) Distribution and economic importance of barley yellow dwarf. *Barley Yellow Dwarf: 40 Years of Progress* (eds C.J. D’Arcy & P.A. Burnett), pp. 29–53. The American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota.
- Malmstrom, C.M., Shu, R., Linton, E.W., Newton, L.A., Cook, M.A., 2007. Barley yellow dwarf viruses (BYDVs) preserved in herbarium specimens illuminate historical disease ecology of invasive and native grasses. *J. Ecol.* 95, 1153–1166.
- Matsuoka Y., Vigouroux Y., Goodman M.M., Sanchez G. J., Buckler E., Doebley J., 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:6080-6084
- McKinney, H. H., 1965. Biological characteristics of barley stripe mosaic virus strains and their evolution. *USDA Agricultural Research Service Technical Bulletin.* 1324, 1–79.
- Ng, T.F.F., Chen, L.-F., Zhou, Y., Shapiro, B., Stiller, M., Heintzman, P.D., Varsani, A., Kondov, N.O., Wong, W., Deng, X., Andrews, T.D., Moorman, B.J., Meulendyk, T., MacKay, G., Gilbertson, R.L., Delwart, E., 2014. Preservation of viral genomes in 700-y-old caribou feces from a subarctic ice patch. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16842–16847.

- Orilio A.F., Dusi A.N., Madeira N.R., Inoue-Nagata A.K., 2009. Characterization of a member of a new *Potyvirus* species infecting arracacha in Brazil. *Arch. Virol.* 154:181–185.
- Orílio A.F., Lucinda N., Dusi A.N., Nagata T., Inoue-Nagata A.K., 2013. Complete genome sequence of arracacha mottle virus. *Arch. Virol.* 158:291–295.
- Pääbo, S., Poinar, H.N., Serre, D., Jaenicke-Després, V., Hebler, J., Rohland, N., Kuch, M., Krause, J., Vigilant, L., and Hofreiter, M., 2004. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet.* 38, 645–679.
- Pääbo, S., 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86, 1939–1943.
- Pearson, M., Cohen, D., Chavan, R. & Blouin, A. (2011) *Actinidia* is a natural host to a wide range of plant viruses. *Acta Horticulturae*, 913, 467–472.
- Peyambari, M., Warner, S., Stoler, N., Rainer, D., Roossinck, M.J., 2018. A 1,000-Year-Old RNA Virus. *J. Virol.* 93, e01188-18, /jvi/93/1/JVI.01188-18.atom.
- Piperno D.R., Flannery K.V., 2001. The earliest archaeological maize (*Zea mays* L.) from highland Mexico: new accelerator mass spectrometry dates and their implications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:2101-2103.
- Poinar, G., Poinar, R., 2005. Fossil evidence of insect pathogens. *J. Invertebr. Pathol.* 89, 243–250.
- Roossinck M.J., 2015. Evolution of Persistent Viruses in Plants, p 261-270. In C. Weaver S., Denison M., Roossinck M.J., Vignuzzi M. (ed), *Virus Evolution: Current Research and Future Directions*. Caister Academic Press/Horizon Scientific Press.
- Roossinck M.J., 2012a. Persistent Plant Viruses: Molecular Hitchhikers or Epigenetic Elements?, p 177-186. In Witzany G (ed), *Viruses: Essential Agents of Life*. Springer, Dordrecht.
- Roossinck M.J., 2012b. Plant virus metagenomics: Biodiversity and ecology. *Annu. Rev. Genet.* 46:357-367.
- Smith, O., Clapham, A., Rose, P., Liu, Y., Wang, J., Allaby, R.G., 2014. A complete ancient RNA genome: identification, reconstruction and evolutionary history of archaeological Barley Stripe Mosaic Virus. *Sci. Rep.* 4, 4003.
- Thompson, J. E., Kutateladze, T.G., Schuster, M.C., Venegas, F.D., Messmore, J.M., Raines, R.T., 1995. Limits to catalysis by ribonuclease A. *Bioorg. Chem.* 23, 471–481
- Tyerman, C., 2006. *God’s War: A New History of the Crusades*. Belknap Press, Cambridge, MA. Pp 787.

## **Sažetak**

U ovome radu navedeni su rezultati dosad provedenih istraživanja genoma biljnih virusa izoliranih iz bioarheoloških uzoraka, kao i genoma virusa izoliranih iz uzoraka pohranjenih u herbarijskim zbirkama, te njihova važnost u razumijevanju virusne evolucije i ekologije. Raspravlja se o razvoju i unaprjeđenju metoda istraživanja drevnih biljnih virusa te o potencijalnim implikacijama takvih istraživanja u kontekstu agronomije i gospodarstva.

Ključne riječi: metagenomika, evolucija, visokoprotlačno sekvenciranje

## **Summary**

This paper presents the results of research conducted so far on plant virus genomes isolated from bioarchaeological samples, as well as virus genomes isolated from samples stored in herbarium collections, and their importance in understanding viral evolution and ecology. The development and improvement of research methods for ancient plant virus analyses and the potential implications of such research in the context of agronomy and economics are discussed.

Keywords: metagenomics, evolution, high-throughput sequencing