

Rastlinski virusi in njihova raznolikost

Denis Kutnjak, Nacionalni inštitut za biologijo

Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Mikro

Biologija, epidemiologija,
iskanje in zaznavanje (diagnostika)
rastlinskih virusov in bakterij.

www.nib.si

GSO

Zaznavanje gensko
spremenjenih organizmov,
meroslovje (nukleinskih kislin).

www.nib.si

Omike

Interakcije med mikrobi in rastlinami,
odziv rastlin na okužbo,
sistemsko biologija.

www.nib.si

Kaj so virusi?

Virusi na rastlinah

Odnos: virus - rastlina

Kako jih raziskujemo?

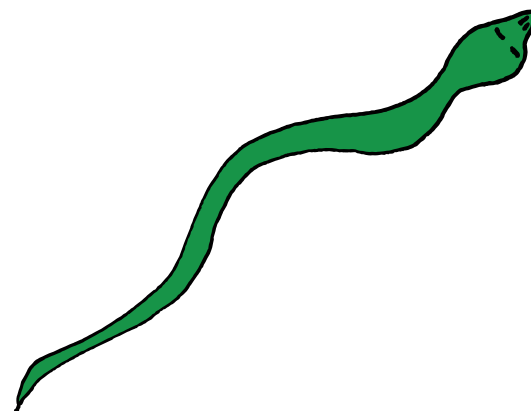
Raznolikost in evolucija

Kaj so virusi?

Beseda *virus* izhaja iz latinščine.

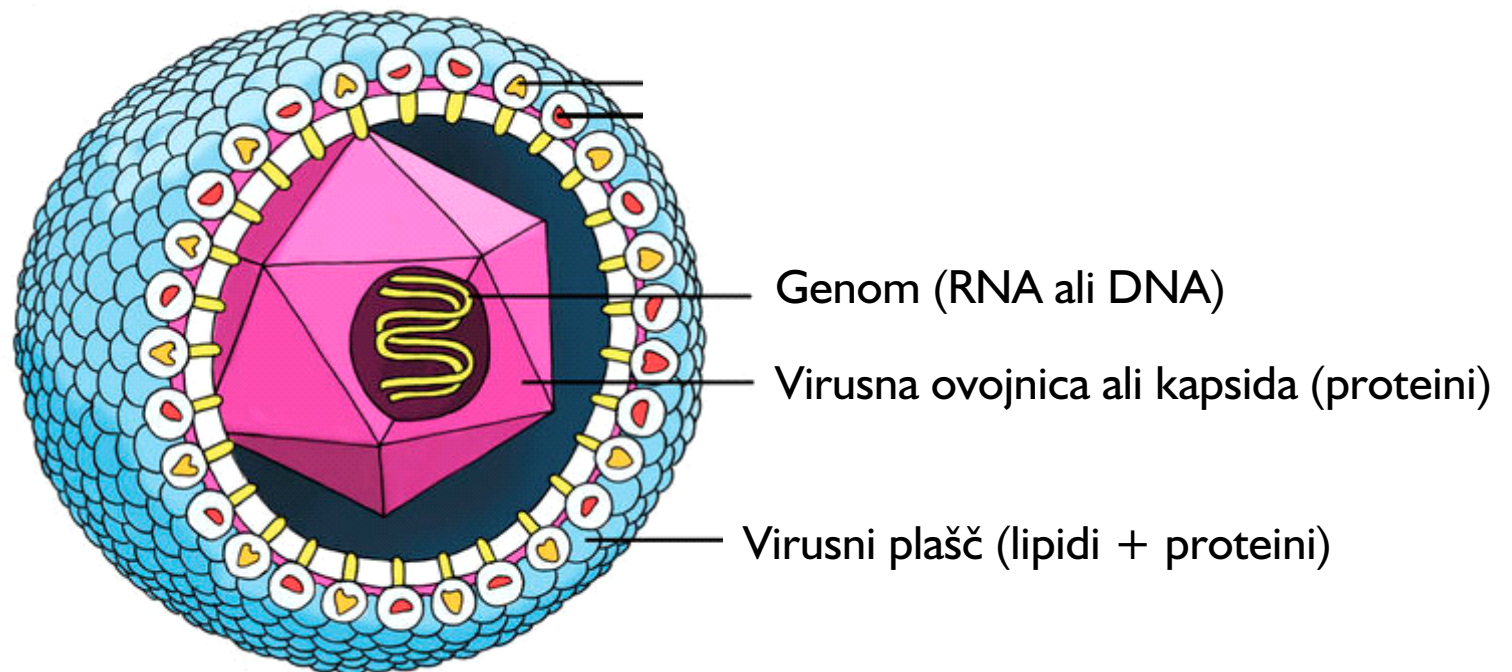
Imela je dvojen paradoksalen pomen (strup kače, ki konča življenje / semenska tekočina živali, ki življenje začne).

Kasneje je skozi stoletja označevala neko nevidno kužno, strupeno tekočino ali snov.



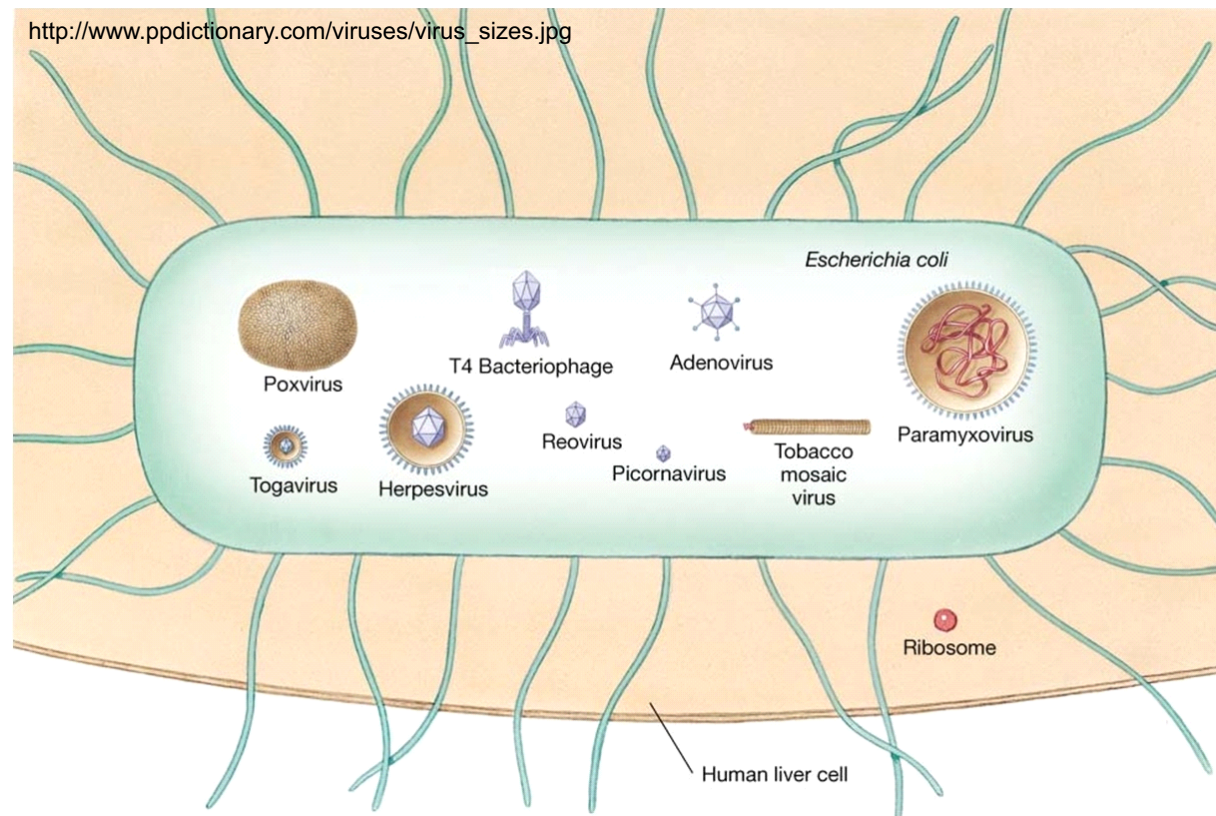
Kaj so virusi?

Danes viruse opisujemo kot infektivne delce, ki vsebujejo nukleinske kisline in proteinsko ovojnico, včasih tudi virusni plašč.



Kaj so virusi?

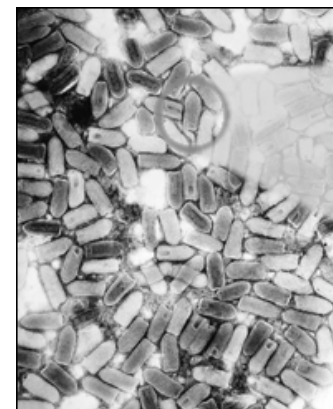
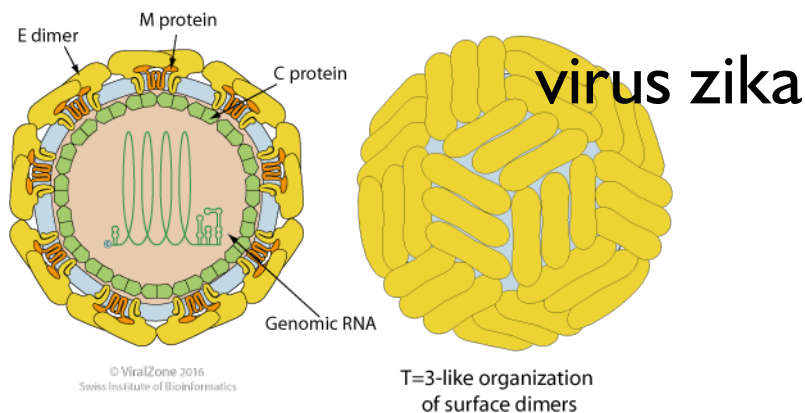
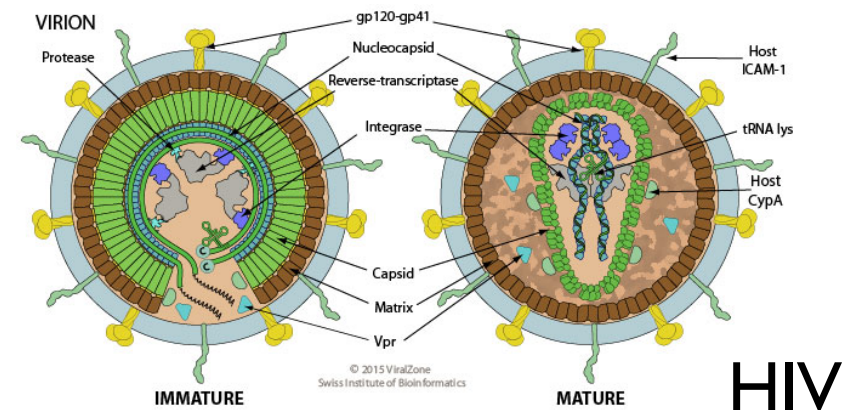
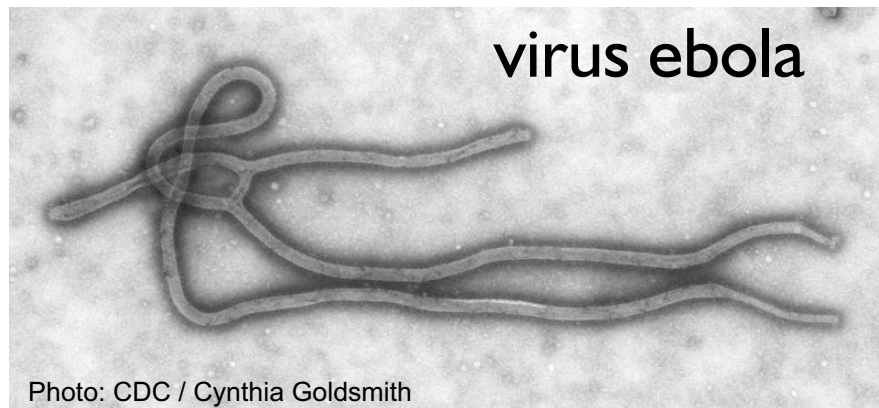
Biološki nanodelci.



1 zrno soli / 10 celic / 100 bakterij / 1000 virusov

Kaj so virusi?

Pomembni patogeni.
Najbolj poznani so virusi, ki okužujejo ljudi.



virus stecline

Kaj so virusi?

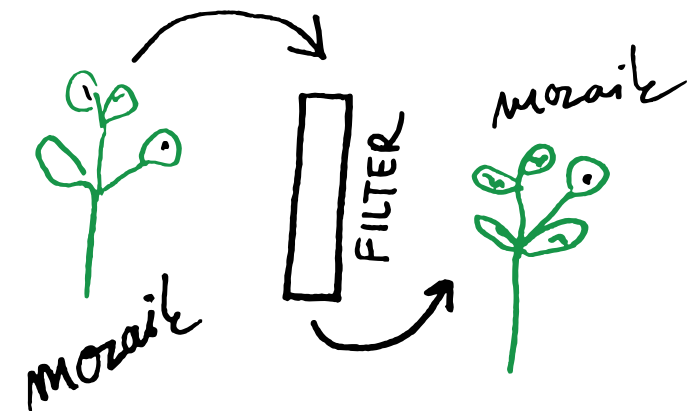
Prvi odkriti virus je bil rastlinski virus: **virus mozaika tobaka.**

1892: Ivanovsky: povročitelj mozaika na tobaku je manjši od bakterij

1898: Beijerinck: začne uporabljati izraz virus

1935: Stanley: prva kristalizacija virusa

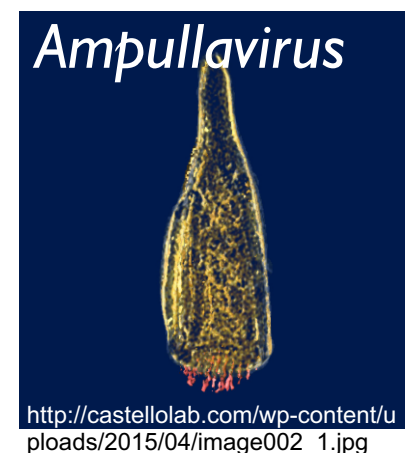
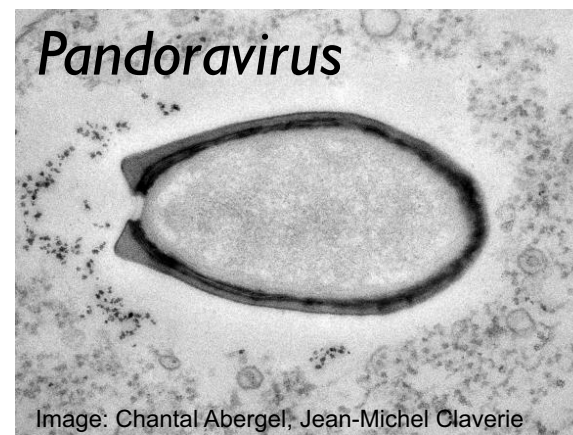
1939: prva slika virusa pod elektronskim mikroskopom



Kje najdemo viruse?

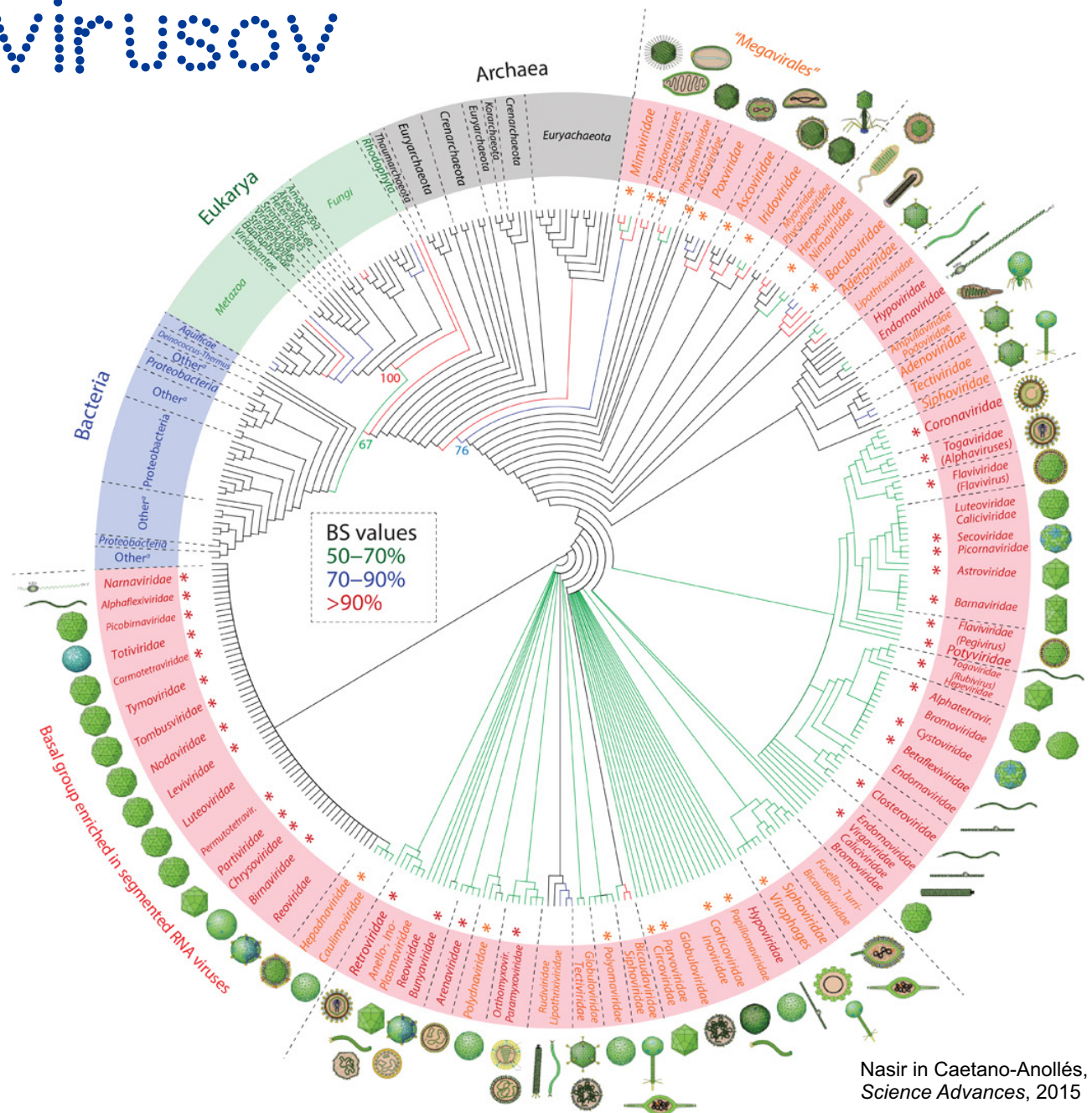
Viruse najdemo v:

glivah, rastlinah,
živalih, ljudeh,
bakterijah, arhejah,
virusih,
rekah, morjih, oblakih,
arktičnem ledu,
globoko pod zemeljsko skorjo...



Raznolikost virusov

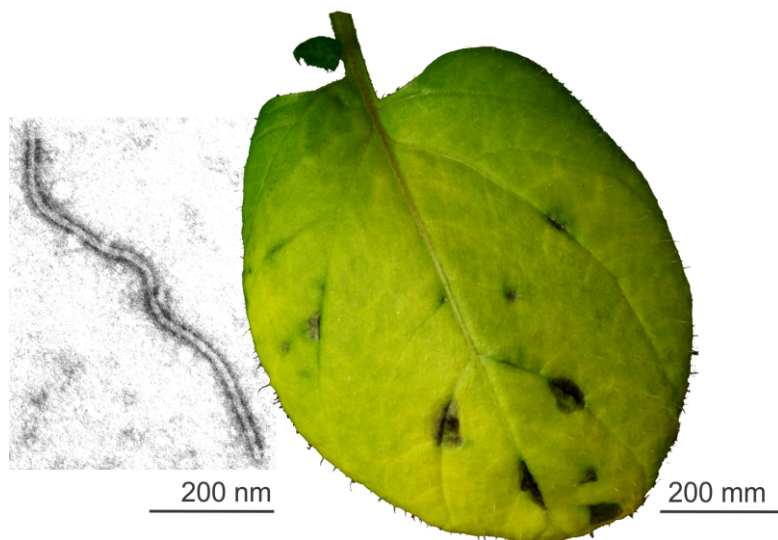
Najbolj raznoliki in najpogostejši biološki subjekti.



Virusi, ki okužujejo rastline

Trenutno poznamo več kot 1000 vrst virusov, ki okužujejo rastline.

Skozi čas prepoznani predvsem kot škodljivci, danes se prepoznavajo tudi drugi tipi odnosov.

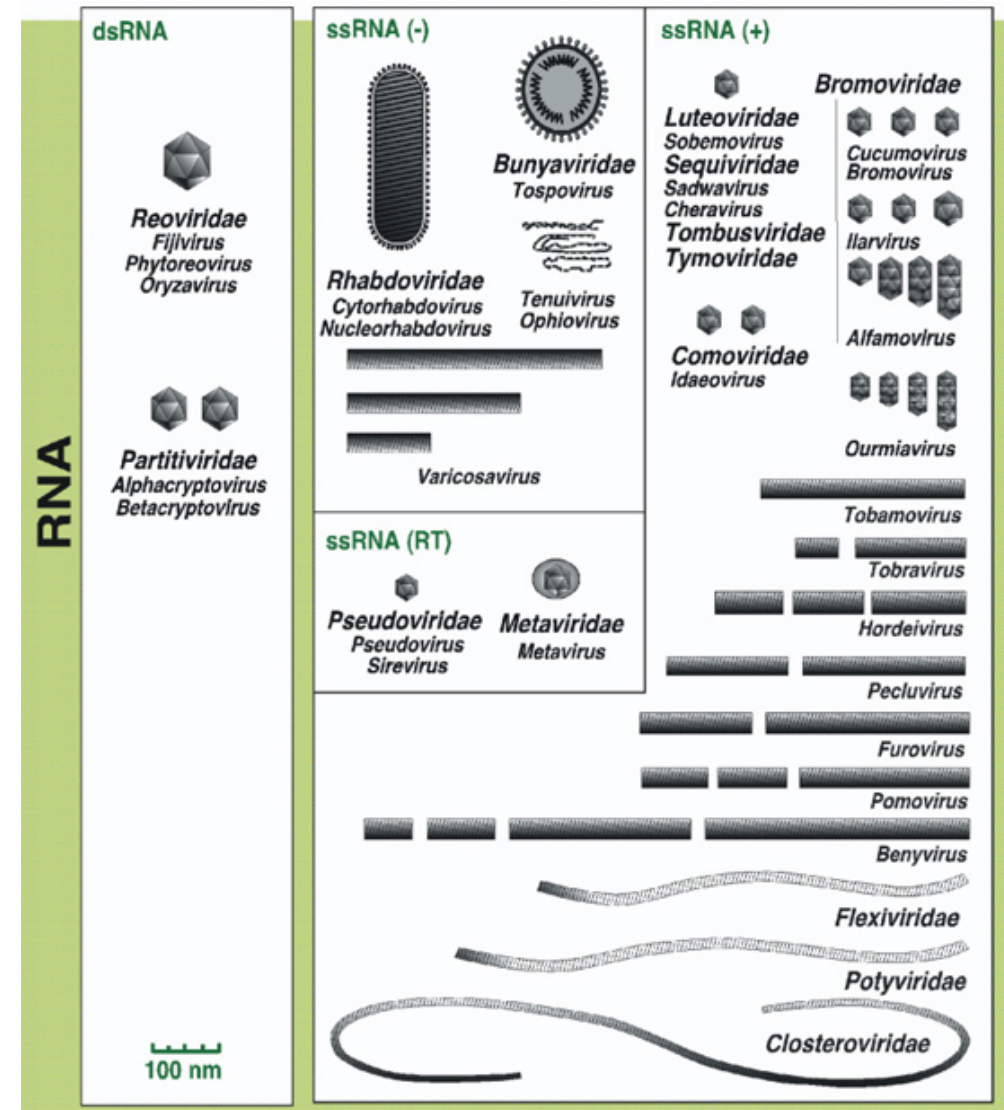
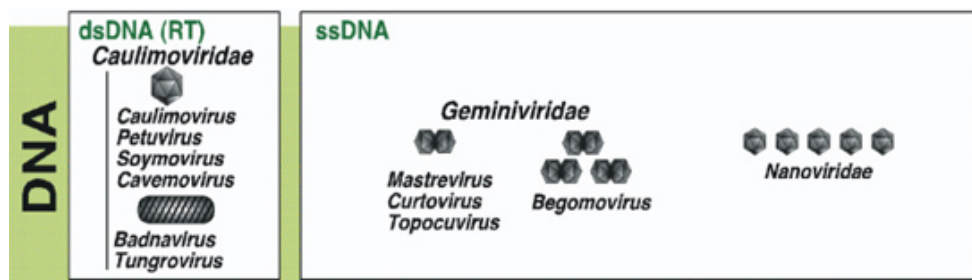


Virusi, ki okužujejo rastline

V glavnem majhni genomi.

Raznoliki oblik,
pogosto paličasti ali nitasti.

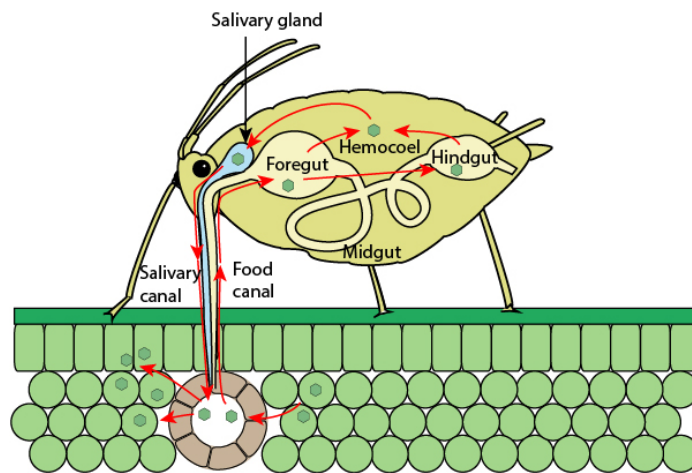
Pogostejši so RNA virusi.



Virusi, ki okužujejo rastline

Nimajo posebnega mehanizma za vstop v rastlinske celice.

Vstop s prenašalci (npr. žuželkami) ali skozi mesta ranitve.



http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/3738.html



R. Ford, <http://www.apsnet.org/>

Virusi in bolezni rastlin

Povzročajo bolezni rastlin.
Izguba pridelka ali nižja kakovost pridelkov.

Ekonomska škoda - ocena:
15-45 milijard \$ letno.

Problemi, povezani z dejavnostmi ljudi:
 uvedba novih virusov ali
njihovih prenašalcev na nova območja,
globalno segrevanje.

virus Y krompirja

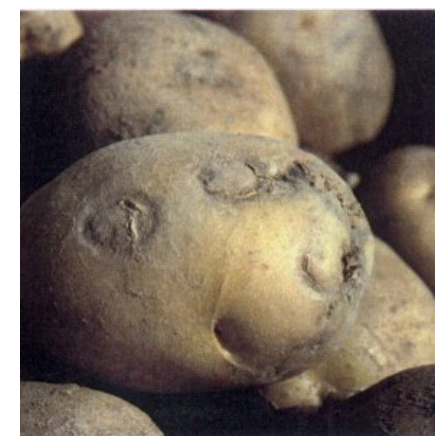
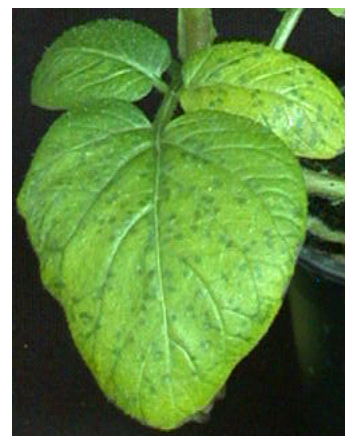
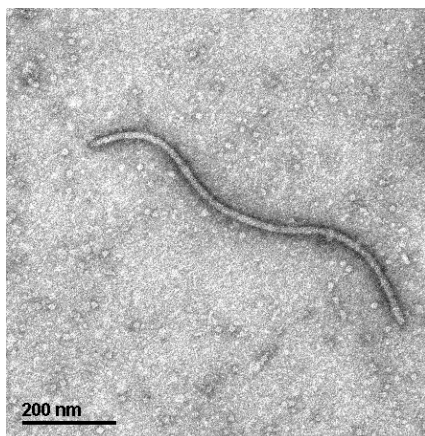


virus mozaika kasave



Virusi in boleznih rastlin

Virus Y krompirja



Razlog za prenehanje gojenja priljubljenega kultivarja Igor.



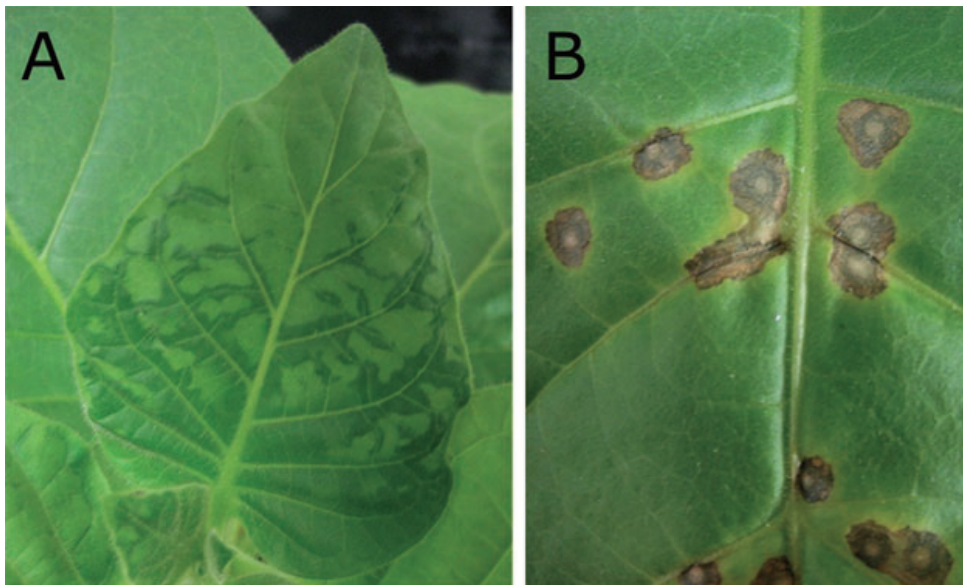
Povzročča obročaste nekroze krompirja.

Virusi in bolezni rastlin

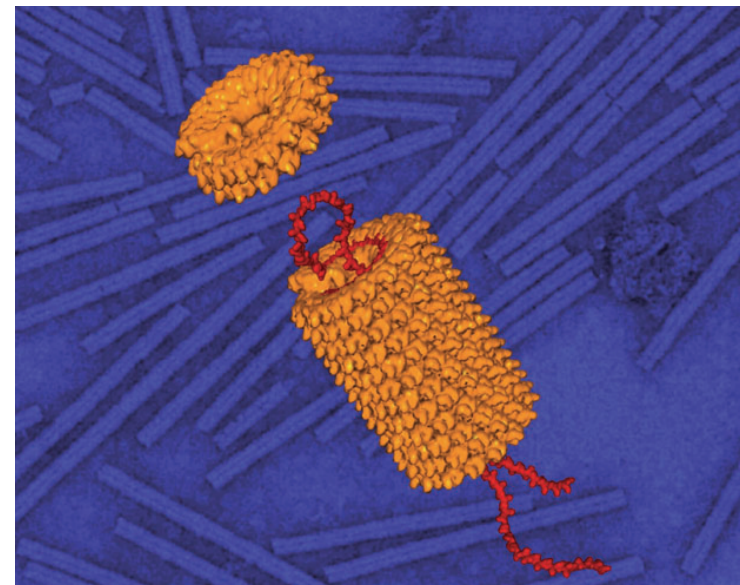
Virus mozaika tobaka

Prvi odkrit virus.

Pogosto uporabljen kot model za raziskave.



Scholthof et al., *Molecular Plant Pathology*, 2011



Scholthof et al., *Molecular Plant Pathology*, 2011

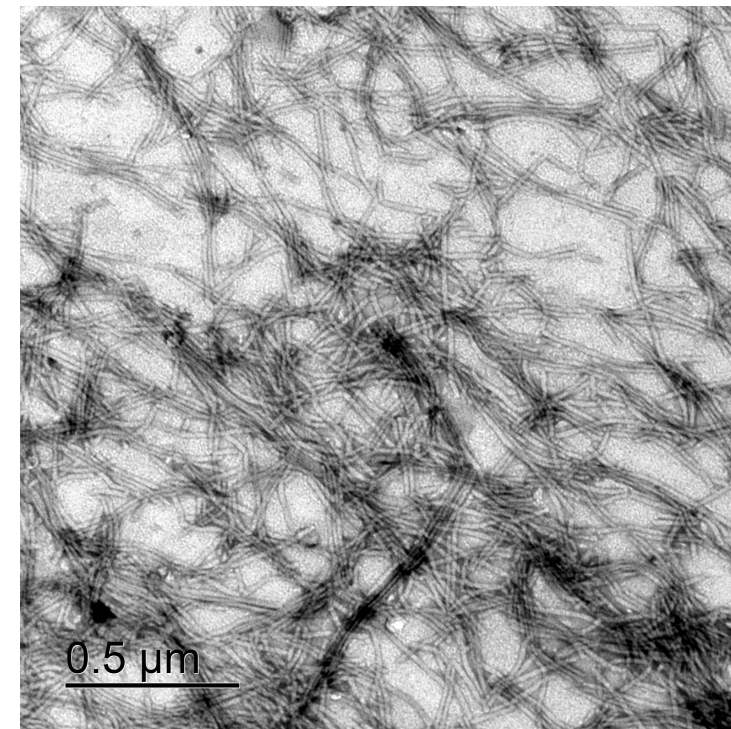
Virusi in bolezni rastlin

Virus mozaika pepina

Odkrit: 1980 (Peru).

Porajajoči se patogen na paradižniku.

Prvič zaznan v Evropi: 1999.

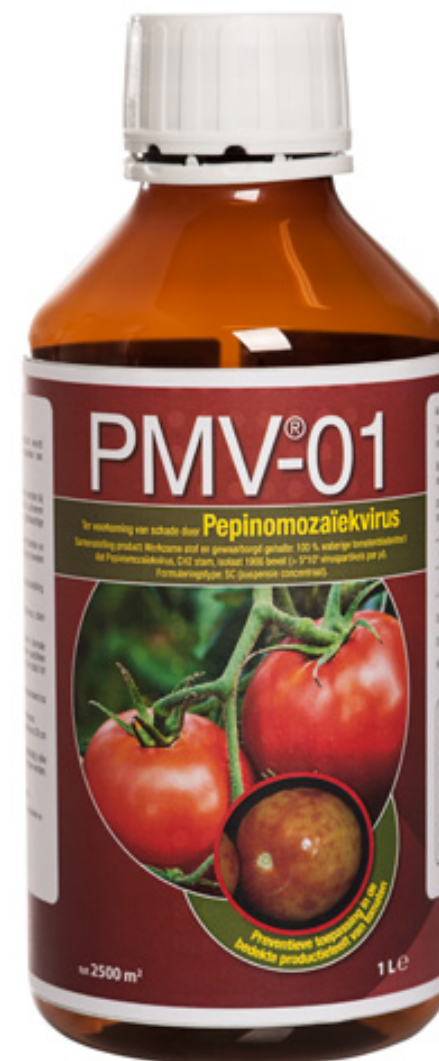


Virusi in bolezni rastlin

Virus mozaika pepina

Cepiva za rastline:
navzkrižna zaščita.

Rastline okužene
z milim različkom virusa
niso dovzetne
za agresivne različke.



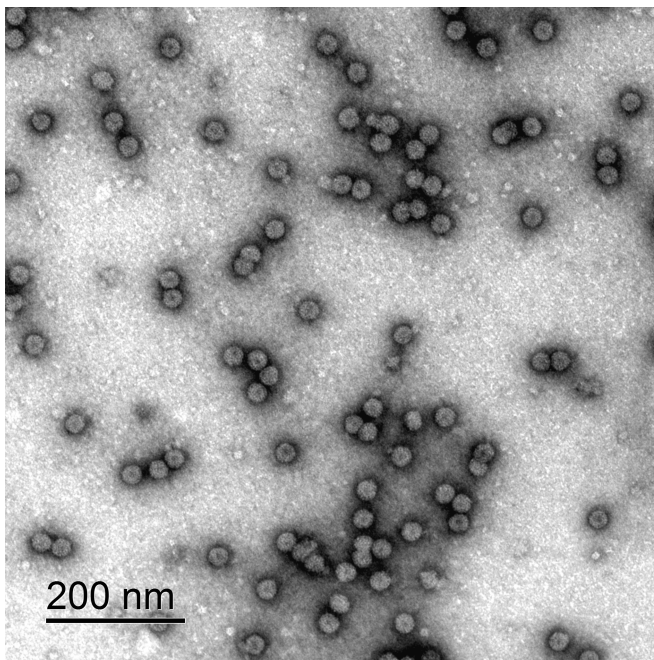
Virusi in bolezni rastlin

Virus mozaika kumare

Znanih je preko 1200 vrst gostiteljev iz več kot 100 družin rastlin.

Lahko povzroči visoke izgube pridelkov (tudi 80-100%).

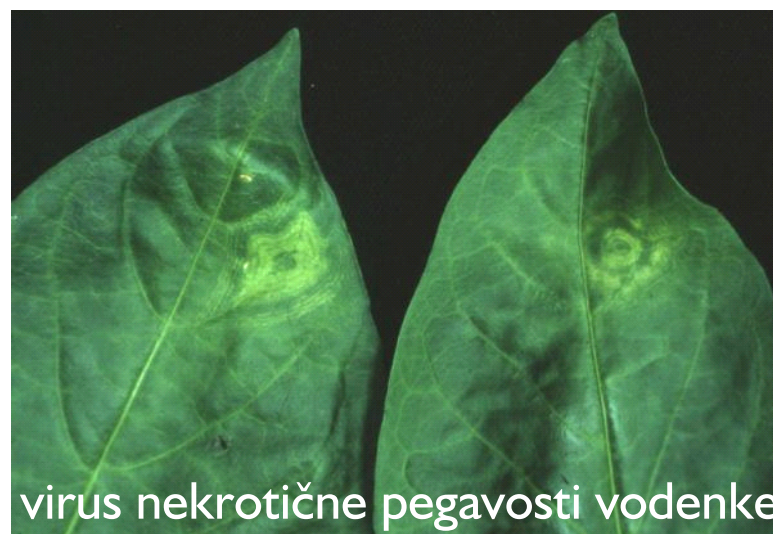
Satelitna RNA lahko ojača simptome.



Courtesy T.A. Zitter, <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/Cucumbermosaic.aspx>

Virusi in bolezni rastlin

Tospovirusi



Virusi in bolezni rastlin

Virus lisavosti in pritikavosti jajčevca



Virusi in bolezni rastlin

Virus mile isavosti paprike

Pomemben patogen paprike.

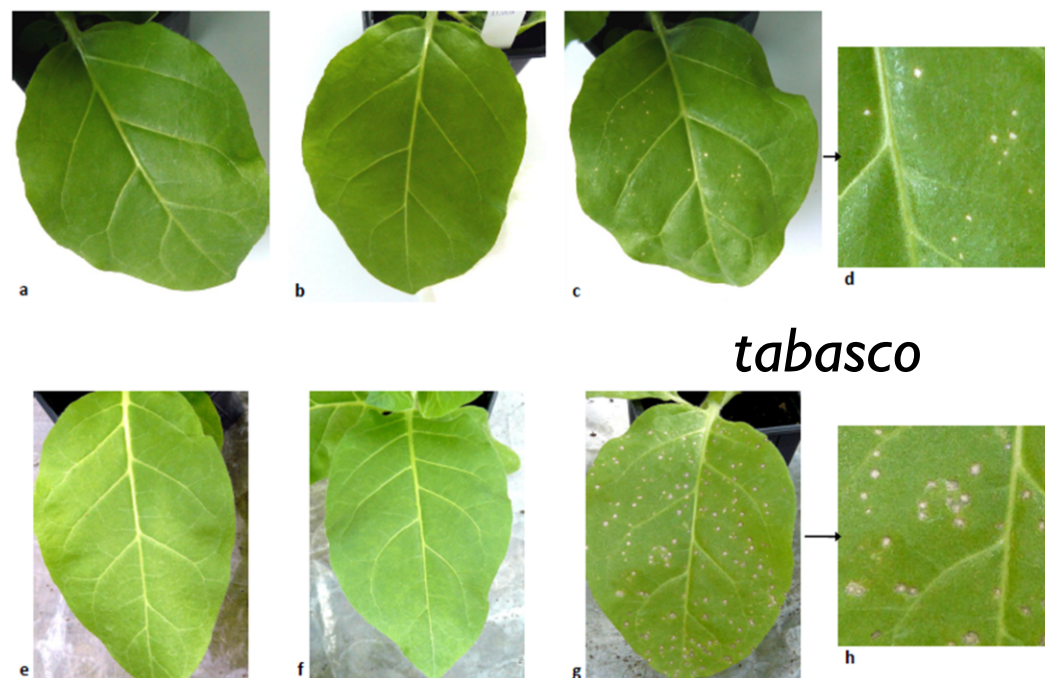


Virusi in bolezni rastlin

virus mile lisavosti paprike

Virusi iz rodu *Tobamovirus* so zelo stabilni v okolju.

Najdemo ga v večini izdelkov iz paprike in čilija.



Preživi, tudi če ga pojemo.

Colson et al., Plos One, 2010

Indikator fekalnega onesnaženja v vodi.

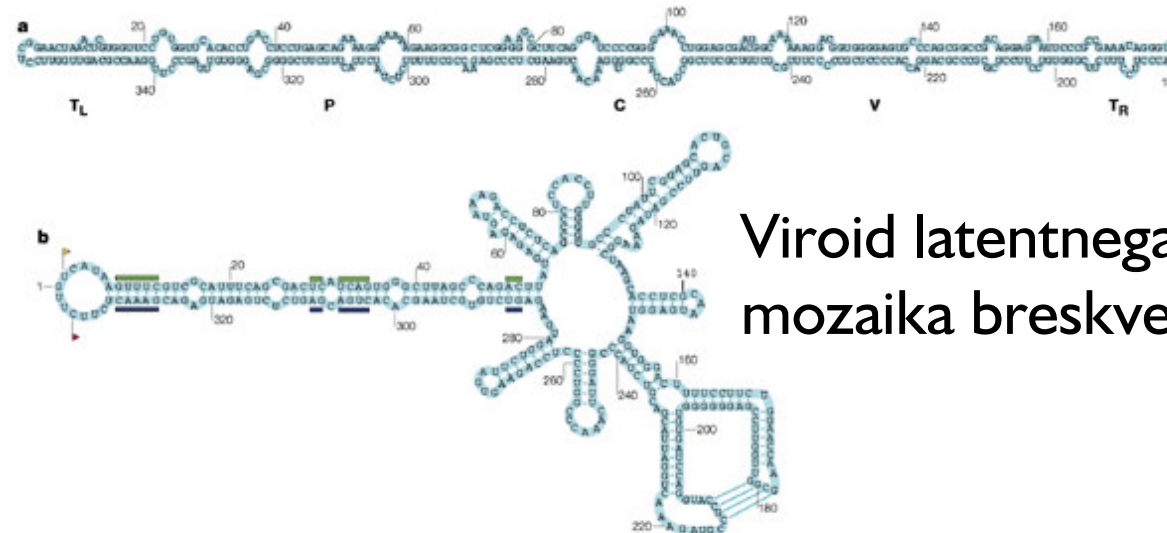
Viroidi

Enostavnejši od virusov.

Le kratke molekule RNA, ne kodirajo proteinov.

Lahko povzročijo bolezenske simptome.

Viroid vretenatosti gomoljev krompirja



Viroid latentnega
mozaika breskve

Viroidi

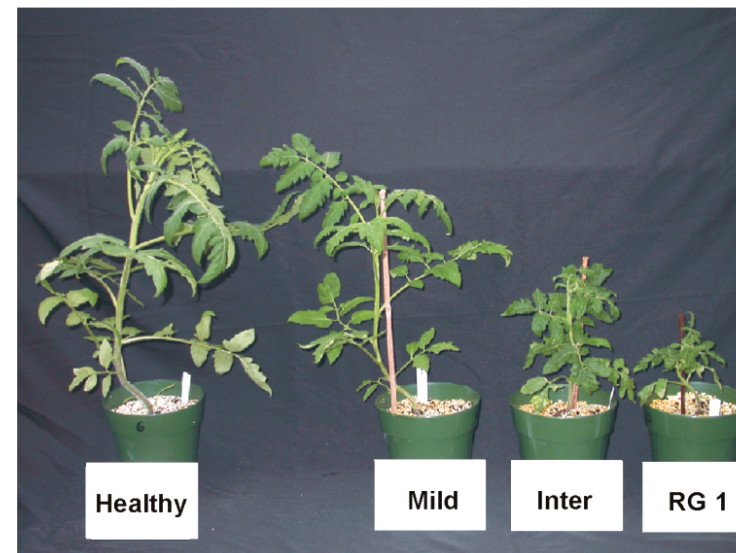
Viroid vretenatosti gomoljev krompirja

Povzroča deformacije
gomoljev krompirja.



Courtesy S.A. Slack. Reproduced from O.W. Barnett and J.L. Sherwood, eds. 2009. *Virus Diseases of Plants: Grapevine, Potato, and Wheat Image Collections and Teaching Resource CD*

Bolezenski znaki
na paradižnikih.



Courtesy R.A. Owens, copyright-free

Viroidi

Viroid prilikavosti krizantem

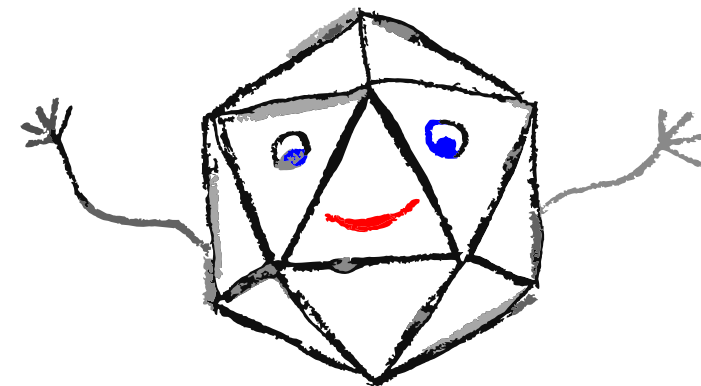


Virusi, prijatelji ali sovražniki?

Virusi ne povzročajo nujno bolezenskih znamenj.

Pozitiven vpliv na preživetje rastline?

Prenos genskega materiala med organizmi / vrstami.



Virusi, prijatelji ali sovražniki?

Primer pozitivne interakcije virus - gliva - rastlina

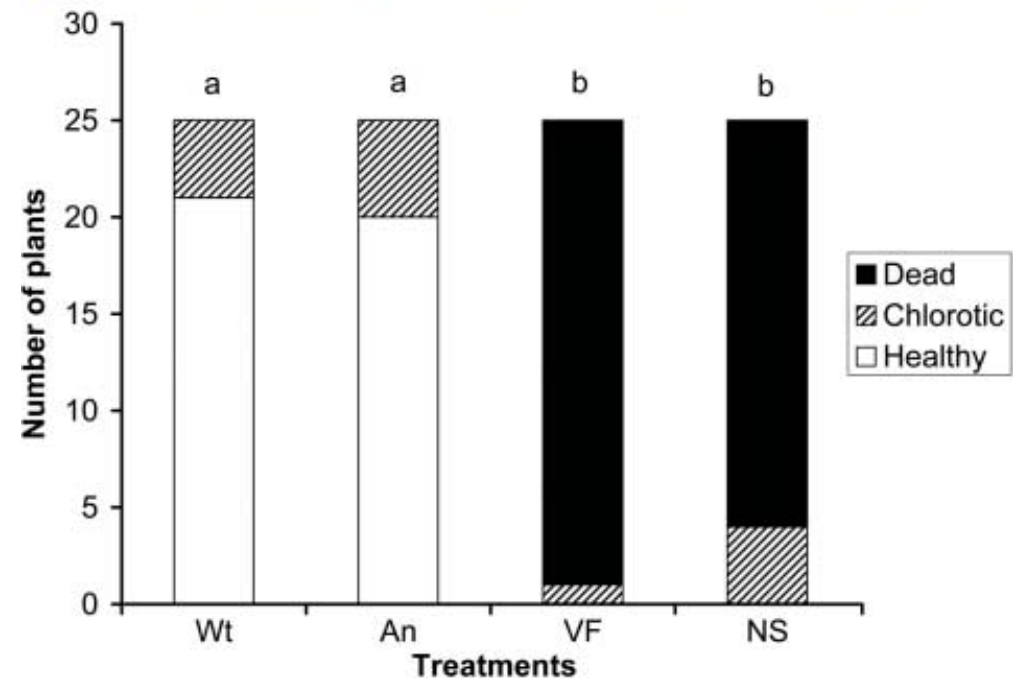
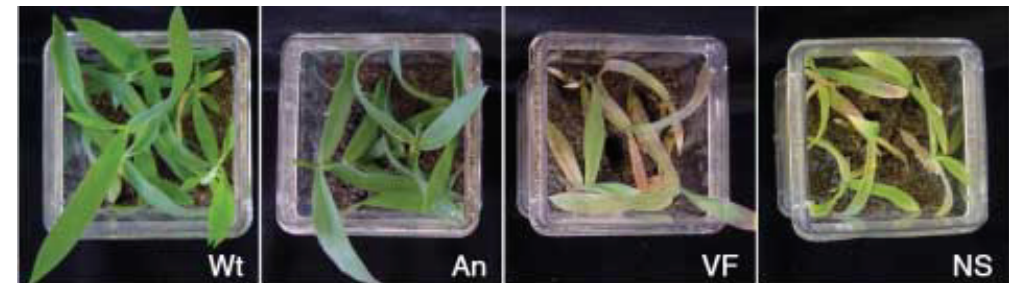


Yellowstone National Park
Dichanthelium lanuginosum:
ob vročih izviroh,
rastline odporne
na vročino, do 65 °C.

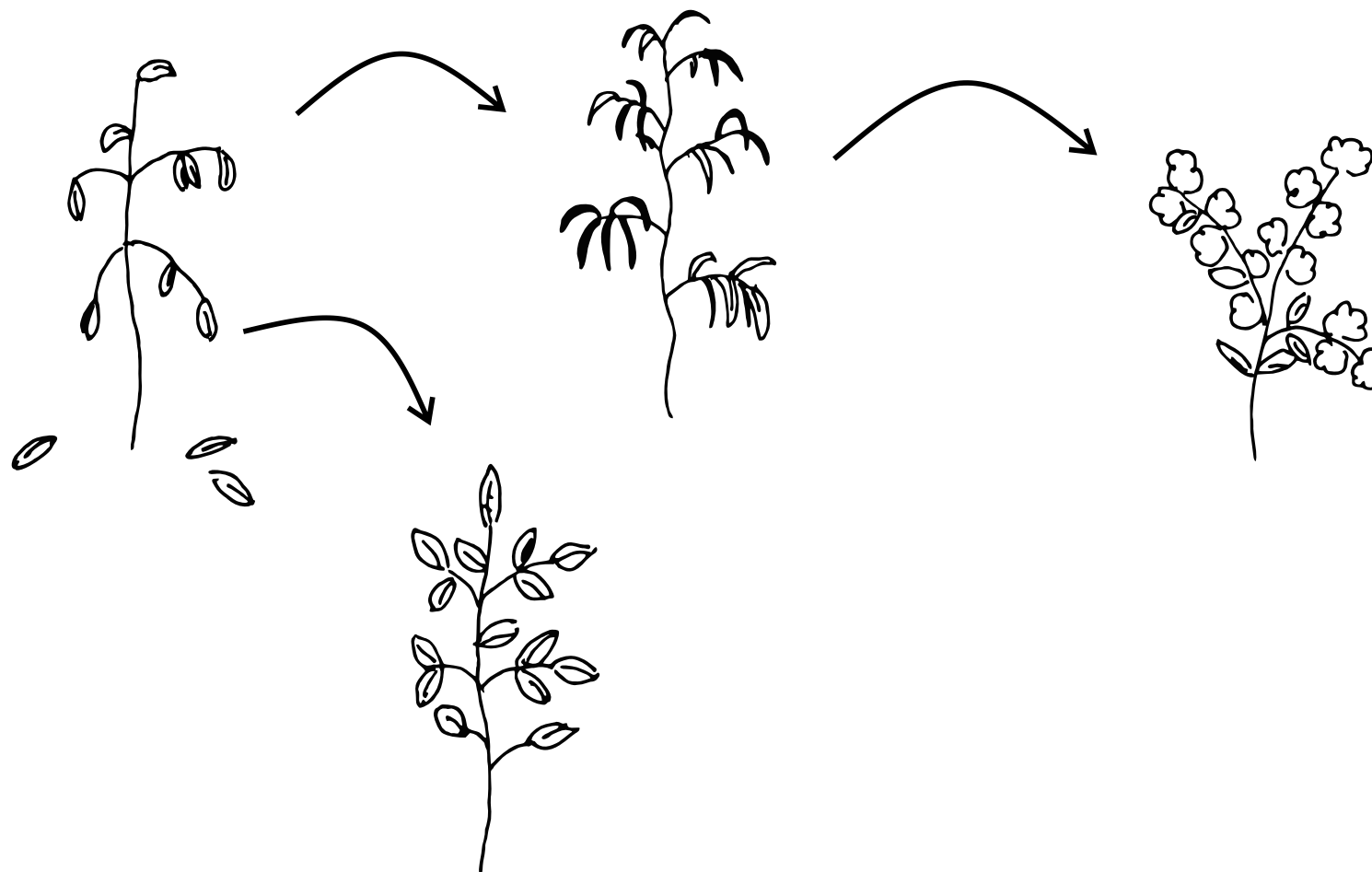
Virusi, prijatelji ali sovražniki?

Primer pozitivne
interakcije
virus - gliva - rastlina

Rastline so odporne
na vročino, le kadar so
okužene z glivo, ki je
okužena z virusom.



Kako se virusi prenašajo med rastlinami?



Kako se prenašajo?

Prenos z dotikom - ranitvijo (mehansko).



<http://centredejardinbrossard.com/>



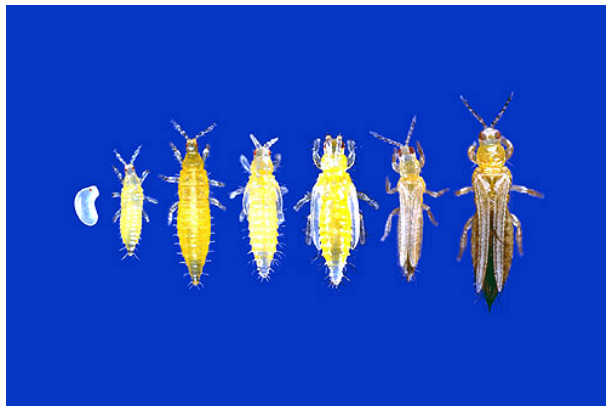
<http://www.tomatodirt.com/pruning-tomato.html>



Orodja, kmetijska mehanizacija, obutev...

Kako se prenašajo?

Prenos s prenašalci - žuželkami.



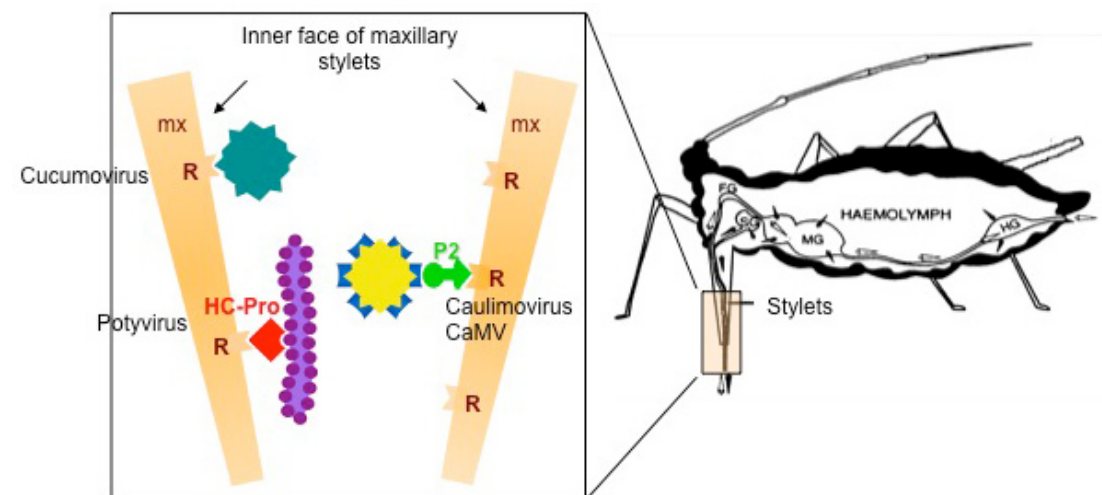
Courtesy D. Ullman; Reproduced from Lewis, T. (ed.) 1997. Thrips as Crop Pests. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TomatoSpottedWilt.aspx>



David Cappaert, Bugwood.org

Persistenten/
nepersistenten prenos

Vezava na receptorje.



http://umr-bgpi.cirad.fr/image/01_equip/es/equipe2/uzest-fig1.uk.jpg

Kako se prenašajo?

Prenos s prenašalci - žuželkami.

Virus lahko spremeni okužene rastline, tako da privabljajo prenašalce in opraševalce: barva, vonj.

Okužene rastline lahko privabljajo opraševalce.



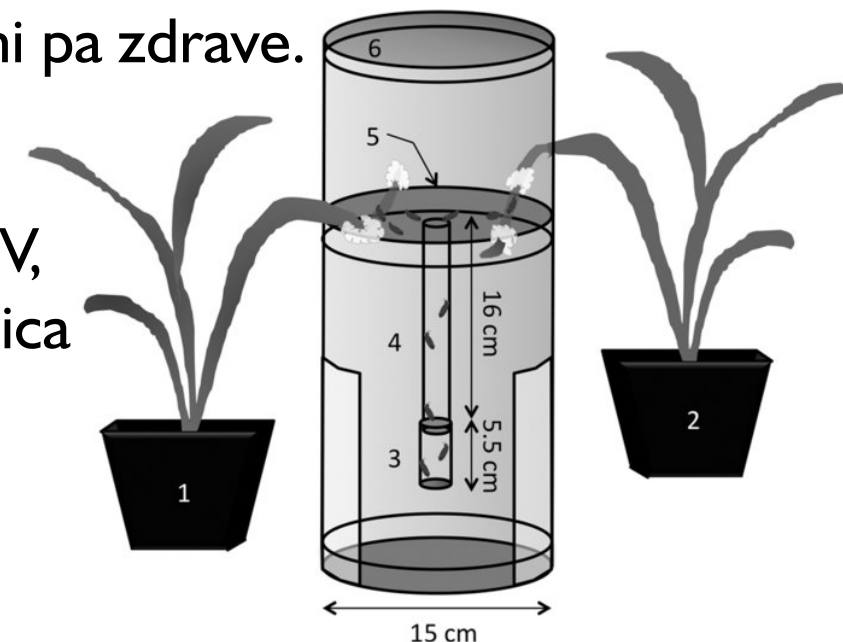
CMV,
padadižnik, čmrlji

<http://www.cam.ac.uk/research/news/virus-attracts-bumblebees-to-infected-plants-by-changing-scent>

Groen et al., *Plos Pathogens*, 2016

Neokuženi prenašalci bolj pogosto izbirajo okužene rastline, okuženi pa zdrave.

BYDV,
pšenica



Ingwell et al., *Scientific Reports*, 2012

Kako se prenašajo?

Prenos s prenašalci - glive, nematodi,
parazitske rastline...

Prenos z nematodi: npr. Nepovirusi



Howard Ferris, <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/Taxadata/G143S3.HTM>



<http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/images/Fieldtrip2012/232.JPG>

virus pahljačavosti
listov vinske trte

Prenos preko
parazitskih rastlin



Cuscuta sp.

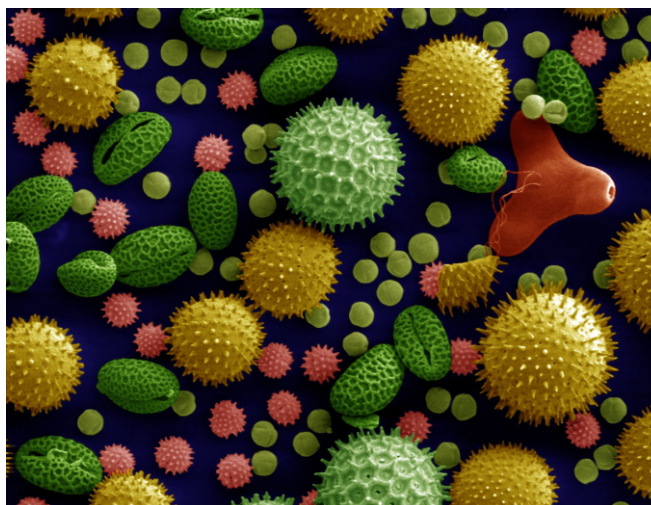
Michael Becker,
<https://en.wikipedia.org/wiki/Cuscuta>

Kako se prenašajo?

Prenos na
daljše razdalje:
z vodo,
vetrom,
pelodom,
semeni...



<http://modernfarmer.com/2013/07/5-public-libraries-that-have-gone-to-seed-libraries/>



Louisa Howard, Charles Daghlian,
Dartmouth Electron Microscope Facility, Dartmouth College

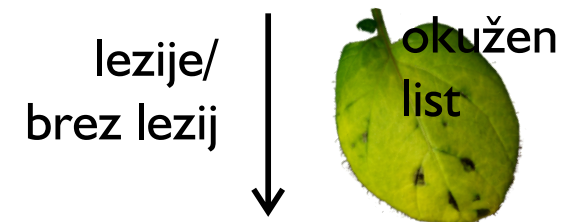
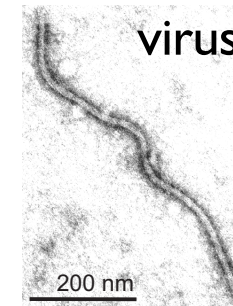


Odziv rastlin na okužbo z virusi

Rastline se odzovejo na okužbo s spremembami metabolizma.

Odziv je odvisen od različka virusa, kultivarja rastline, okoljskih pogojev...

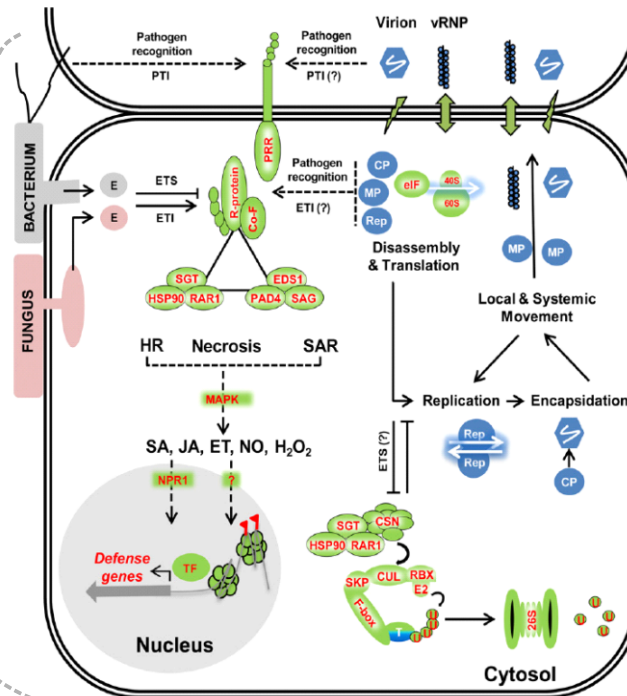
Bolezenski znaki so posledica odziva rastline in interakcije med virusom in rastlino.



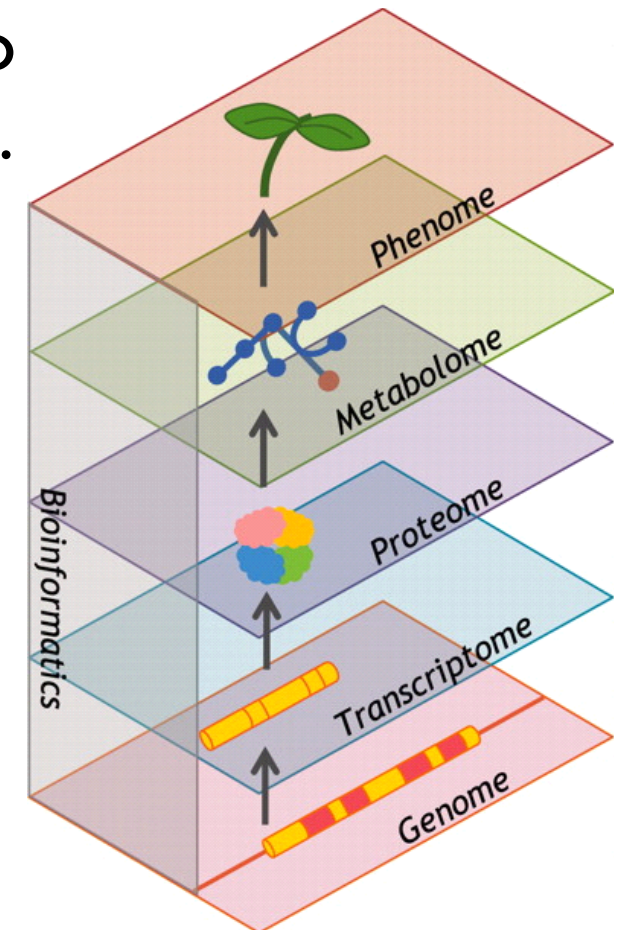
Odziv rastlin na okužbo z virusi

Odziv rastline na okužbo lahko preučujemo na več nivojih.

Kaj se dogaja v celicah?



Mandadi & Scholthof, *Plant Cell*, 2013;
Naseem et al., *Plant cell*, 2012



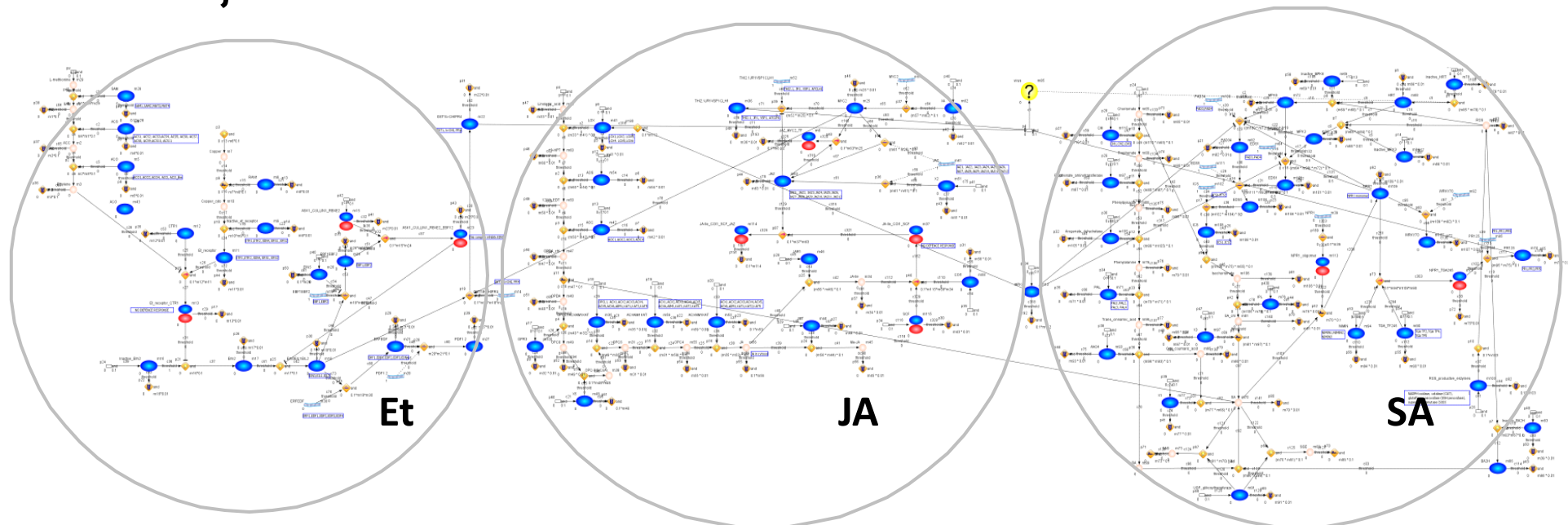
Mochida & Shinozaki, *Plant Cell Physiol*, 2010

Odziv rastlin na okužbo z virusi

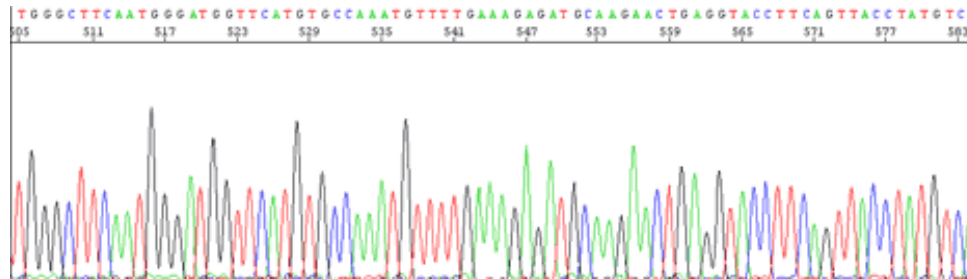
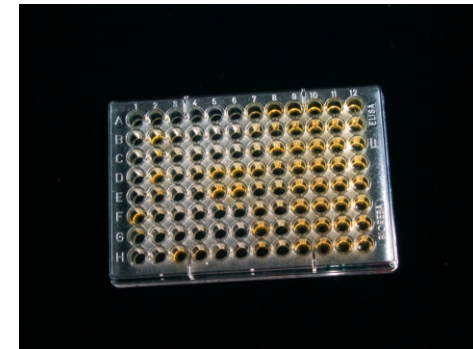
Kateri so pomembni sestavni deli
rastlinskega imunskega odziva?

Sistemska biologija

Modeliranje



Kako raziskujemo viruse?



Kako raziskujemo viruse?

Elektronski mikroskop

Vzorci presevamo s snopom elektronov.

Visoke povečave: 100.000x

Omogoča opazovanje virusnih delcev.

Različni načini priprave vzorcev.



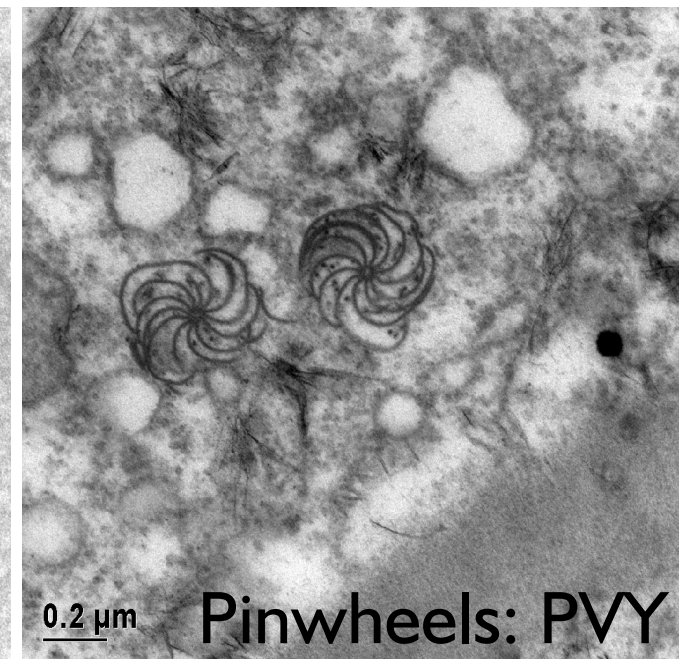
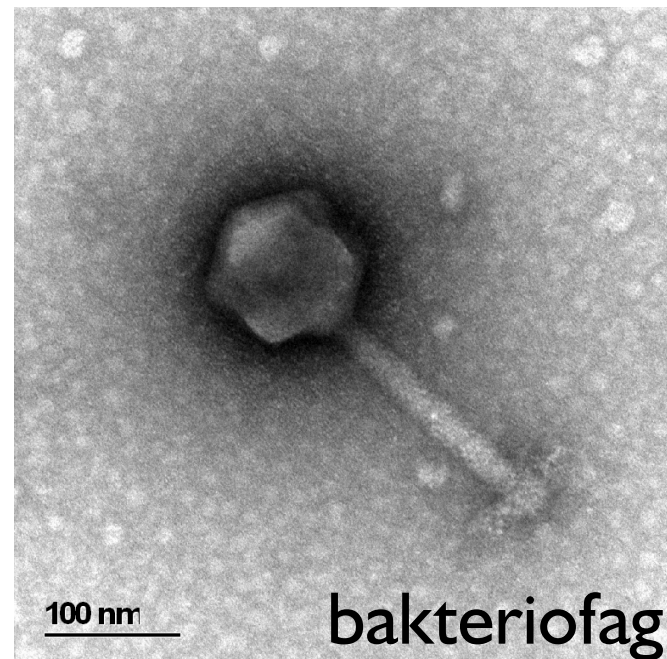
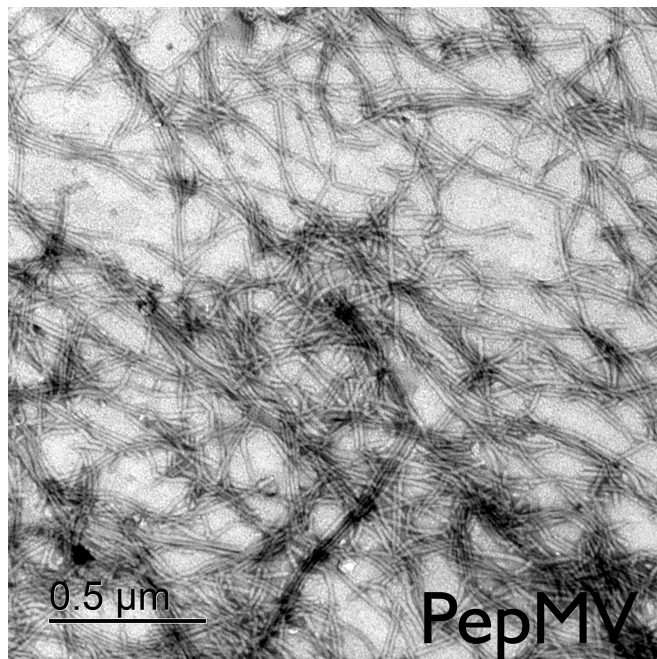
Transmisijski
elektronski mikroskop

Kako raziskujemo viruse?

Elektronski mikroskop

Opazovanje velikosti in oblike delcev omogoča določitev virusov.

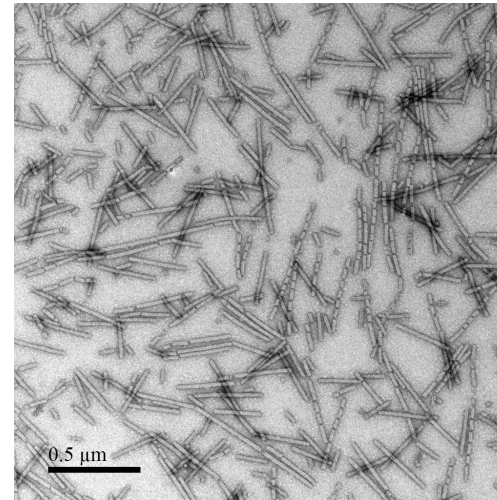
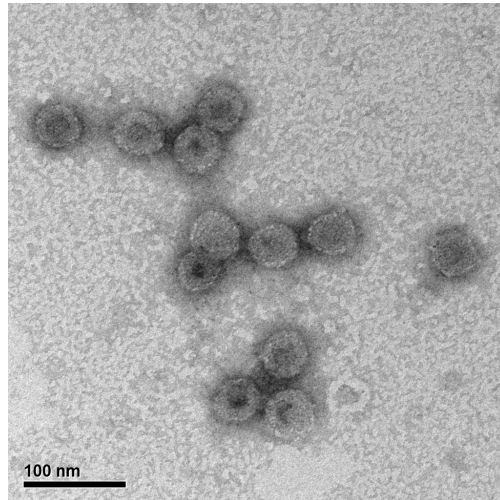
Da jih opazimo, so nujne dovolj visoke koncentracije.



Kako raziskujemo viruse?

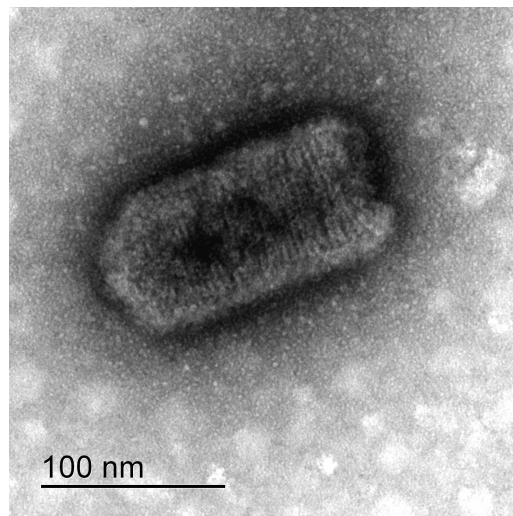
Elektronski mikroskop

virus mozaika
cvetače

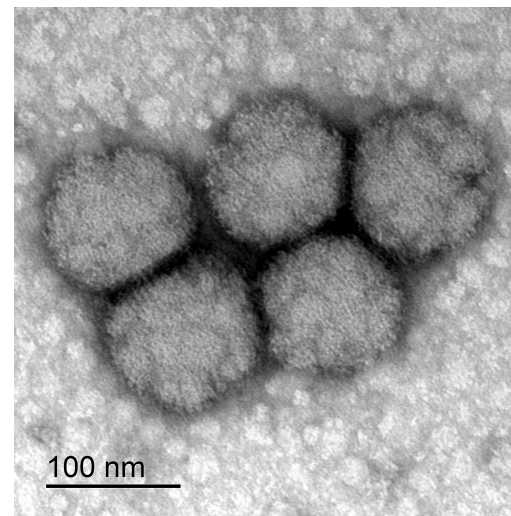


virus mozaika
paradižnika

Rhabdoviridae



Tospovirus

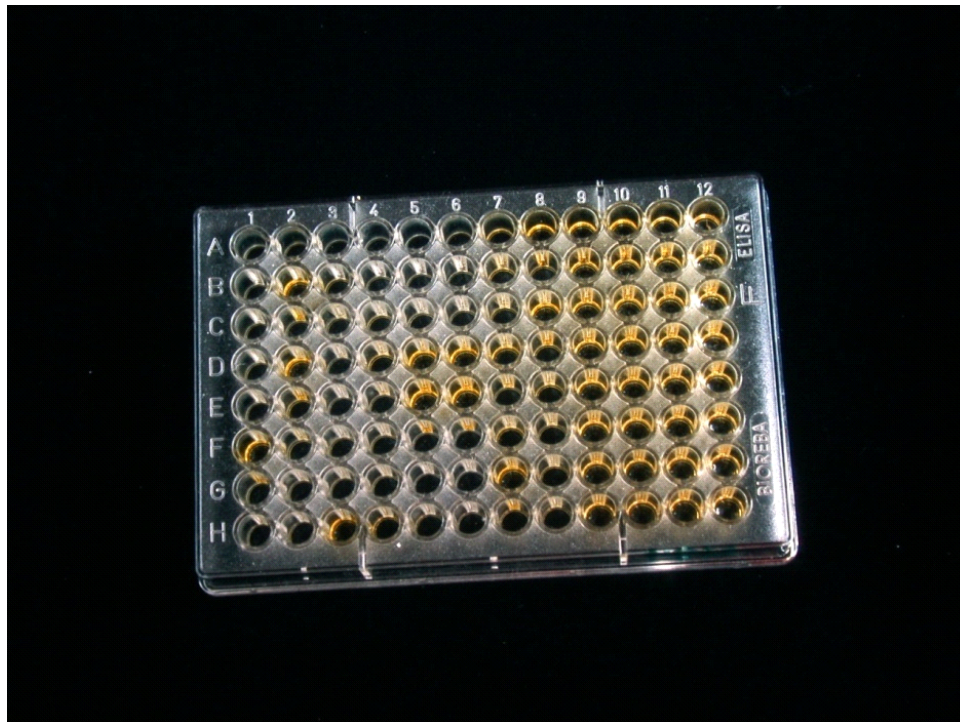


Kako raziskujemo viruse?

Serološke metode: ELISA, hitri testi

Zaznavanje virusov s pomočjo protiteles.

Ne zaznamo zelo nizkih koncentracij.

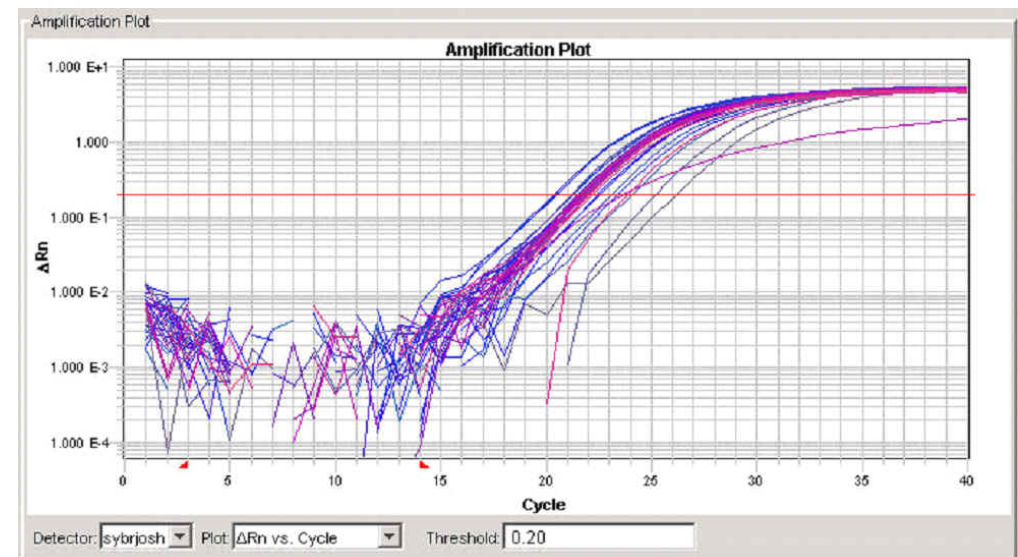
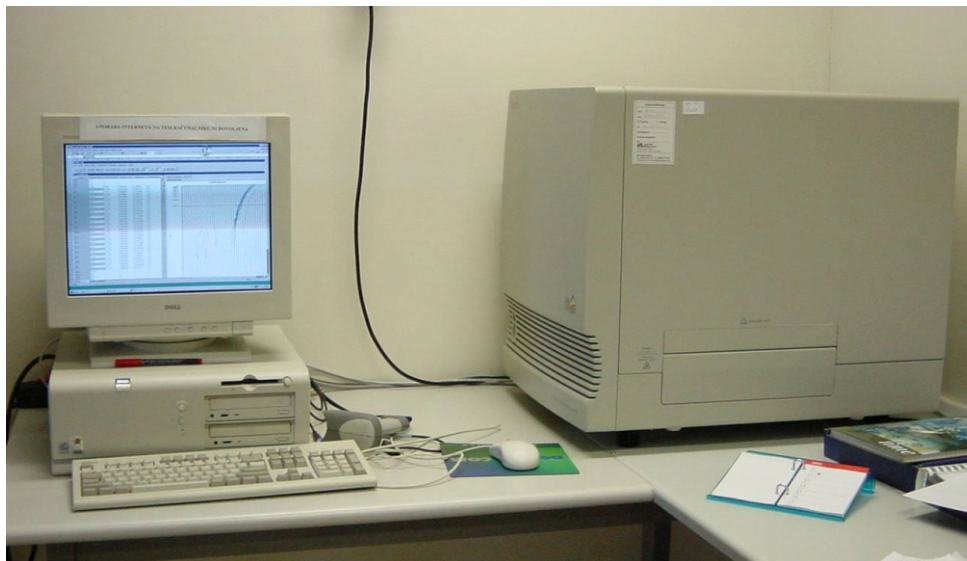


Kako raziskujemo viruse?

Verižna reakcija s polimerazo

Tarčno pomnožujemo genski material virusov.

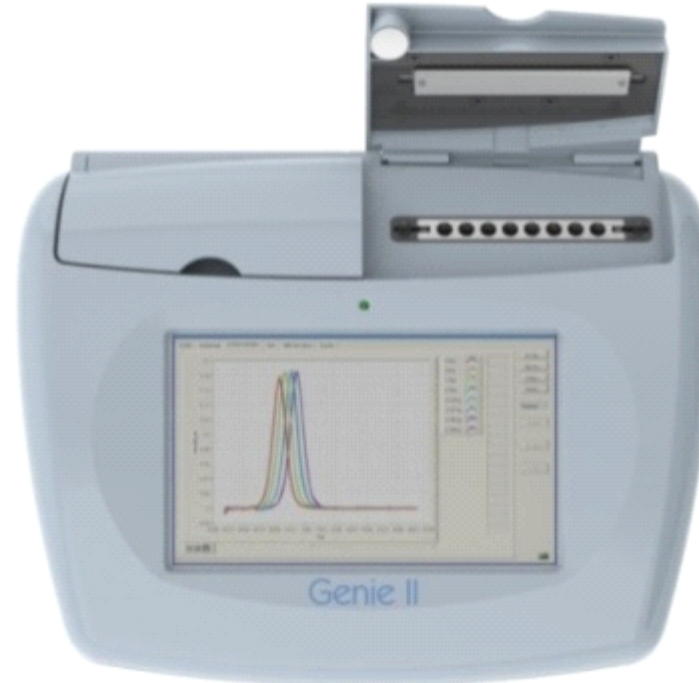
Različne izpeljanke,
kvantitativna PCR omogoča zelo visoko občutljivost.



Kako raziskujemo viruse?

Hitri molekularni testi - LAMP

Hitro pomnoževanje na isti temperaturi, rezultati: 10-20 min,
omogoča delo na terenu.



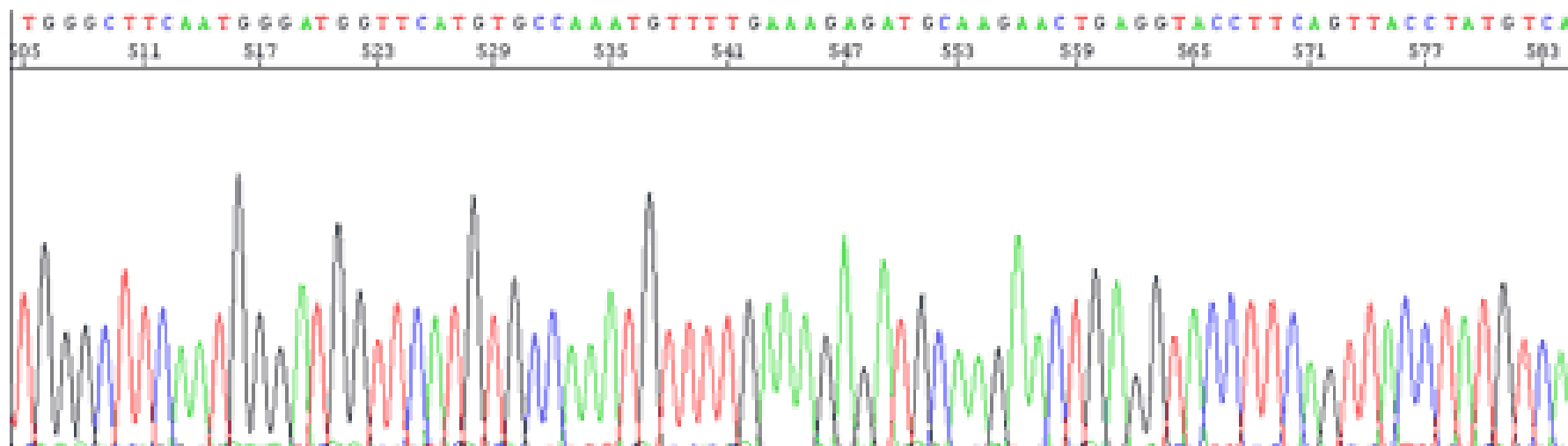
Kako raziskujemo viruse?

Določanje genoma

Virusni genomi so relativno majhni.

Omogoča študij raznolikosti.

Sanger sekvenciranje: določanje krajših pomnoženih delov.



Kako raziskujemo viruse?

Sekveniranje naslednje generacije

Pri virusih ne najdemo ohranjenih genov,
ki bi lahko služili kot markerji za njihovo detekcijo.



Hkrati lahko določimo zaporedje več sto milijonov fragmentov DNA.

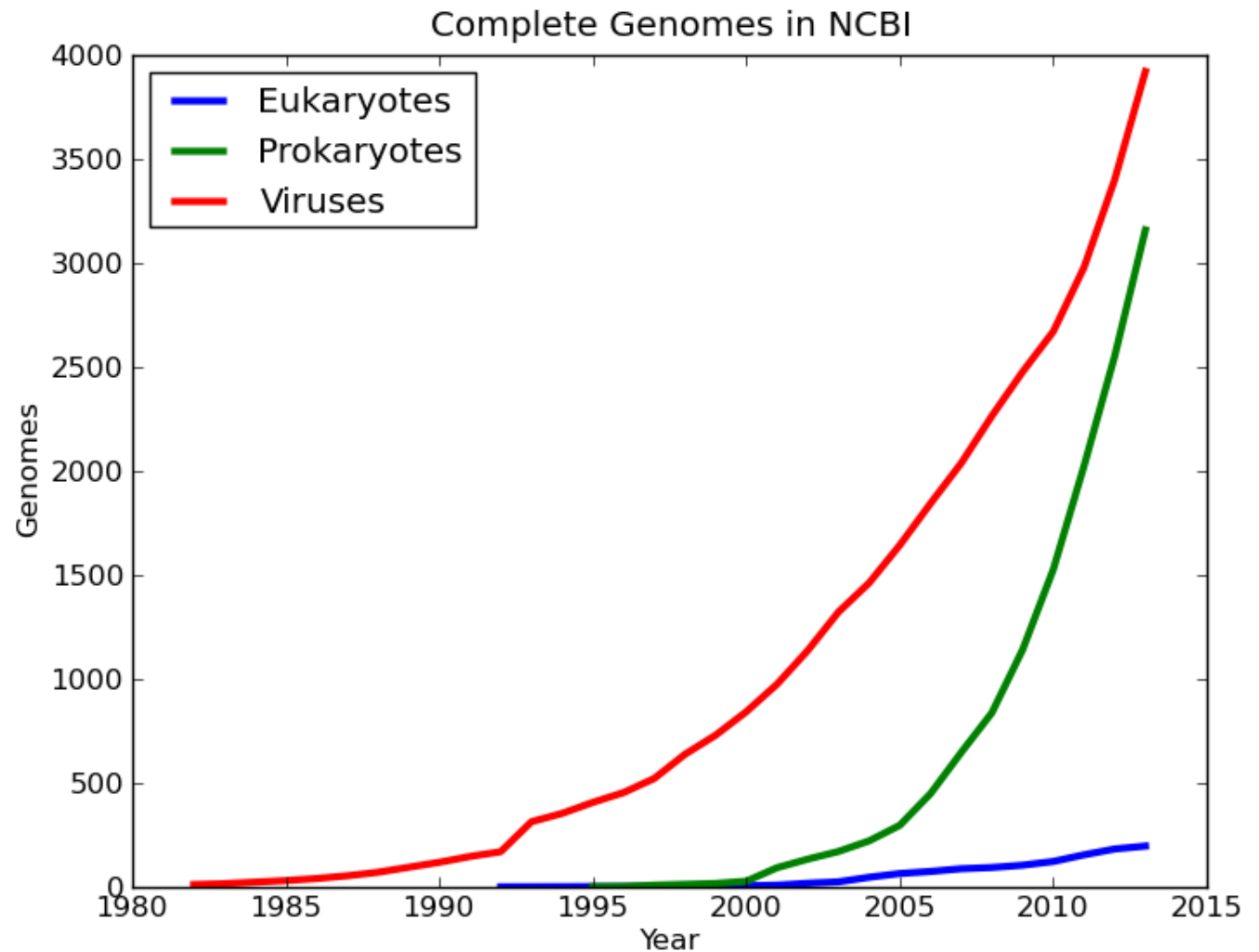
Predhodno znanje o zaporedju genoma ni potrebno.

Različne platforme: Illumina, IonTorrent, 454, PacBio, Oxford Nanopore

Kako raziskujemo viruse?

Sekveniranje naslednje generacije

Velik porast odkrivanja novih virusov.



Kako raziskujemo viruse?

Sekvenciranje naslednje generacije

Odkrivanje novih virusov.

Okoljska metagenomika: kje in katere viruse najdemo v okolju (prst, voda, zrak...)?

Epidemiologija: sledenje širjenja virusa v okolju.

Študij raznolikosti virusov.

Kako raziskujemo viruse?

Sekvenčiranje naslednje generacije

Odkrivanje novih virusov.

Okoljska metagenomika: kje in katere viruse najdemo v okolju (prst, voda, zrak...)?

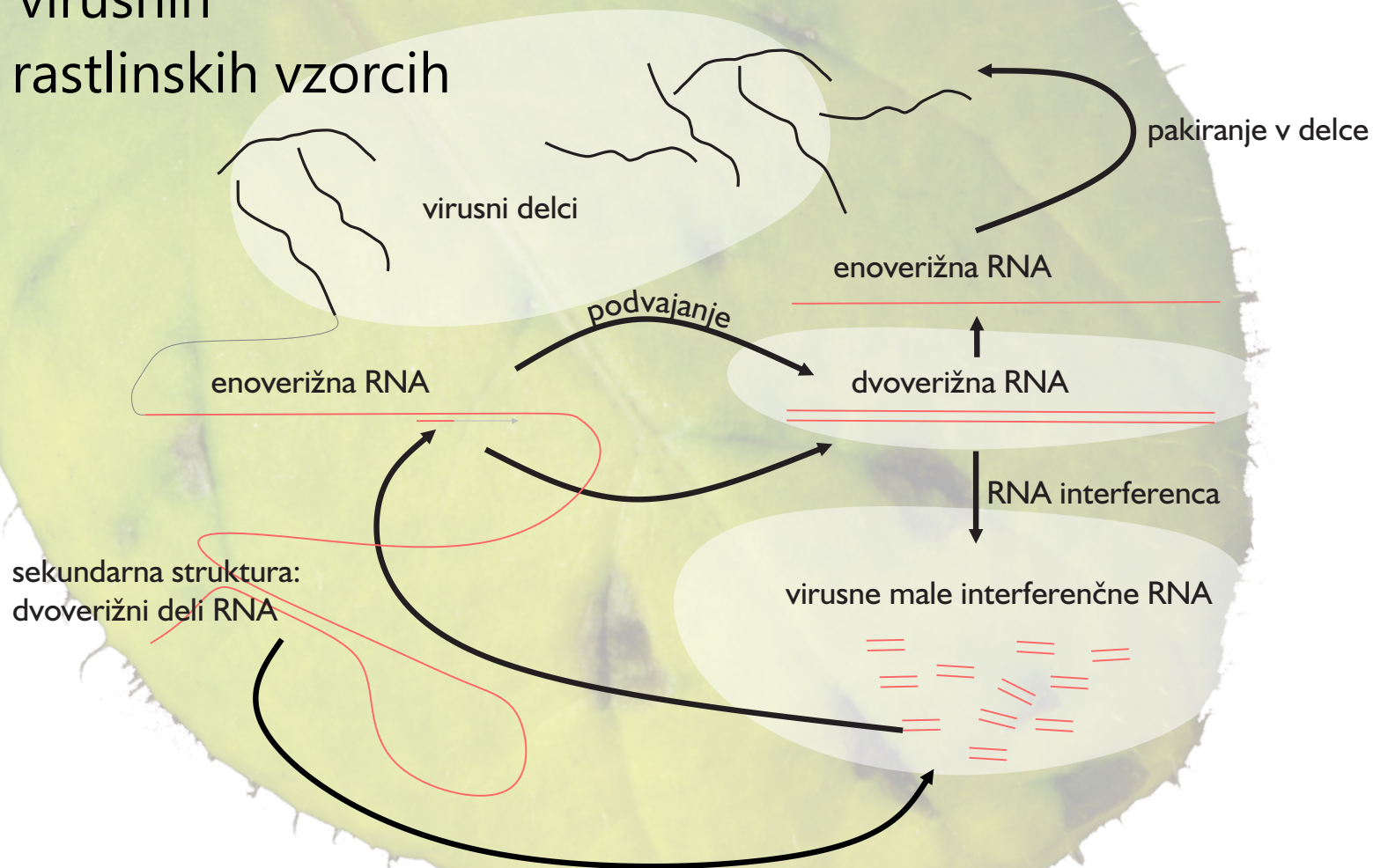
Epidemiologija: sledenje širjenja virusa v okolju.

Študij raznolikosti virusov.

Kako raziskujemo viruse?

Sekvenciranje naslednje generacije

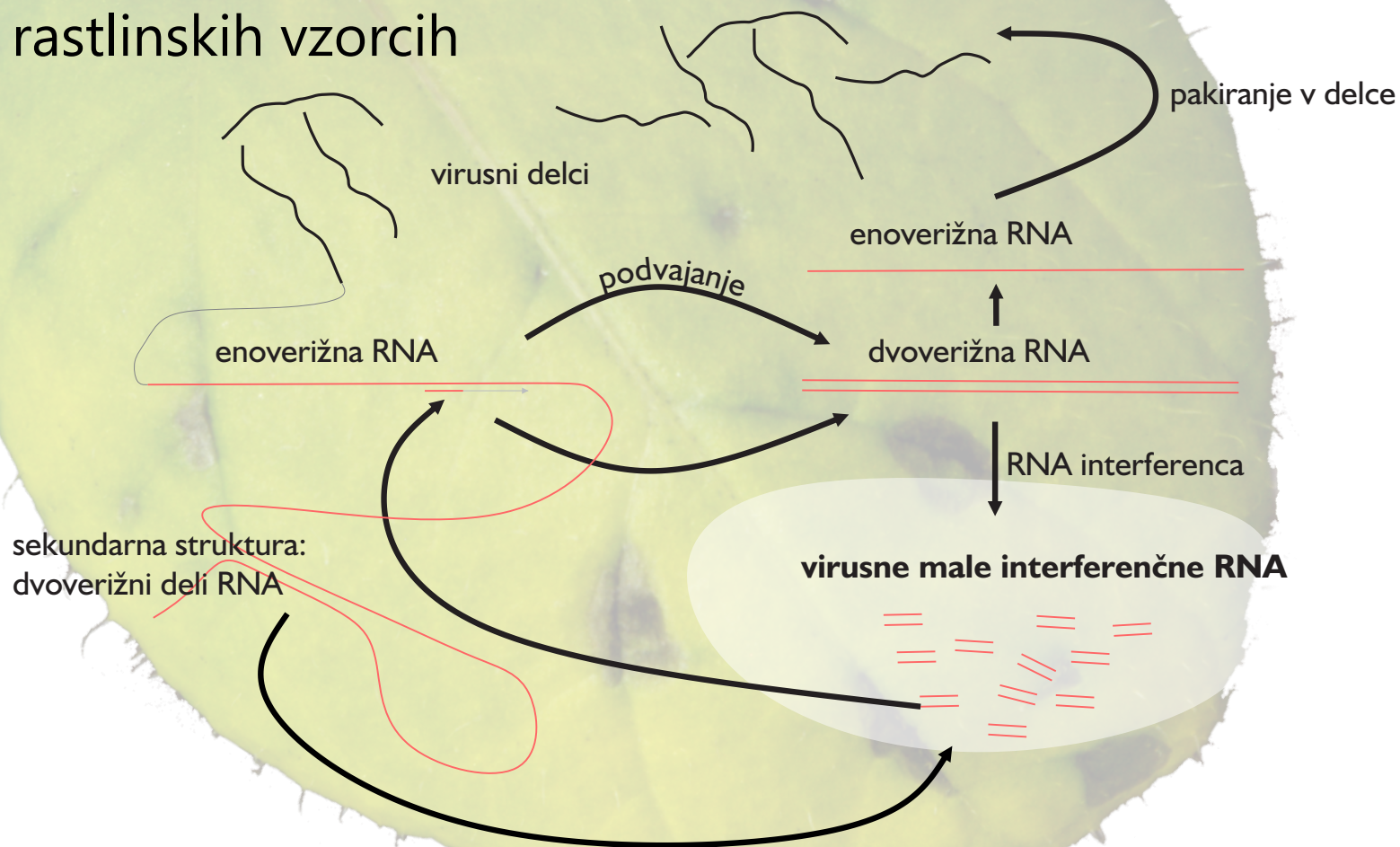
Obogatitev virusnih zaporedij v rastlinskih vzorcih



Kako raziskujemo viruse?

Sekvenciranje naslednje generacije

Obogatitev virusnih zaporedij v rastlinskih vzorcih



Kako raziskujemo viruse?

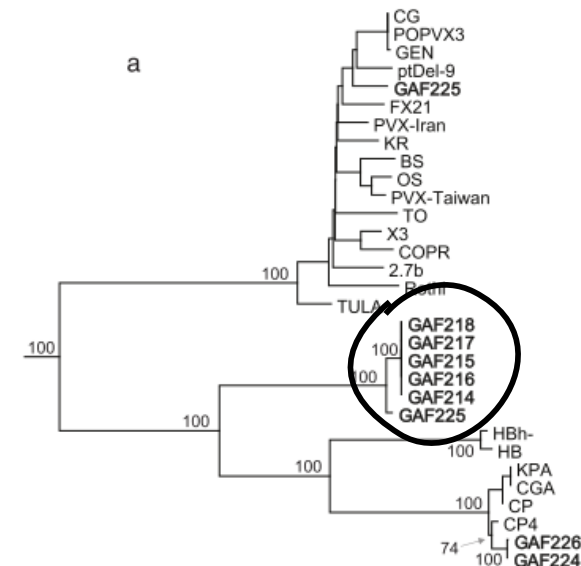
Sekvenciranje naslednje generacije

S sekvenciranjem malih RNA iščemo nove ali nepričakovane viruse v rastlinah.

Nov potyvirus na paradižniku.



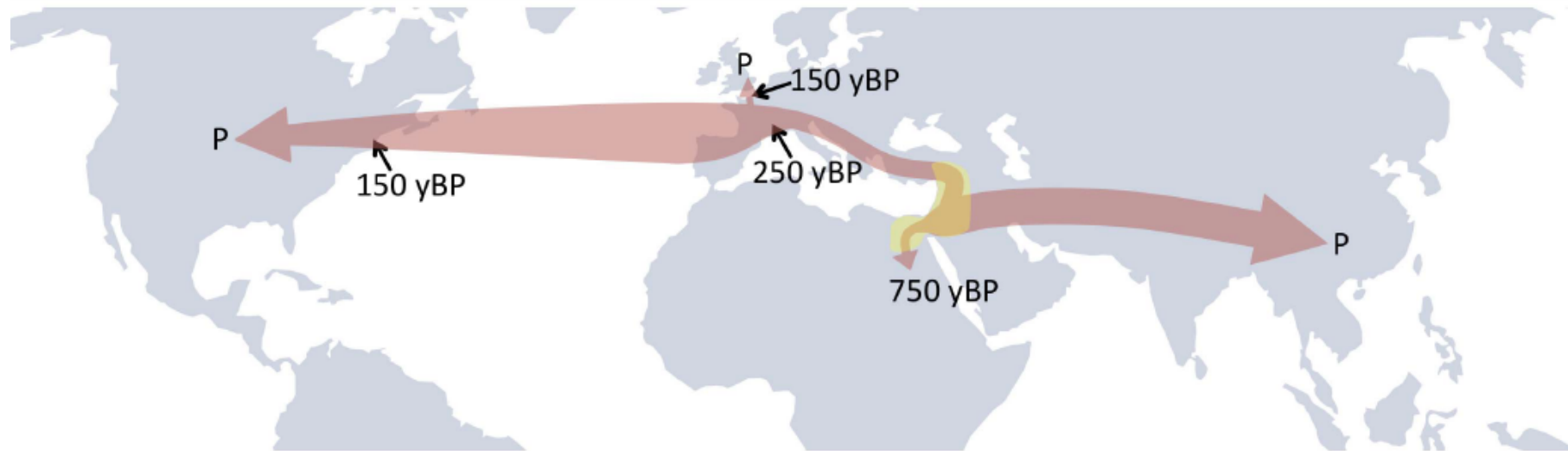
Nov različek virusa X krompirja.



Kako raziskujemo viruse?

Sekveniranje naslednje generacije

Uporaba sekvenciranja malih RNA za določitev RNA virusa iz ~750 let starega arheološkega vzorca ječmena.



Kako raziskujemo viruse?

Sekvenciranje naslednje generacije

Odkrivanje novih virusov.

Okoljska metagenomika: kje in katere viruse najdemo v okolju (prst, voda, zrak...)?

Epidemiologija: sledenje širjenja virusa v okolju.

Študij raznolikosti virusov.

Rastlinski virusi v vodi



<https://www.dayliliesinaustralia.com.au/wp-content/uploads/2013/08/Compost-Bin-What-makes-good-compost-for-gardens--300x200.jpg>

Okužene rastline, ki rastejo v ekoloških nišah ob in v vodah



<https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcTE1V2BY1TdeL0B47L0Nkc8AgxCXr3kj3gL1-kRjAmNYkeU0GBq>

Razpadajoč rastlinski material



http://1.bp.blogspot.com/_bdBGSiZuMAg/S8XgiXkgNJI/AAAAAAAAAIGY/1QnrNcVm1rw/s1600/DSC08573.JPG

Hlevski gnoj, kanalizacija
(nekateri rastlinski virusi preživijo prehod čez prebavni trakt vretenčarjev! pH!)



[http://justcreative.com/wp-content/uploads/2009/creative-advertising/creative-clever-smart-advertising-ads%20\(75\).jpg](http://justcreative.com/wp-content/uploads/2009/creative-advertising/creative-clever-smart-advertising-ads%20(75).jpg)



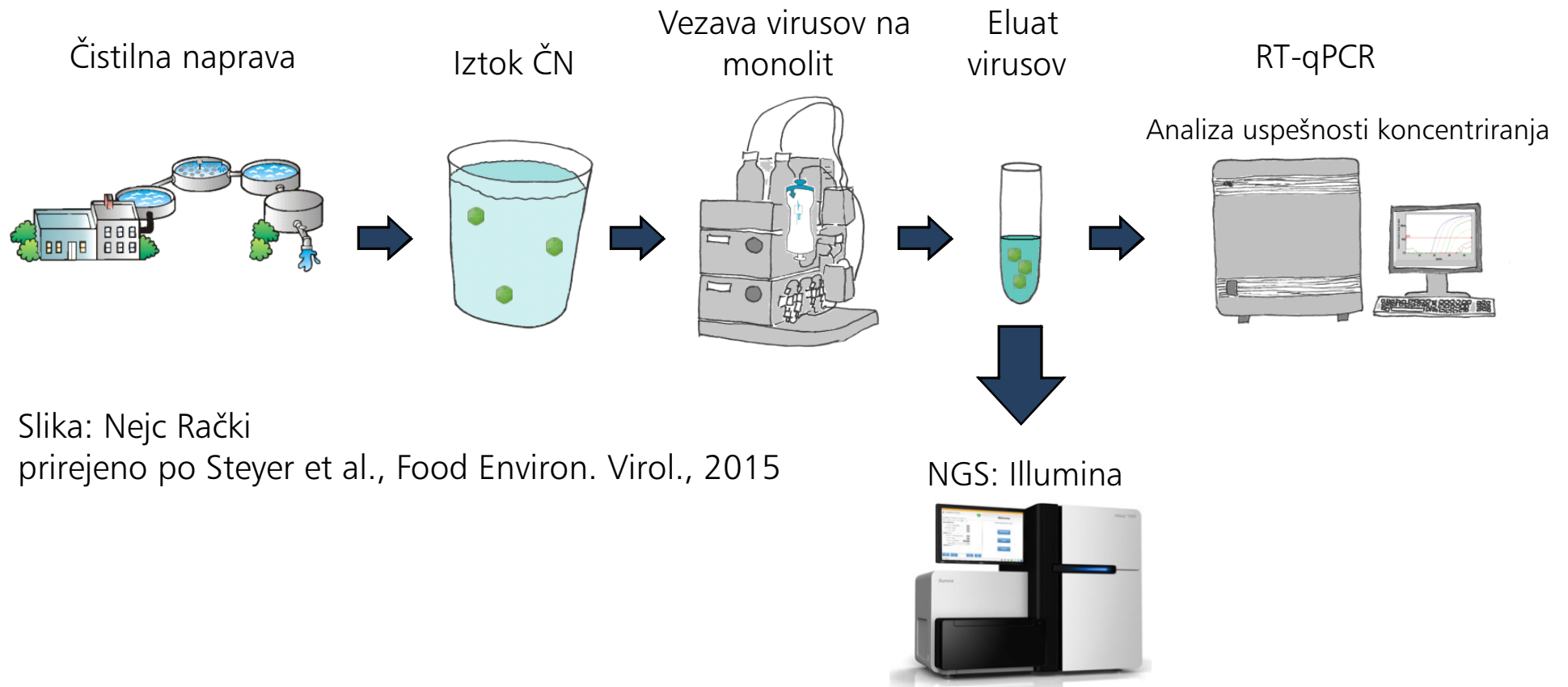
<https://www.newworldencyclopedia.org/entry/File:Irrigation1.jpg>



<https://www.gothicarchgreenhouses.com/images/Hydroponic-Greenhouse-04.jpg>

Virrom vode iz čistilne naprave

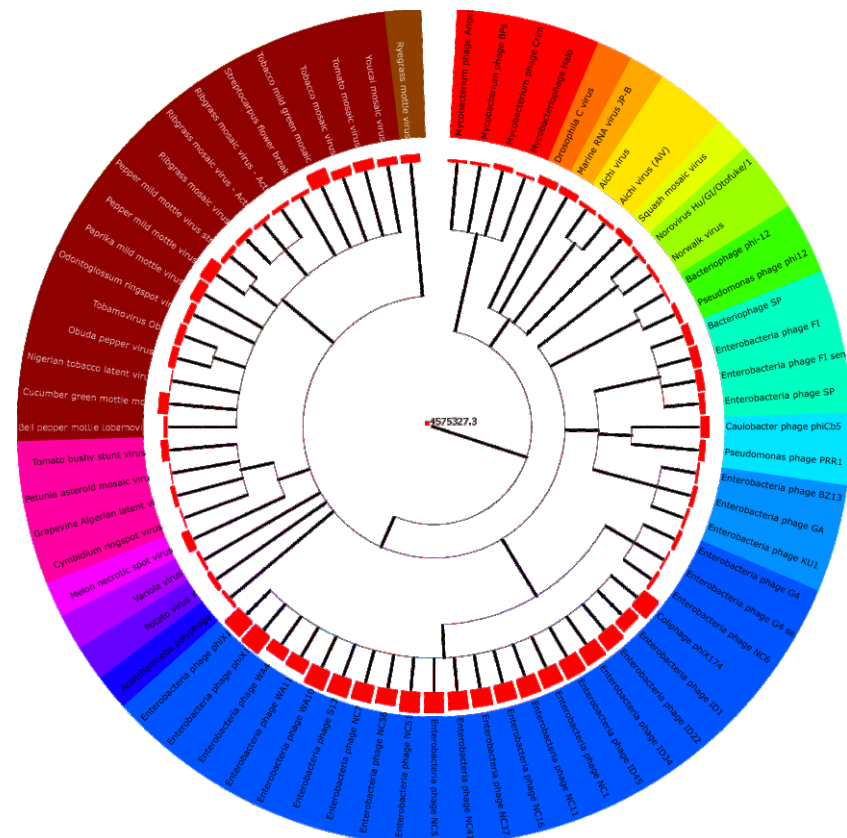
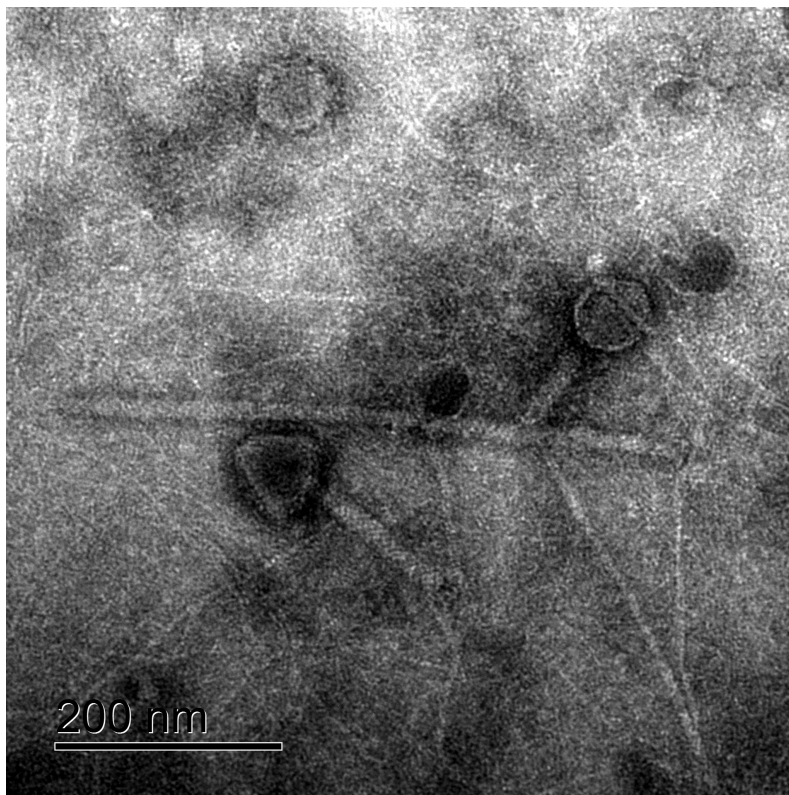
Sekvenciranje metagenoma iztoka čistilne naprave: kateri virusi krožijo v okolju?



Slika: Nejc Rački
prirejeno po Steyer et al., Food Environ. Virol., 2015

Virom vode iz čistilne naprave

Sekvenciranje metagenoma iztoka čistilne naprave: kateri virusi krožijo v okolju?



Kako raziskujemo viruse?

Sekvenciranje naslednje generacije

Odkrivanje novih virusov.

Okoljska metagenomika: kje in katere viruse najdemo v okolju (prst, voda, zrak...)?

Epidemiologija: sledenje širjenja virusa v okolju.

Študij raznolikosti virusov.

Ravni raznolikosti

Virusi so najbolj raznoliki biološki subjekti.

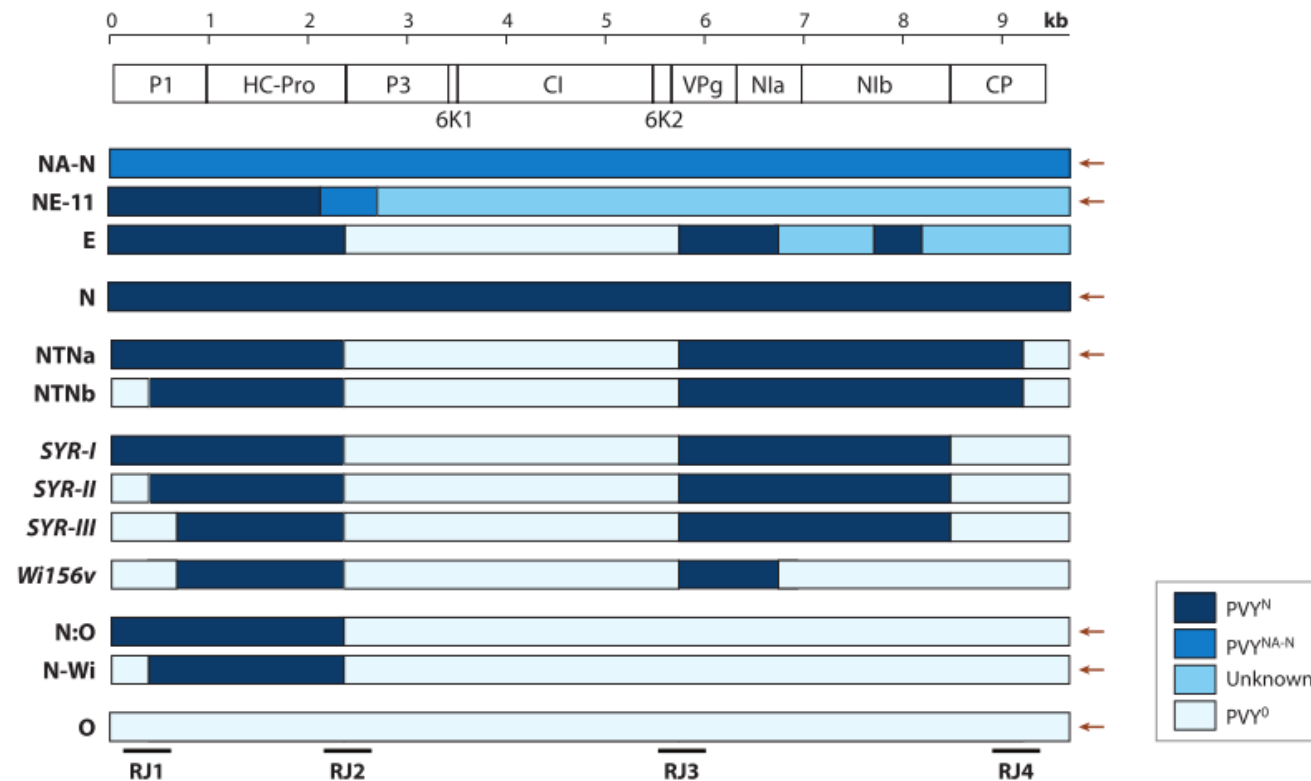
Poznamo zelo majhen delež vrst.

Primer: znanih je $\sim 5\,500$ vrst virusov sesalcev,
kar predstavlja manj kot 2% ocenjenenega števila vrst.
(Anthony, *mBio*, 2014)

Ravni raznolikosti

Znotraj vrst poznamo številne različke

Virus Y krompirja



Ravni raznolikosti

Raznolikost populacij v rastlini



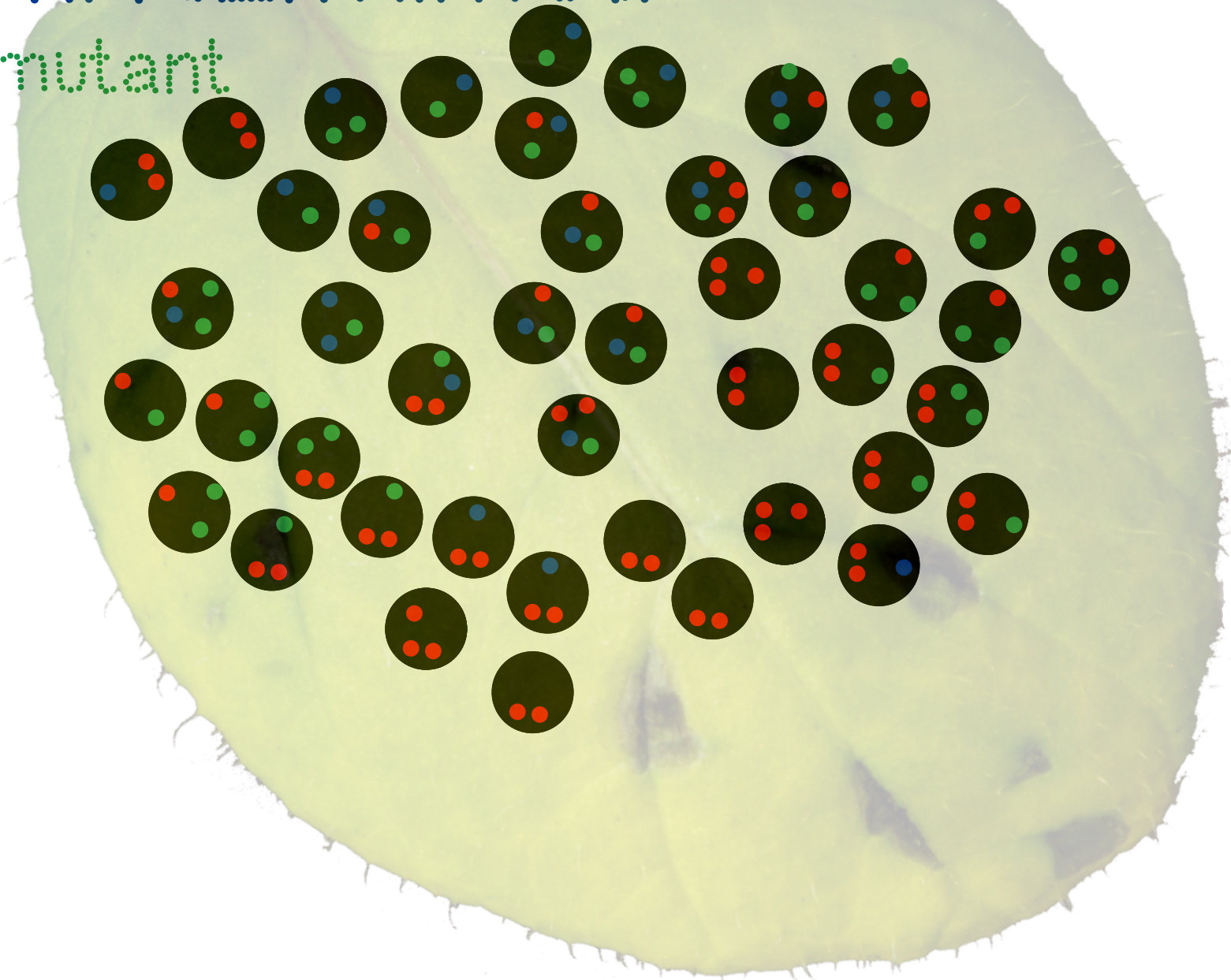
Ravni raznolikosti

Roji mutant



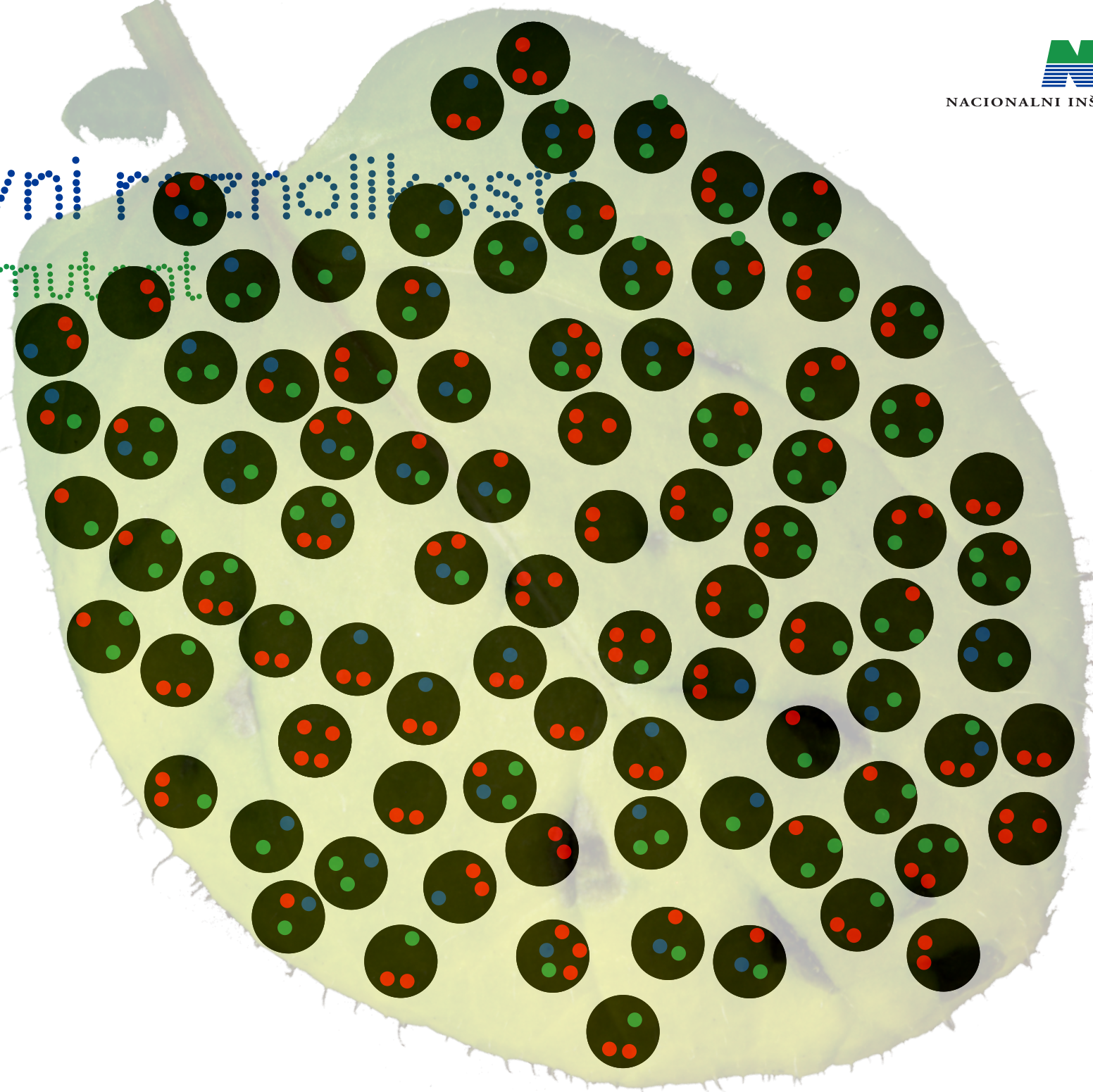
Ravni raznolikosti

Roj mutant



Ravni raznolikost

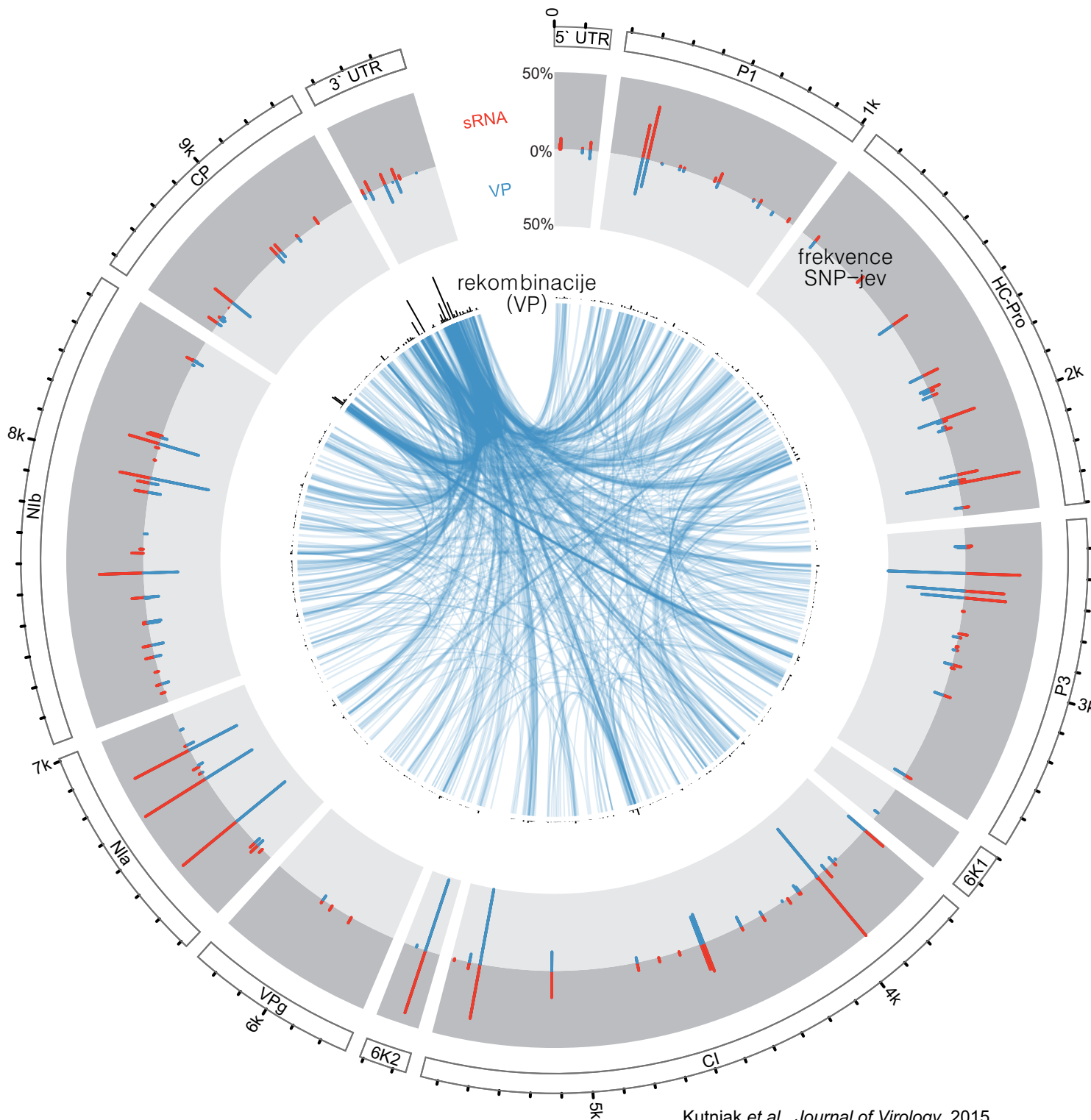
Roj mutacij



Ravni raznolikosti

Raznolikost populacij v rastlini

Raznolikost virusnih populacij znotraj gostitelja predstavlja rezervoar variant na katere deluje evolucija.



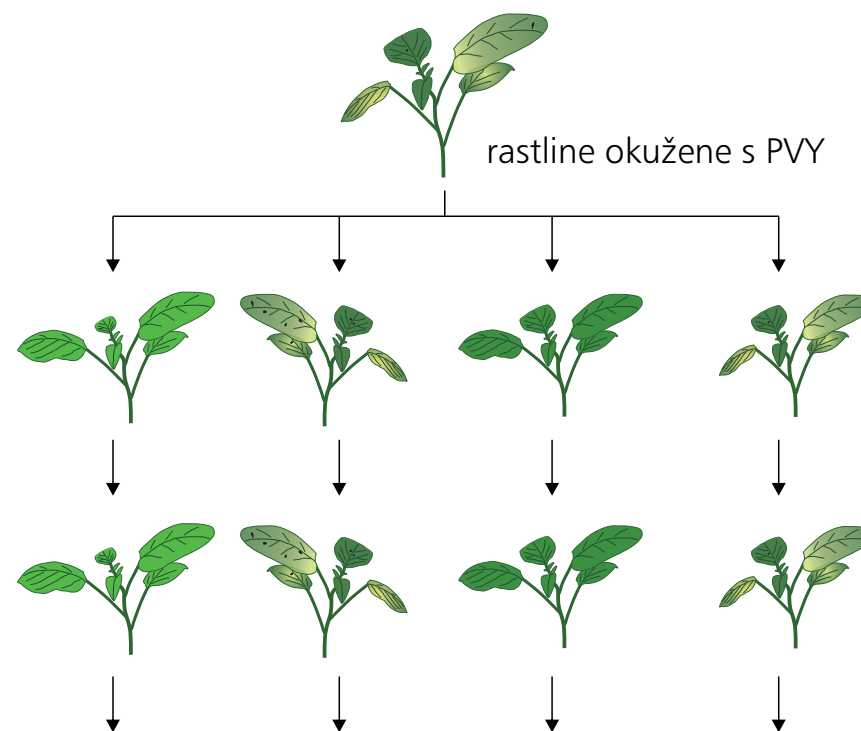
Ravni raznolikosti

Eksploimentalna evolucija

Želimo odgovoriti na vprašanja:

Kako se virusi adaptirajo
na nove gostitelje?

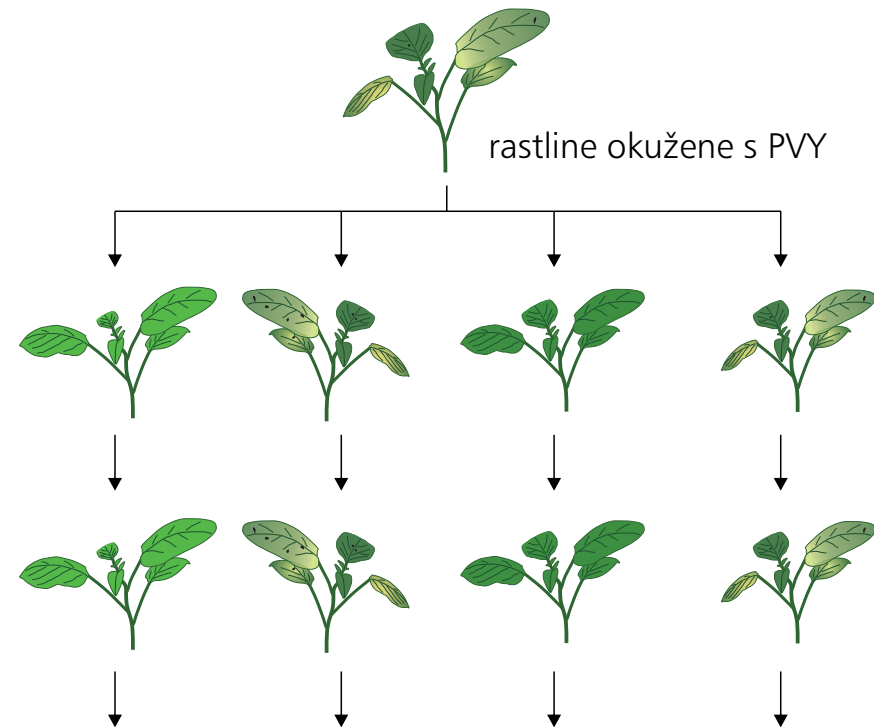
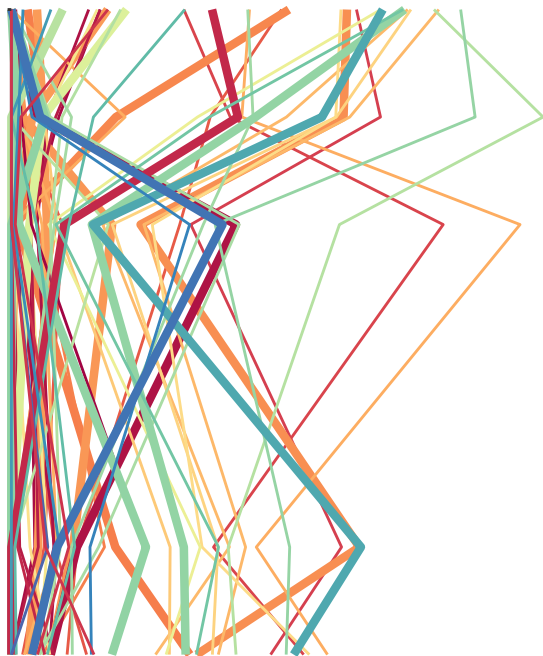
Kako se porajajo novi virusi
in novi virusni različki?



Ravni raznolikosti

Eksploimentalna evolucija

Spremljamo frekvence variant v populaciji v času eksperimentalne evolucije.



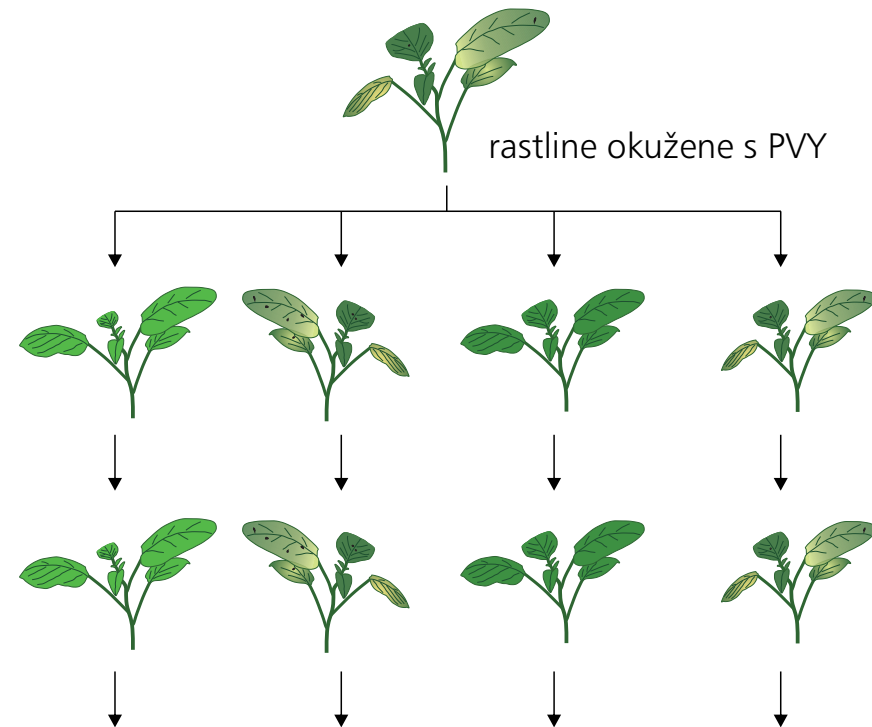
Ravni raznolikosti

Eksploimentalna evolucija

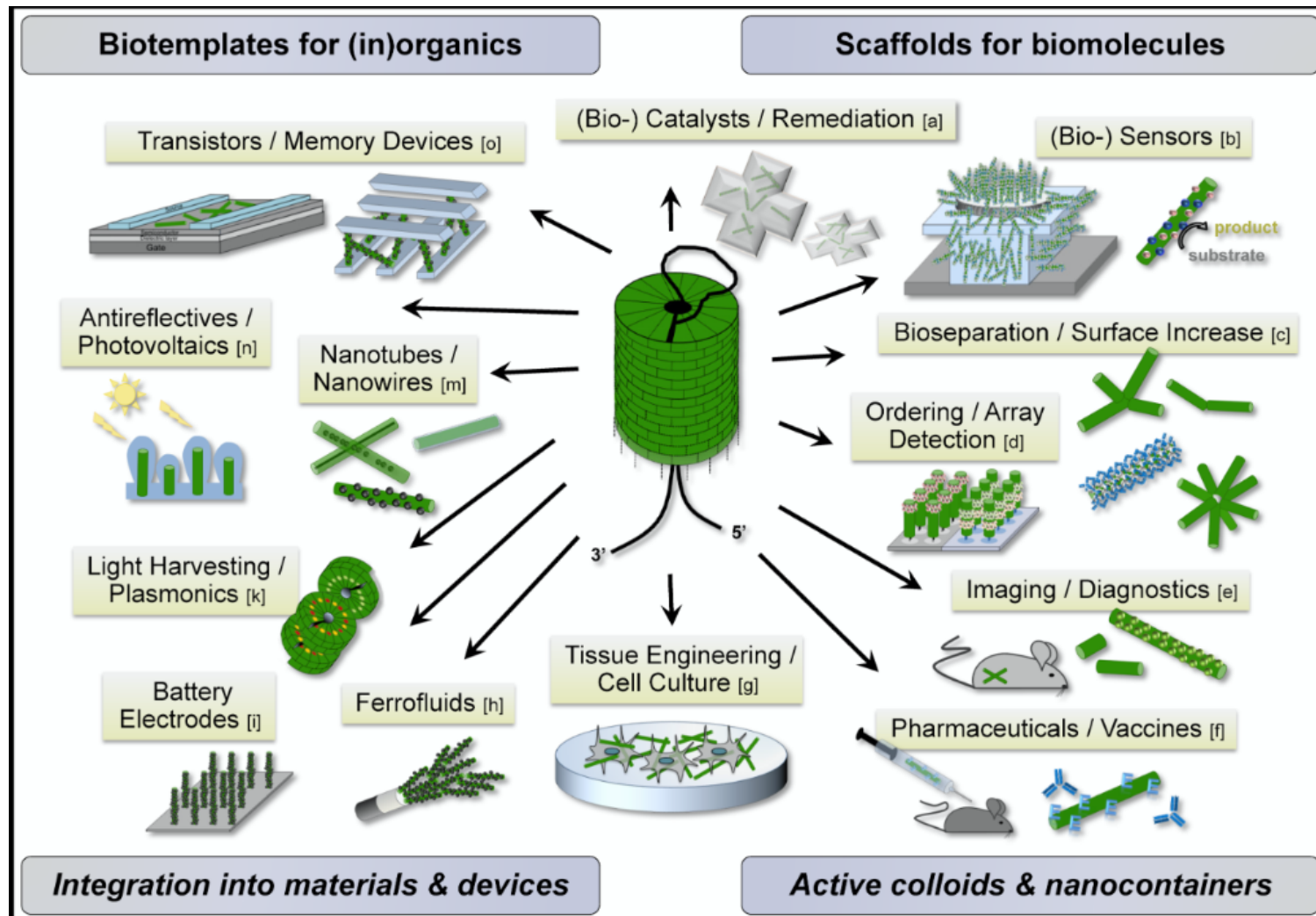
Spremljamo frekvence variant v populaciji v času eksperimentalne evolucije.

Kakšne selekcijske pritiske predstavljajo različni gostitelji?

Model za študij osnovnih mehanizmov evolucije.



Uporaba rastlinskih virusov



Zahvala in viri slik

Viri slik: navedeni ob slikah ali last fotografskega arhiva NIB.

Hvala sodelavcem z oddelka za biotehnologijo in sistemsko biologijo, še zlasti: prof. dr. Maji Ravnikar, dr. Ionu Gutierrezu, dr. Anni Coll, dr. Nataši Mehle, dr. Matevžu Ruparju, dr. Maruši Pompe Novak in dr. Magdi Žnidarič Turnšek.

Hvala za pozornost!