

ODKRIVANJE IN Z VODO POVEZANA EPIDEMIOLOGIJA PORAJAJOČIH SE TOBAMOVIRUSOV, KI OKUŽUJEJO KMETIJSKE RASTLINE



Aplikativni raziskovalni projekt L4-3179

Javna predstavitev končnih rezultatov, 25.11.2024, Ljubljana

Nataša Mehle, Denis Kutnjak, Tomaž Curk, Neža Pajek Arambašič, Ion Gutierrez Aguirre, Rok Stravs, Katarina Bačnik, Luka Kranjc, Irena Bajde, Jakob Brodarič, Miha Kitek, Maja Ravnikar, Olivera Maksimović, Mark Paul Selda Rivarez, Ana Vučurović.

1.10.2021 - 30.9.2024



REPUBLIC OF SLOVENIA
MINISTRY OF AGRICULTURE,
FORESTRY AND FOOD



University of Ljubljana
Faculty of Computer and
Information Science

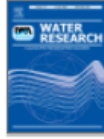


TOBAMOVIRUSI

- Zelo stabilni v različnih okoljih (voda, prst, oblaki, odpadna voda)

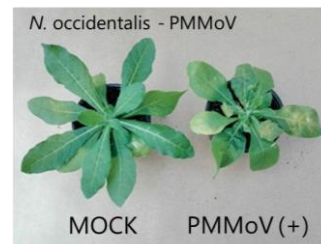
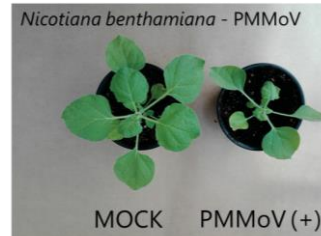
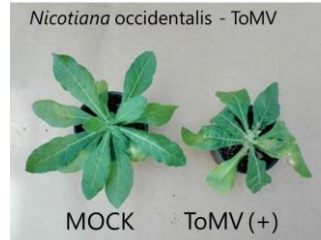
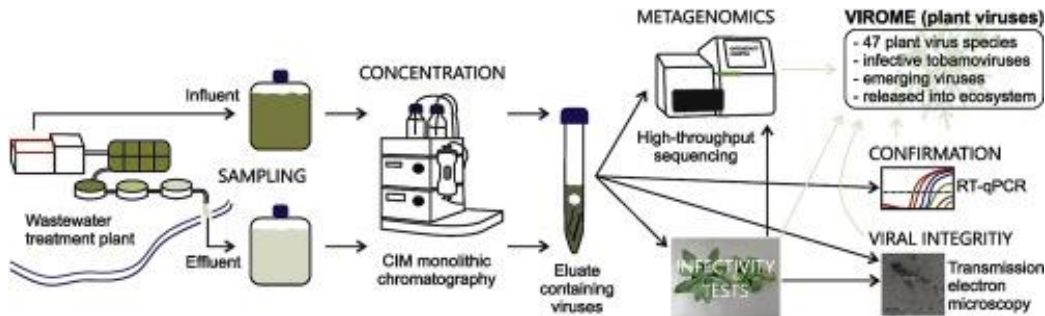


Water Research
Volume 177, 15 June 2020, 115628

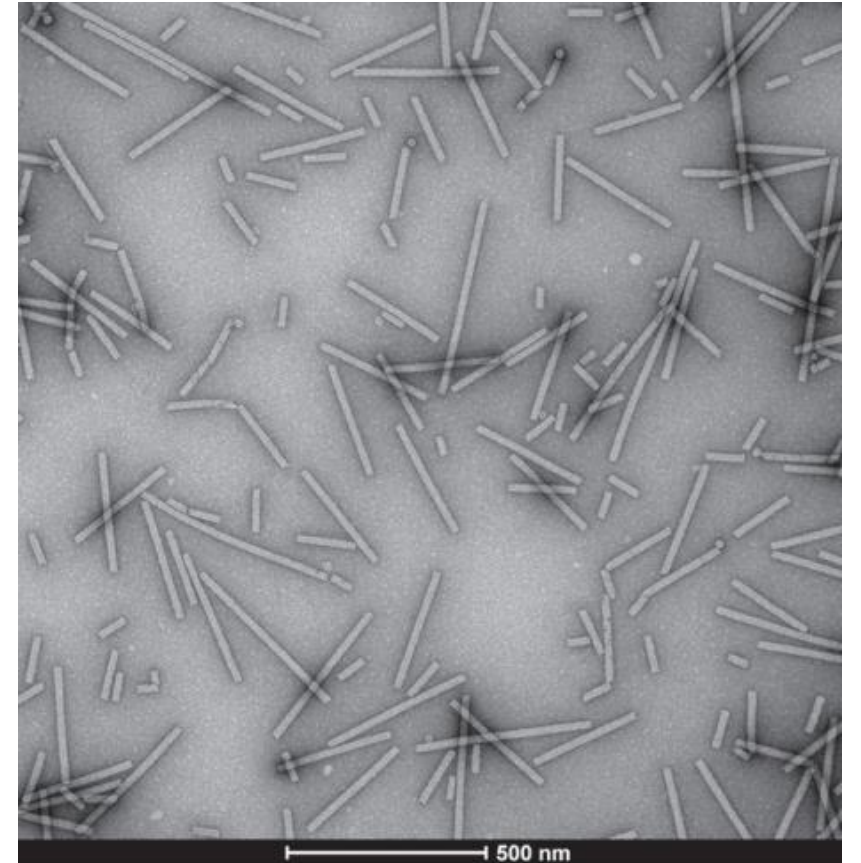


Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment

Katarina Bačnik^{a, b}, Denis Kutnjak^a, Anja Pecman^{a, b}, Nataša Mehle^a, Magda Tušek Žnidarič^a, Ion Gutiérrez Aguirre^a, Maja Ravnikar^{a, c}



družina *Virgaviridae*; rod *Tobamovirus*

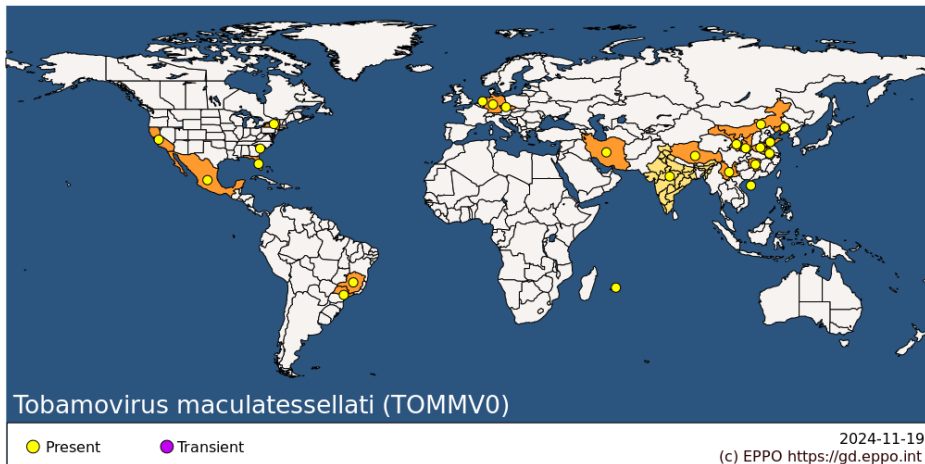


Vir slike: JKI Data Sheets - Plant Diseases and Diagnosis, ISSN 2191-1398

- Nekateri tobamovirusi spadajo med najpomembnejše rastlinske patogene

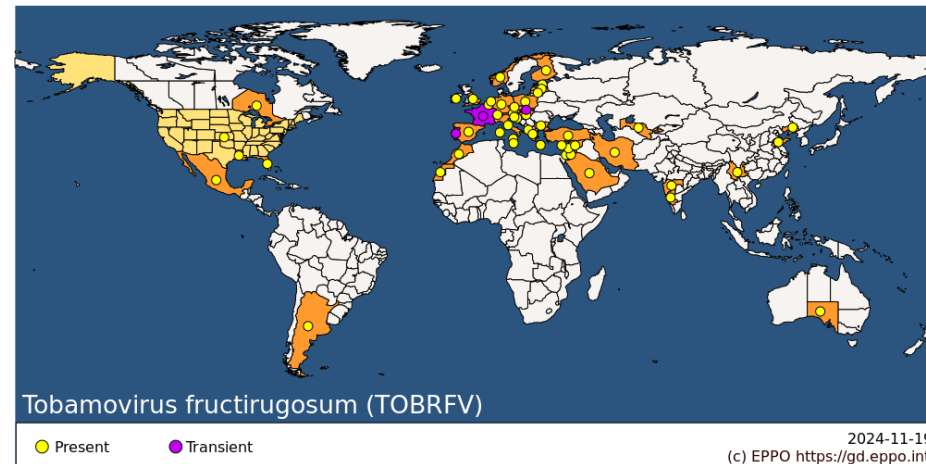
Virus lisavosti in mozaika paradižnika (ToMMV)

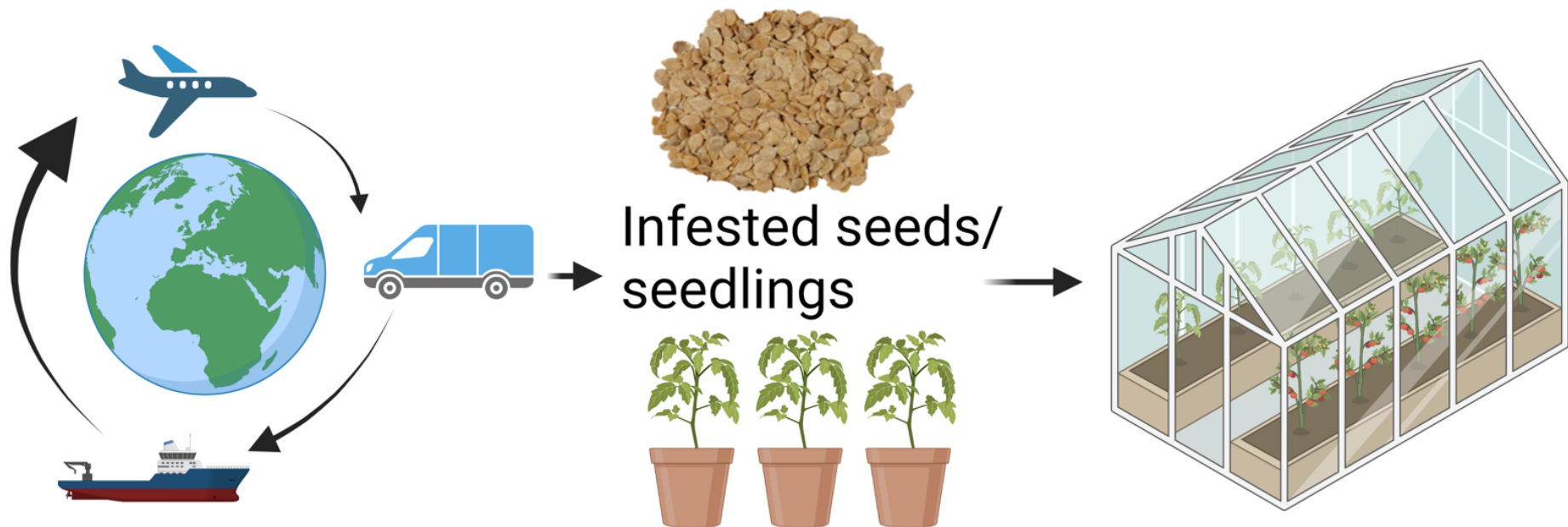
2013 Mehika ->



Virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ToBRFV)

2014 Izrael ->



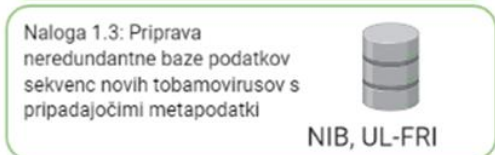
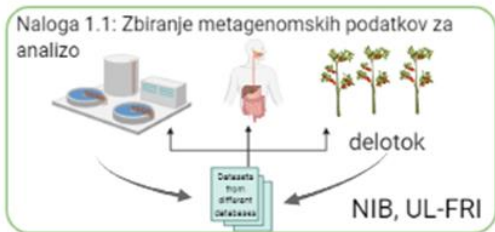


Agricultural practices

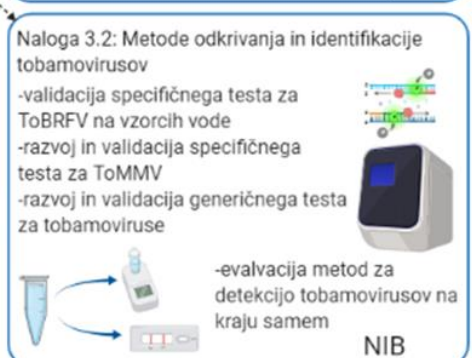
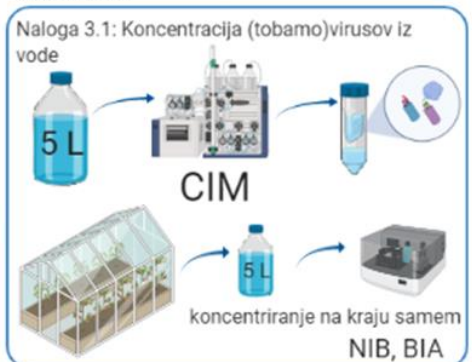
Plant to plant
contact

Skice narisane z orodjem BioRender.com

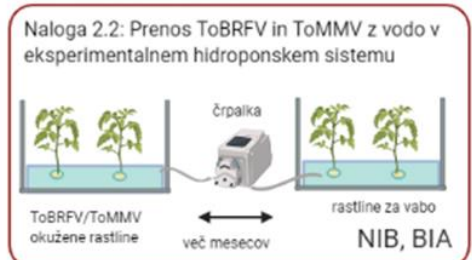
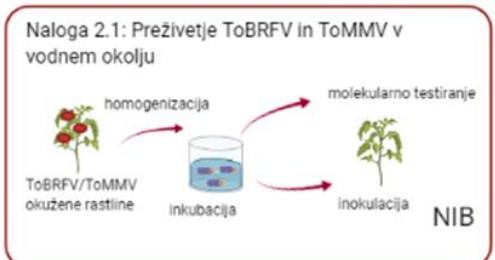
DP1: Katalog sekvenc možnih novih tobamovirusov in njihova karakterizacija



DP3: Razvoj učinkovitega diagnostičnega postopka za spremljanje porajajočih se tobamovirusov v vzorcih vode



DP2 Študija epidemiologije, povezane z vodo



Katalog zaporedij možnih tobamovirusov

- višja stopnja pripravljenosti relevantnih organizacij in stroke na možen pojav (razširjanje) novih patogenih tobamovirusov

Stabilnost porajajočih tobamovirusov v vodi in možnost njihovega prenosa z vodo

- razjasniti vlogo vode v epidemiologiji tobamovirusov (za prihodnje študije ocene tveganja in strategije ukrepov)

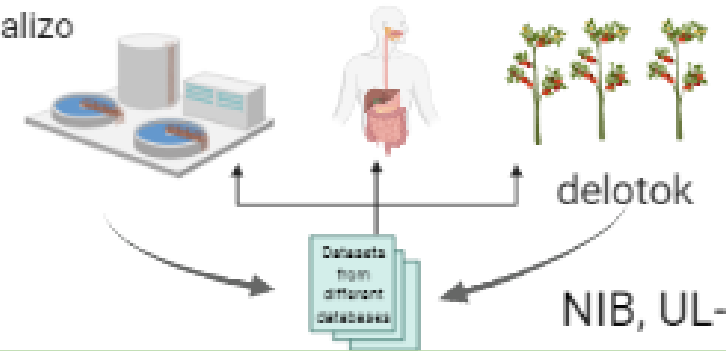
Razviti in validirati diagnostične postopke za spremljanje pojava tobamovirusov v vzorcih vod

- zanesljivi, učinkoviti, hitri in preprosti diagnostični postopki

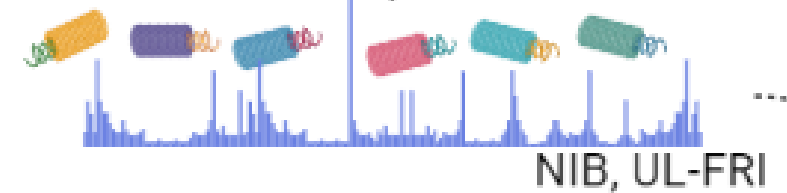
DP1: Katalog sekvenc možnih novih tobamovirusov in njihova karakterizacija

Aktivno iskanje novih virusov ključno za boljšo pripravljenost na zaznavanje in preprečevanje širjenja prihodnjih virusnih povzročiteljev bolezni.

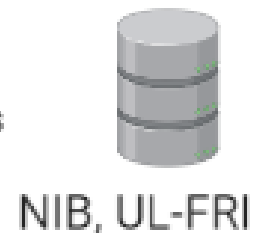
Naloga 1.1: Zbiranje metagenomskih podatkov za analizo



Naloga 1.2: Iskanje znanih in možnih sekvenc novih tobamovirusov v naboru podatkov



Naloga 1.3: Priprava neredundantne baze podatkov sekvenc novih tobamovirusov s pripadajočimi metapodatki



Naloga 1.4: Filogenetska in rekombinantna analiza sekvenc tobamovirusov



Skice narisane z orodjem BioRender.com

Ali lahko uporabimo globalne javno dostopne podatke (npr. iz repozitorija kratkih odčitkov nukleotidnih sekvenc – Sequence Read Archive; SRA), da bi odkrili še neznane tobamoviruse, preden jih zaznamo kot rastlinske patogene?



Katz in sod. 2023, *Nucleic Acids Research*

- September 2021: javno dostopnih približno 25,6 petabajnih parov, izhajajočih iz več kot 14,8 milijonov posameznih javno dostopnih sekvenciranj (peta = 10^{15})
- Količina podatkov se podvoji vsakih 12-18 mesecev

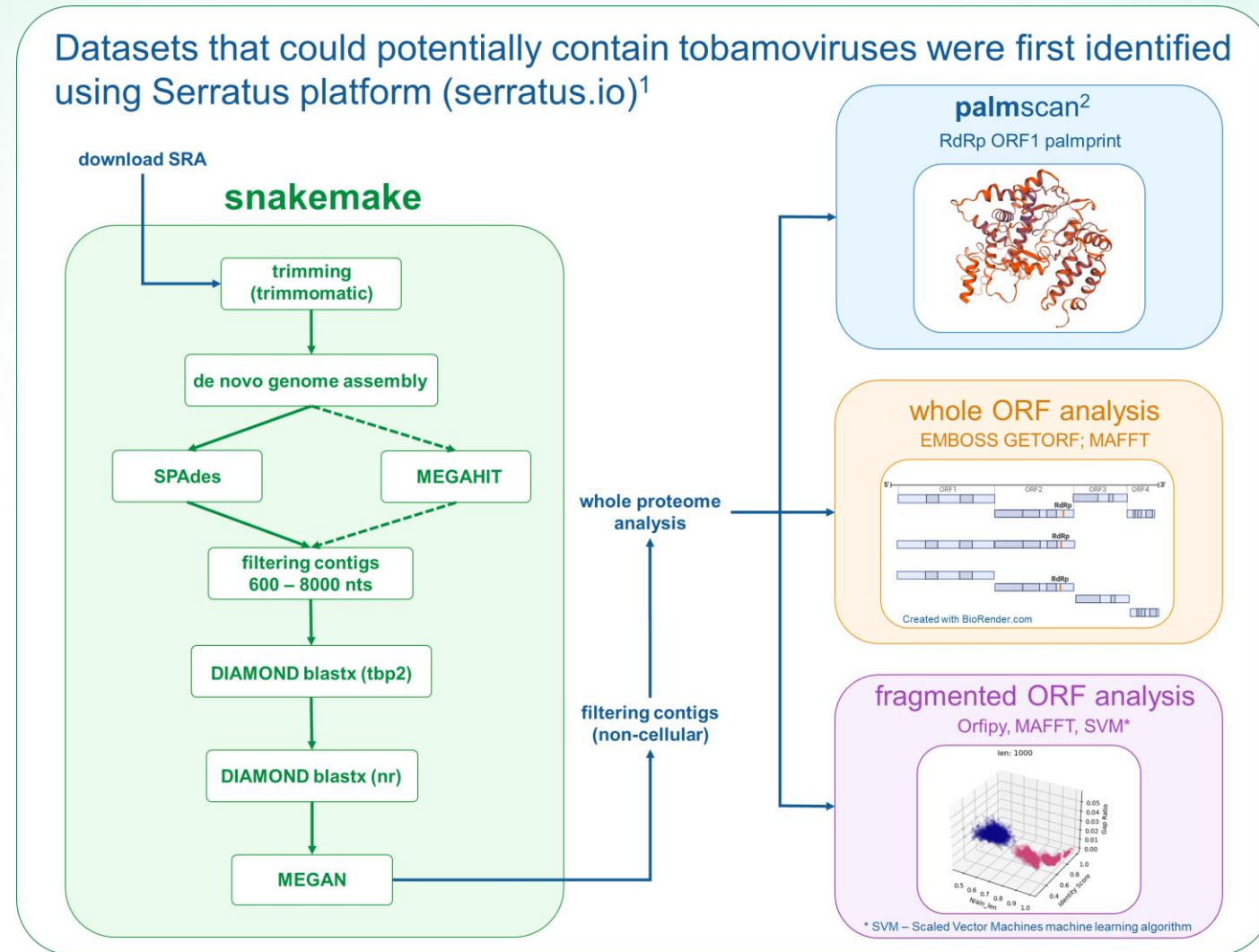
Kako sploh pregledati takšno količino podatkov?



Preboj v podatkovnem rudarjenju RNA virusov (<https://serratus.io/>) (Edgar in sod. 2022, *Nature*) (identifikacija podatkovnih setov, ki vsebujejo viruse na osnovi kratke ohranjene regije RdRp (od RNA odvisna RNA polimeraza))

- Z uporabo orodja snakemake smo pripravili **avtomatiziran delotok**, ki nam v prvem koraku omogoča hitro **zbiranje podatkov iz podatkovne baze** kratkih odčitkov nukleotidnih sekvenc (Sequence Read Archive; SRA).

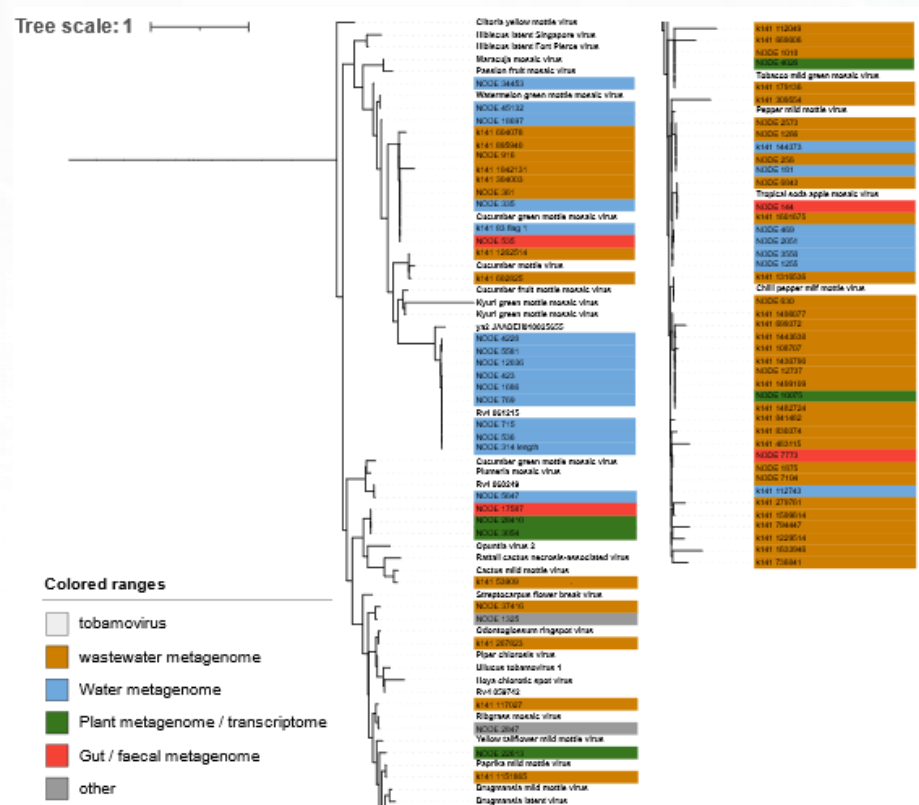
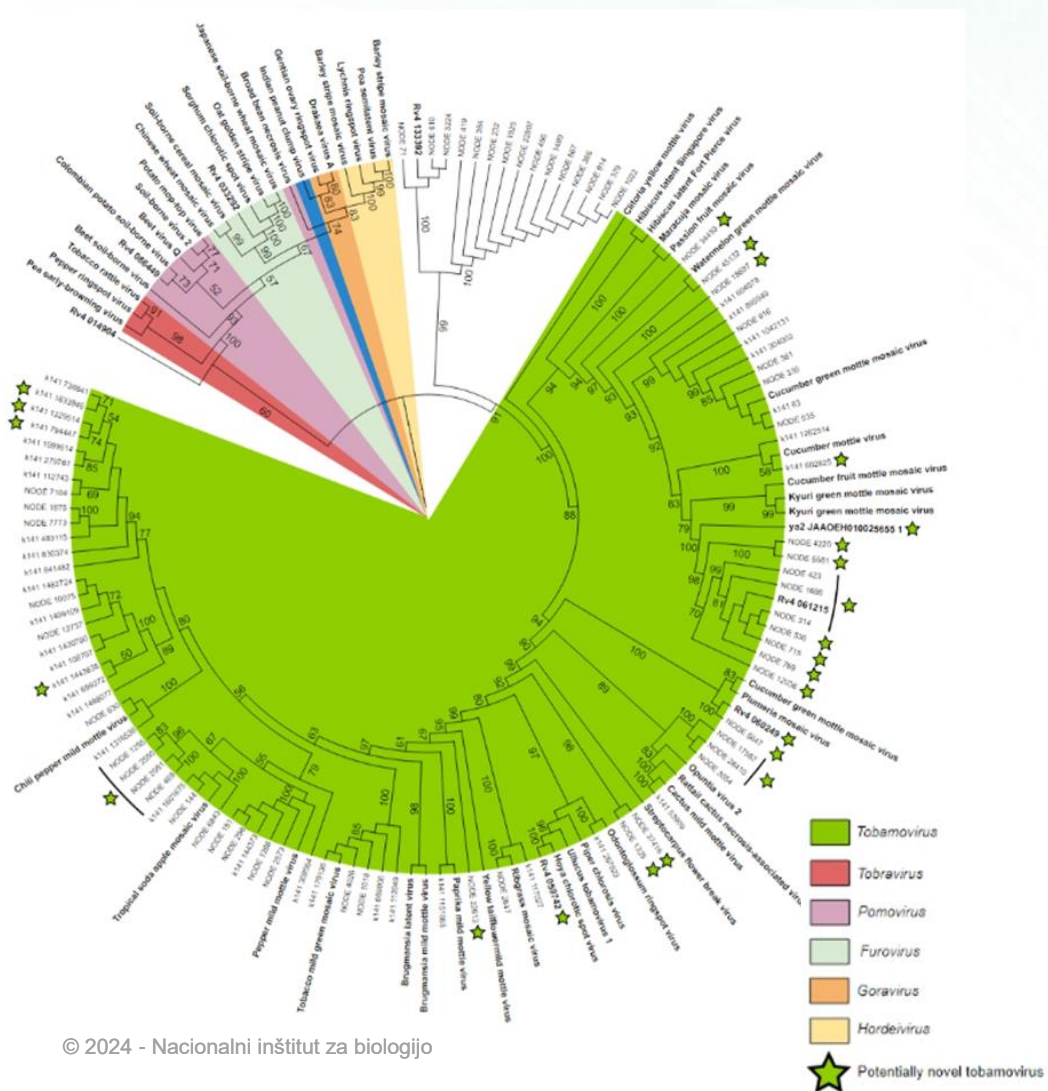
- V naslednjih korakih s pomočjo snakemake delotoka pridobimo **kandidatna zaporedja za znane in nove tobamoviruse**.



Filogenetska povezava med znanimi in novimi tobamovirusi

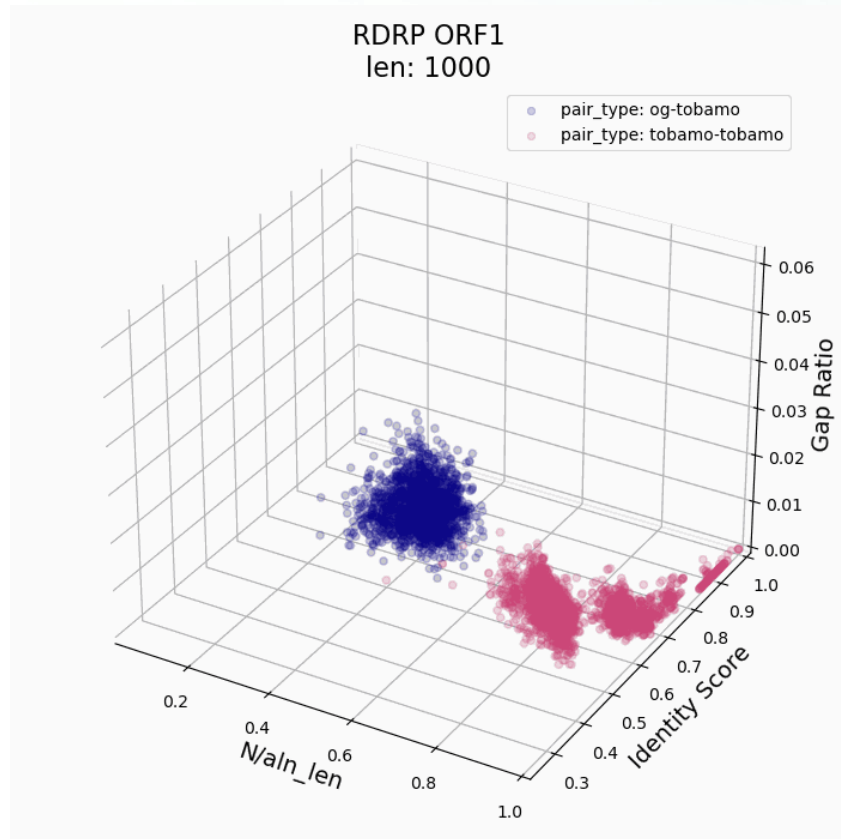
Analiza z obsežnimi poravnjavami na osnovi ohranjene regije od RNA odvisne RNA polimeraze

Ločene analize zanimivih primerov



Novi tobamovirusi najdeni npr. v vzorcih iz reke Amazonke, vzorcih tal in silaže iz Evrope, v odpadnih vodah...

V testiranju: orodje za avtomatsko taksonomsko določitev tobamovirusnih zaporedij pridobljenih s podatkovnim rudarjenjem



S podatkovnim rudarjenjem pridobimo zaporedja različnih dolžin in podobnosti znanim virusom

Orodje za avtomatsko določitev ali zaporedje pripada (novemu) tobamovirusu ali ne, z oceno zaupanja

Kaj so parametri, ki vplivajo na pravilno določitev? (npr. dolžina zaporedja, mesto na genomu...)

Širša uporabnost rezultatov in razvitih postopkov iz DP1

Nova odkritja (novi tobamovirusi):

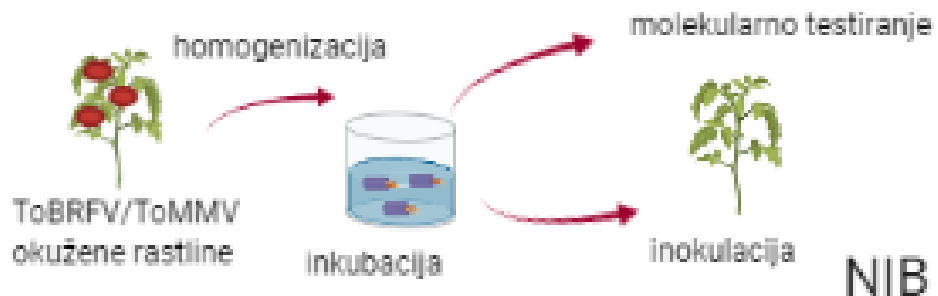
- Hitrejši razvoj metod ob morebitnem vzniku epidemij
- Lažje razumevanje izvora ter geografske prisotnosti potencialnih novih bolezni – potencialen vpliv na sprejemanje karantenskih ukrepov

Novi pristopi analize velikih podatkovnih setov:

- Avtomatiziran postopek za ponovno analizo za tobamoviruse, ko se nakopičijo novi podatki
- Hitrejše pridobivanje podatkov za analizo tudi za druge skupine virusov (s prilagoditvami)
- Inovativen postopek za avtomatsko taksonomsko klasifikacijo tobamovirusov (primer, ki se lahko aplicira širše)

DP2: Študija epidemiologije ToBRFV in ToMMV povezane z vodo

Naloga 2.1: Preživetje ToBRFV in ToMMV v vodnem okolju



Naloga 2.2: Prenos ToBRFV in ToMMV z vodo v eksperimentalnem hidroponskem sistemu

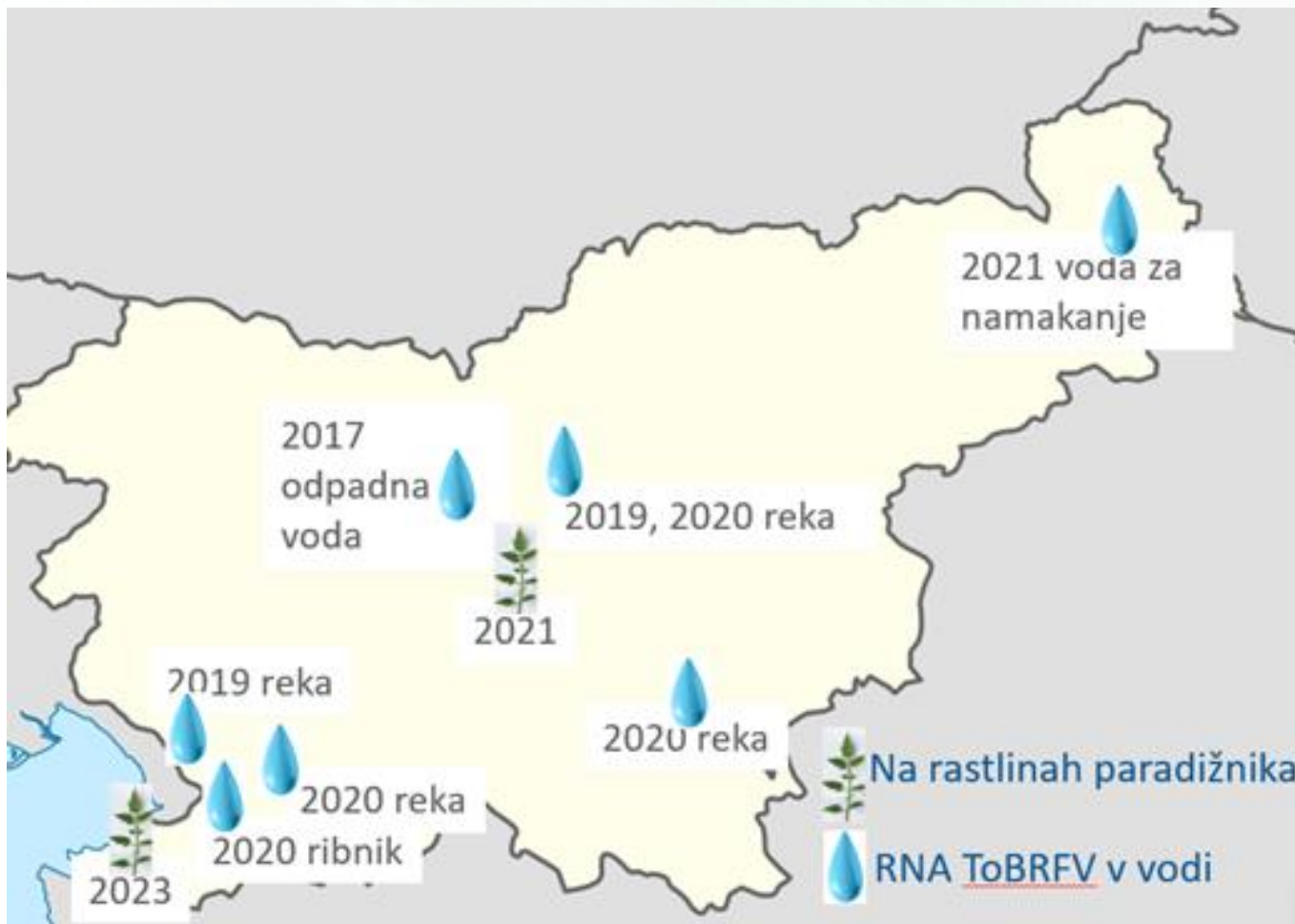


Naloga 2.3: Prenos ToBRFV in ToMMV z vbrizgavanjem okužene vode v substrat



Skice narisane z orodjem BioRender.com

ToBRFV v Sloveniji



Water Research 177 (2020) 115628



Contents lists available at ScienceDirect

Water Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/watres

Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment

Katarina Bačnik^{a, b}, Denis Kutnjak^a, Anja Pecman^{a, b}, Nataša Mehle^a,
Magda Tušek Žnidarič^a, Ion Gutiérrez Aguirre^a, Maja Ravnikar^{a, c, *}

^a National Institute of Biology, Department of Biotechnology and Systems Biology, Večna pot 111, 1000, Ljubljana, Slovenia

^b Jožef Stefan International Postgraduate School, Jamova cesta 39, 1000, Ljubljana, Slovenia

^c University of Nova Gorica, Vipavska cesta, 5000, Nova Gorica, Slovenia

Received: 1 February 2022 | Accepted: 12 April 2022

DOI: 10.1002/ndr.2.12079

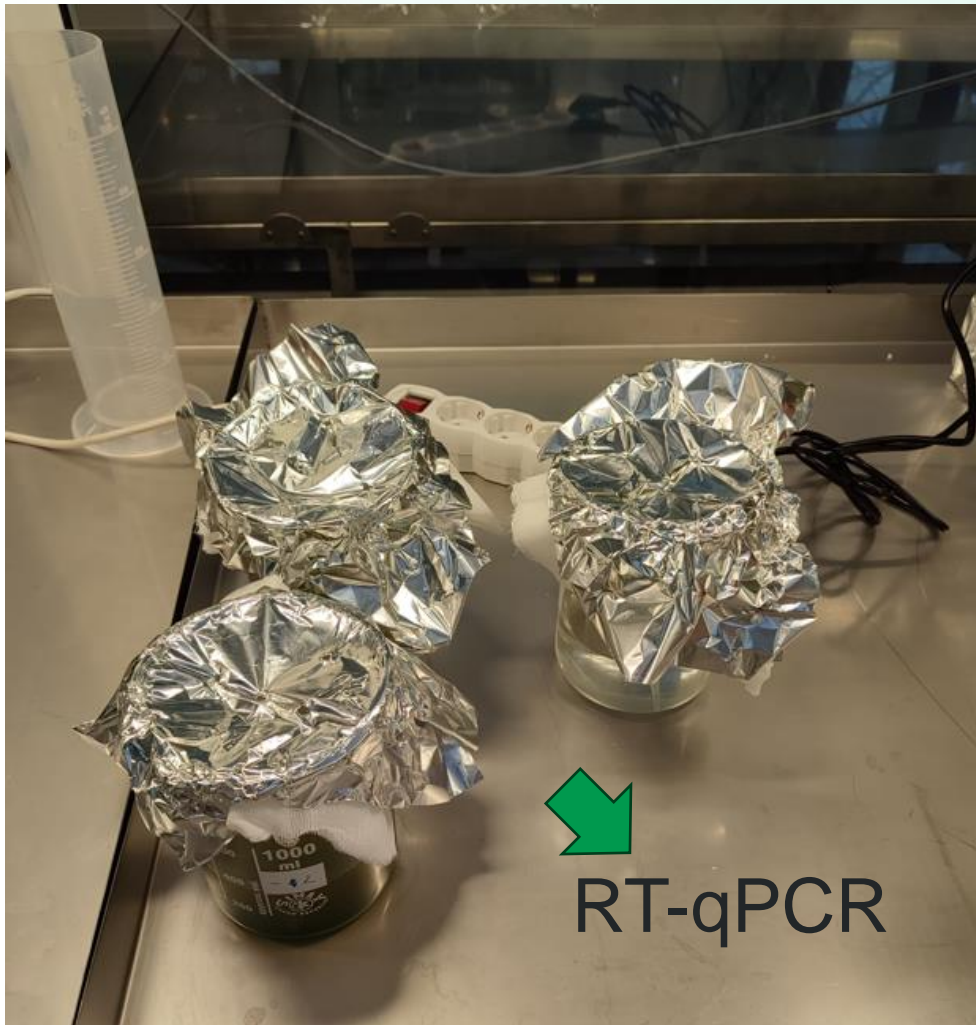
New Disease Reports WILEY

NEW DISEASE REPORT

First report of *Tomato brown rugose fruit virus* in tomato in Slovenia

A. Vučurovič¹ | J. Brodarič¹ | T. Jakomin¹ | A. Pecman^{1,2} |
A. Benko Beloglavec³ | N. Mehle^{1,4}

Kako dolgo lahko ToBRFV/ ToMMV preživi v vodi?



Kako dolgo lahko ToBRFV preživi v vodi?

Redčina 10⁻²

| teden | RT-qPCR (Cq) | Testne rastline |
|-------|--------------|-----------------|
| 0 | 7 | + |
| 1 | 7 | + |
| 2 | 7 | + |
| 3 | 7 | + |
| 4 | 8 | + |
| 5 | 10 | - |
| 6 | 10 | - |
| 7 | 10 | - |
| 8 | 12 | - |
| 9 | 11 | - |

Redčina 10⁻⁴

| RT-qPCR (Cq) | Testne rastline |
|--------------|-----------------|
| 14 | + |
| 14 | + |
| 15 | + |
| 16 | - |
| 15 | + |
| 21 | - |
| 20 | - |
| 21 | - |
| 21 | - |
| 21 | - |

Redčina 10⁻⁶

| RT-qPCR (Cq) | Testne rastline |
|--------------|-----------------|
| 21 | + |
| 21 | + |
| 22 | - |
| 23 | - |
| 27 | - |
| 26 | - |
| 21 | - |
| 22 | - |
| 22 | - |
| 21 | - |

Z RT-qPCR RNA virusa ToBRFV v vodi zaznamo še bistveno dlje (potrjeno da vsaj 15 tednov po pripravi onesnažene vode)

Kako dolgo lahko ToMMV preživi v vodi?

Redčina 10⁻²

| teden | RT-qPCR (Cq) | Testne rastline |
|-------|--------------|-----------------|
| 0 | 15 | + |
| 1 | 15 | + |
| 2 | 14 | + |
| 3 | 15 | + |
| 4 | 19 | + |
| ... | ... | ... |
| 20 | 14 | + |
| 21 | 14 | - |
| 22 | 14 | + |
| 23 | 13 | - |
| 24 | 13 | + |
| 25 | 15 | + |
| 26 | 15 | + |
| 27 | 14 | - |
| 28 | 16 | - |

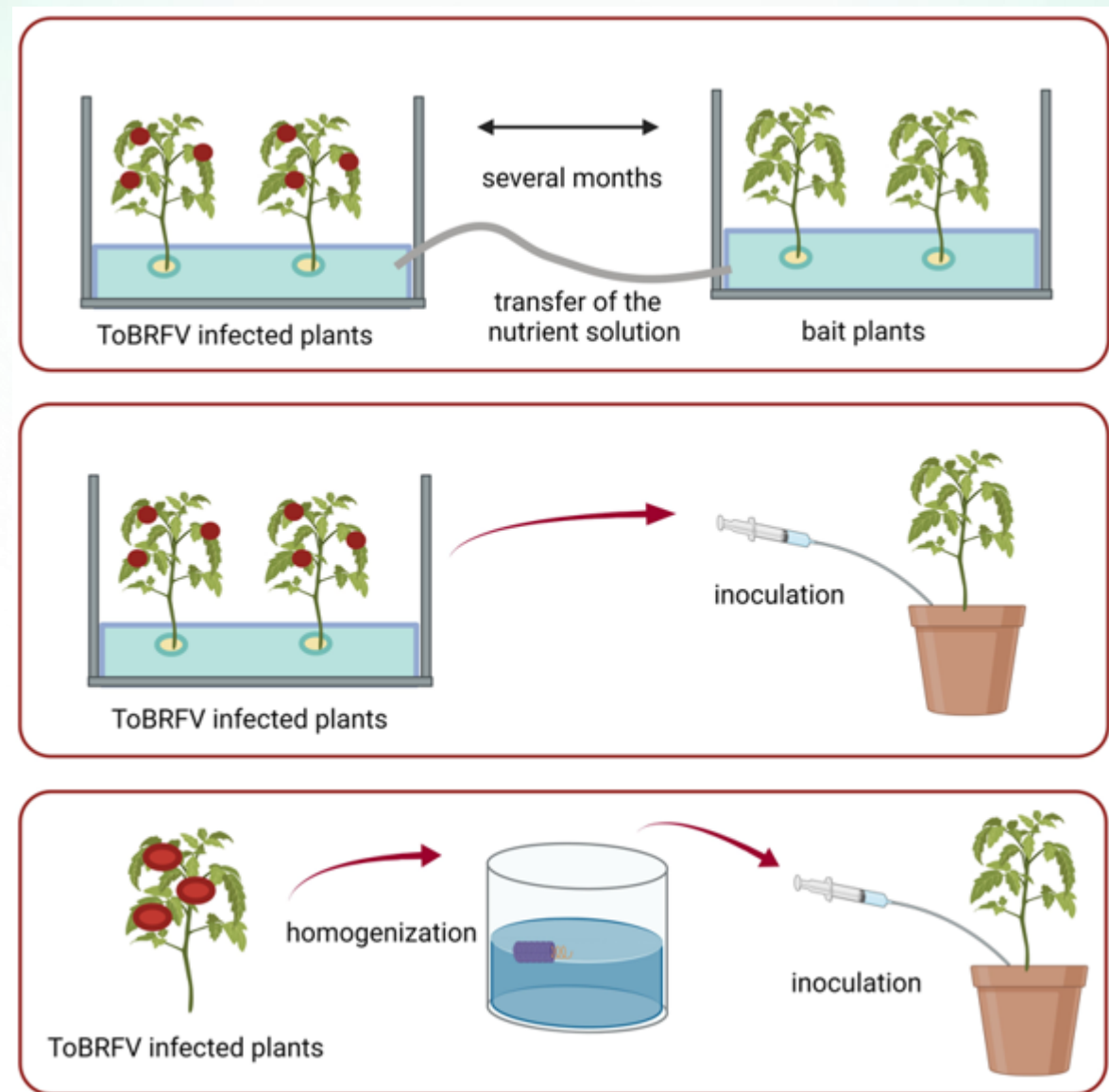
Redčina 10⁻⁴

| RT-qPCR (Cq) | Testne rastline |
|--------------|-----------------|
| 22 | + |
| 21 | - |
| 21 | - |
| 21 | - |
| 21 | - |
| 21 | - |
| ... | ... |
| 20 | NT |
| 19 | NT |
| 20 | NT |
| 20 | NT |
| 21 | NT |
| 21 | NT |
| 22 | NT |
| 21 | NT |
| 23 | NT |

Redčina 10⁻⁶

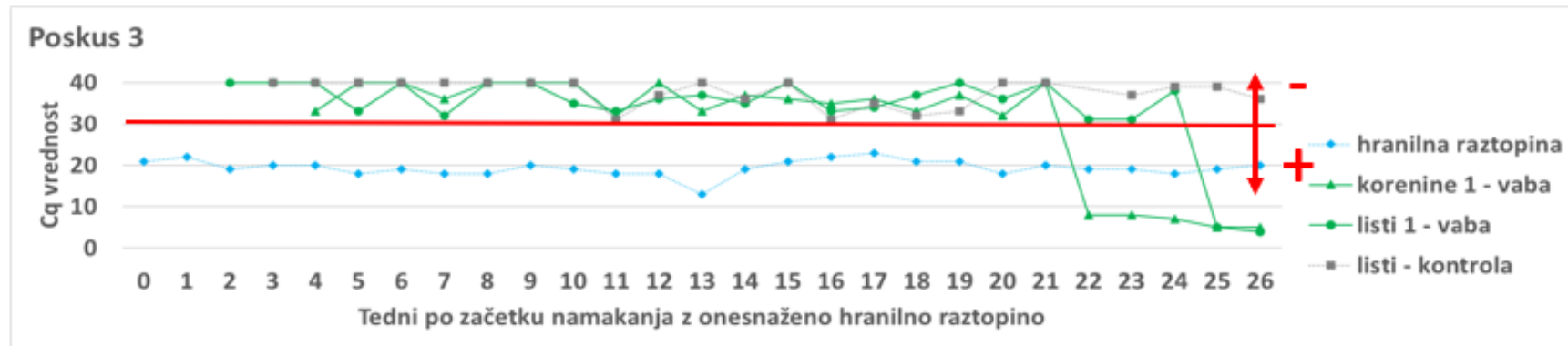
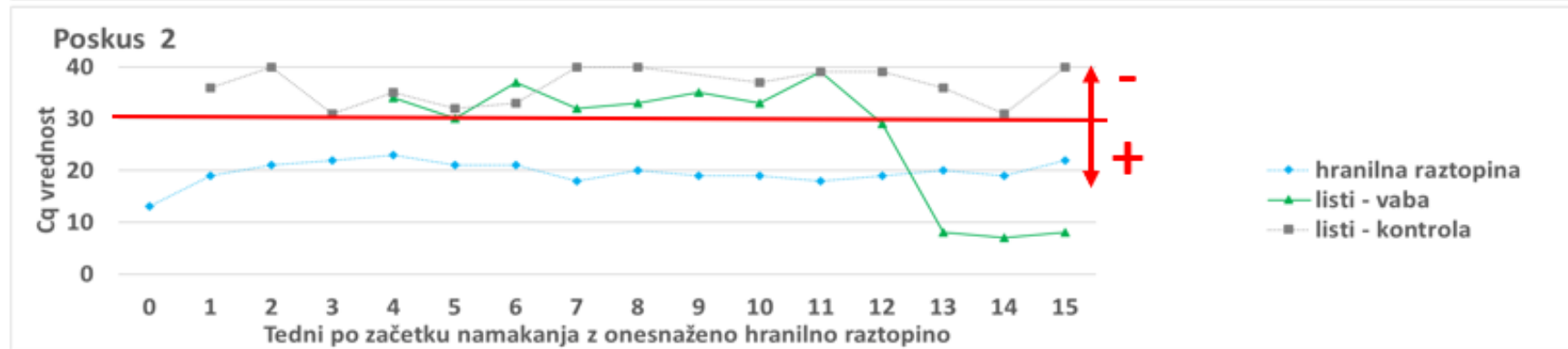
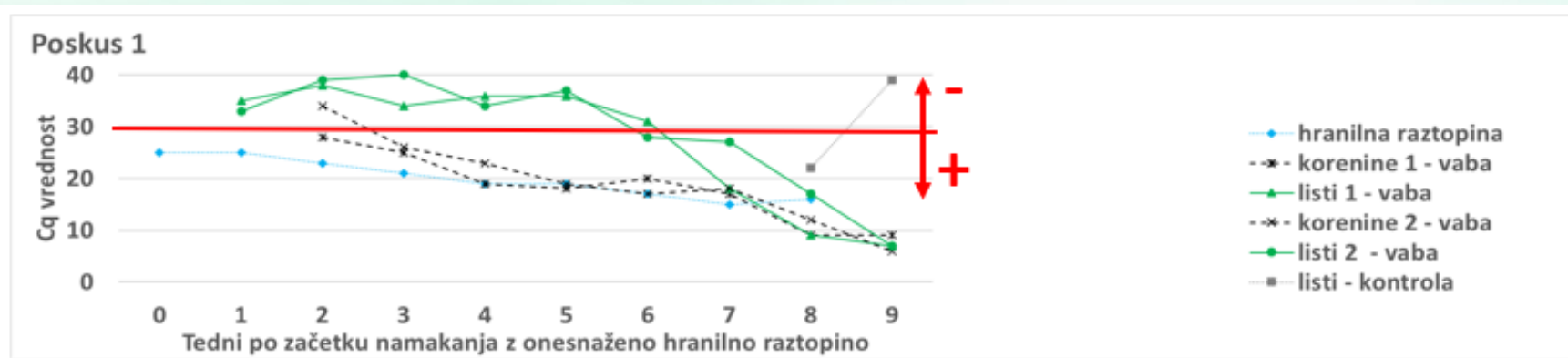
| RT-qPCR (Cq) | Testne rastline |
|--------------|-----------------|
| 28 | - |
| 27 | - |
| 29 | - |
| 28 | - |
| 29 | - |
| ... | ... |
| 33 | NT |
| 33 | NT |
| 34 | NT |
| 35 | NT |
| 34 | NT |
| 33 | NT |
| 35 | NT |
| 35 | NT |
| 32 | NT |

Ali se rastlina, ki raste na hidroponiji/ v rastnem substratu, lahko okuži preko korenin, če za namakanje uporabljamo s ToBRFV/ ToMMV onesnaženo vodo?



ToBRFV

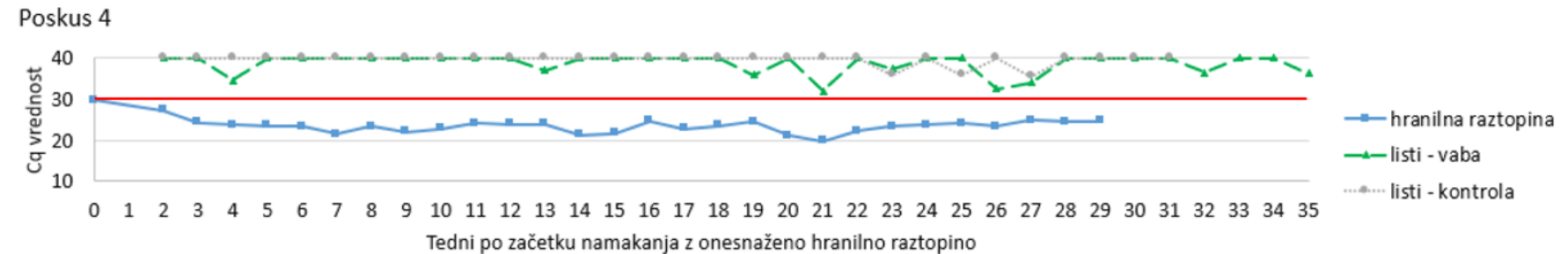
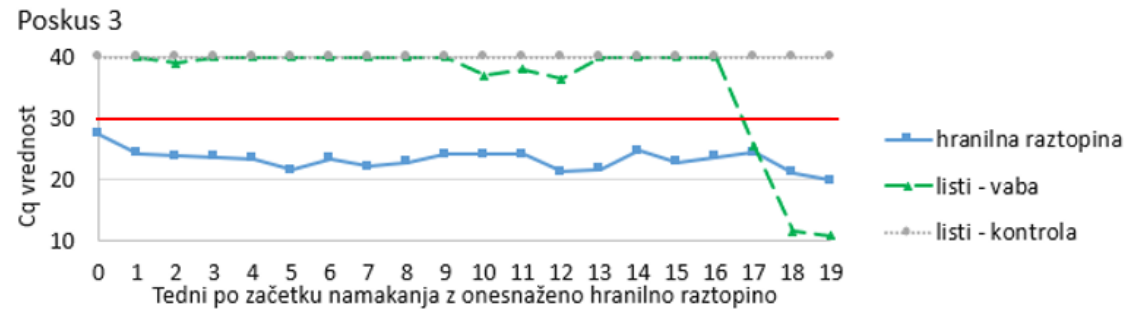
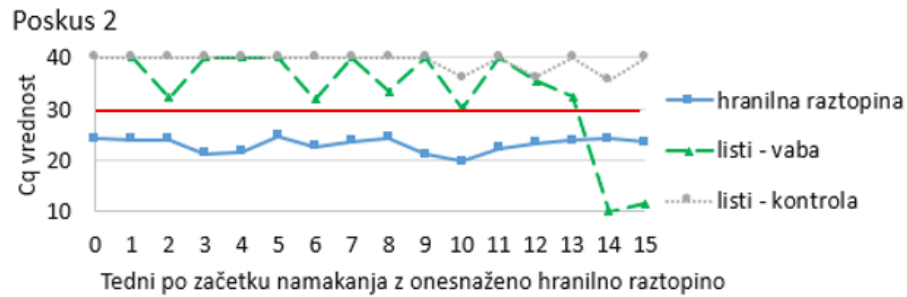
Rast na hidroponiji



Rastlina, ki raste na hidroponiji, se lahko okuži preko korenin, če za namakanje uporabljamo s ToBRFV onesnaženo vodo

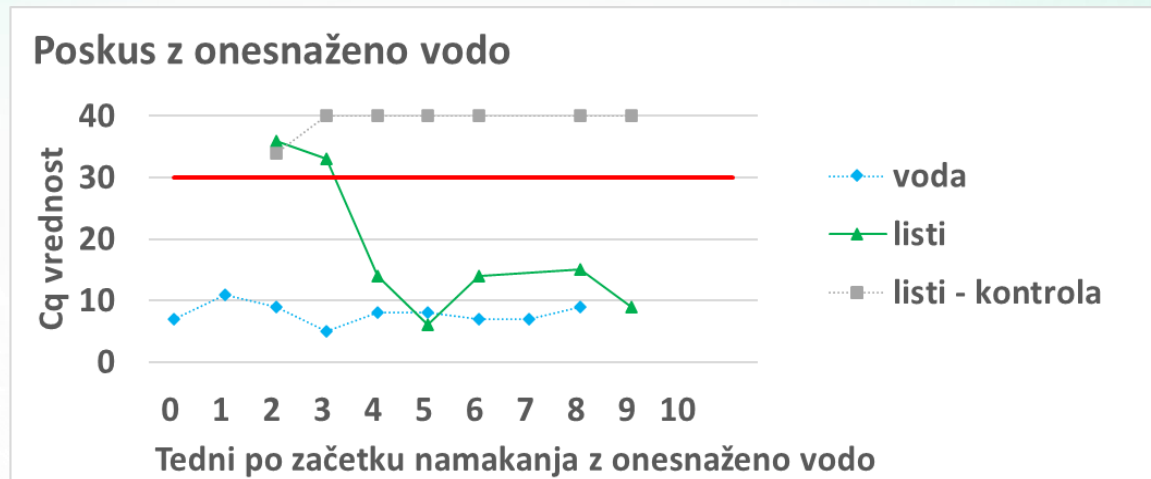
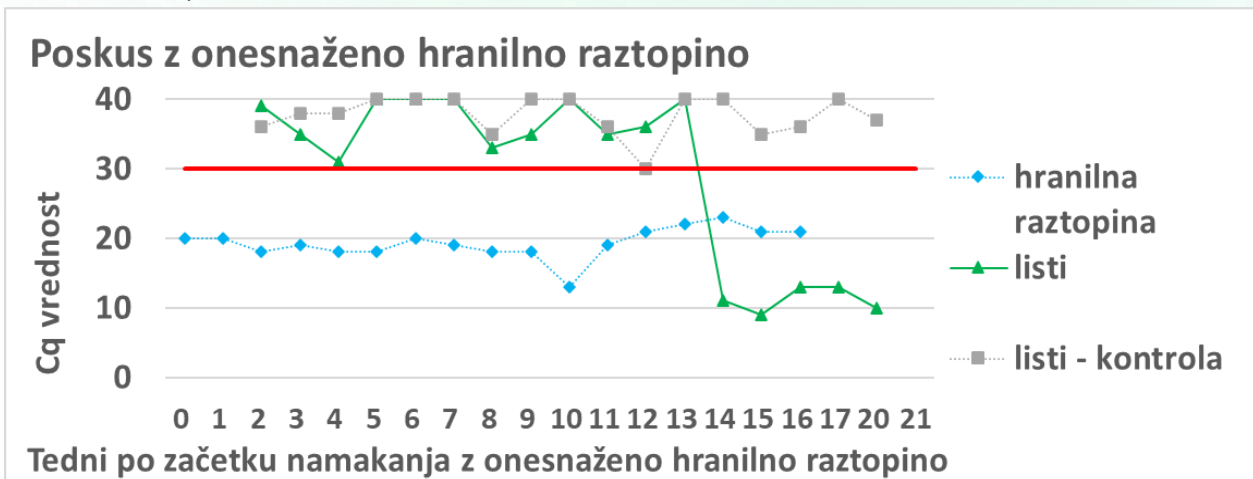
ToMMV

Rast na hidroponiji

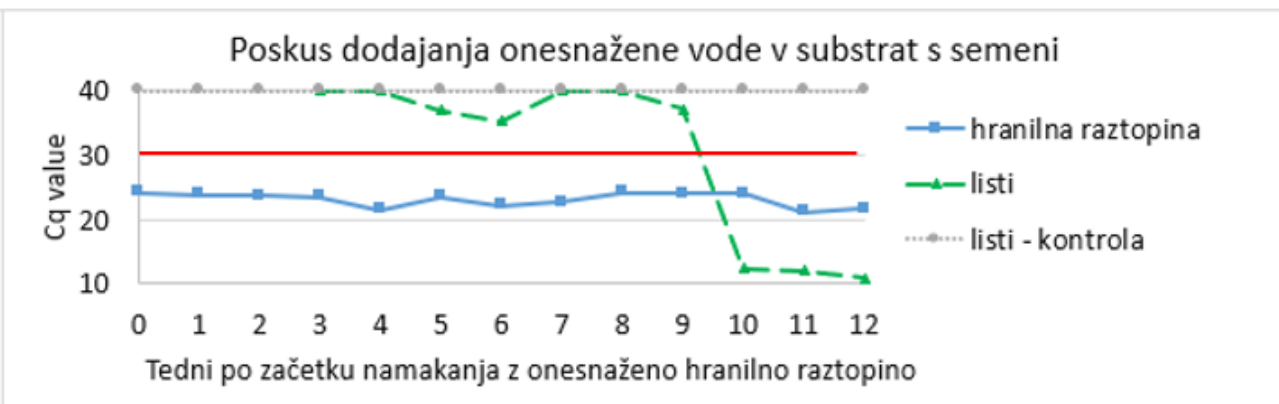
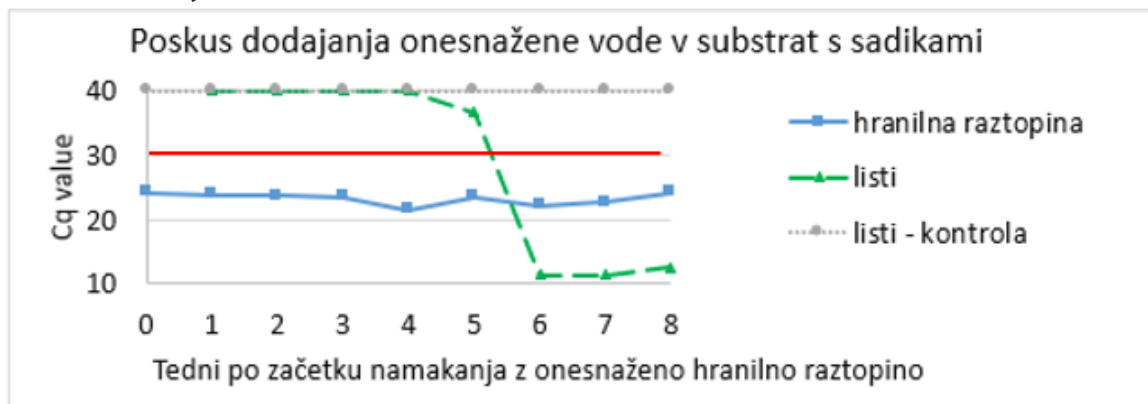


Rastlina, ki raste na hidroponiji, se lahko okuži preko korenin, če za namakanje uporabljamo s ToMMV onesnaženo vodo

ToBRFV; rast v rastnem substratu:



ToMMV; rast v rastnem substratu:



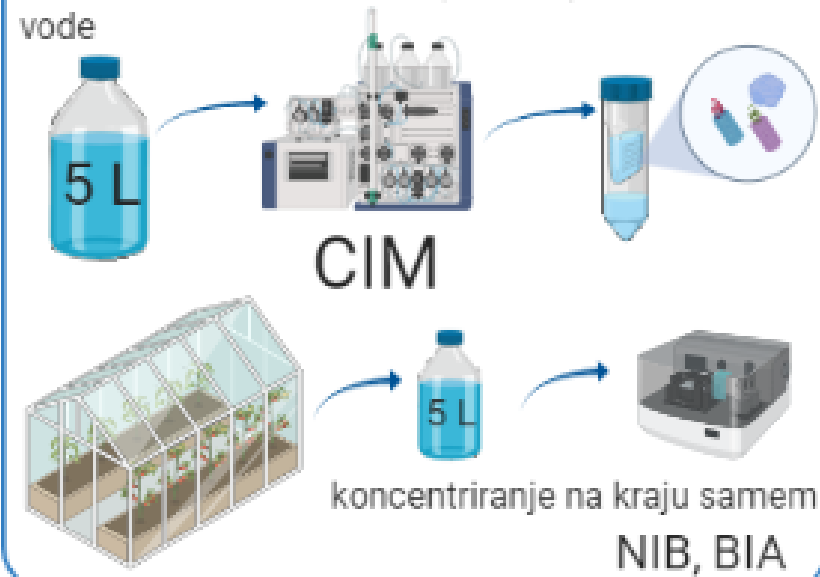
Rastlina, ki raste v rastnem substratu, se lahko okuži preko korenin, če za namakanje uporabljamo s ToBRFV/ToMMV onesnaženo vodo

Pomen ugotovitev iz DP2

- ✓ Razumemo, kako lahko onesnažena voda prispeva k širjenju tobamovirusov
- Pomembno za pripravo zanesljive ocene tveganja (PRA) ter za prepoznavanje kritičnih točk, pomembnih za spremljanje in nadzor bolezni.
- Pomen uvedbe novih tehnik varstva rastlin tako pri tradicionalnem kot hidroponskem gojenju rastlin, kar bi lahko zmanjšalo finančne izgube zaradi okužb s tobamovirusi.

DP3: Razvoj učinkovitega diagnostičnega postopka za spremljanje porajajočih se tobamovirusov v vzorcih vode

Naloga 3.1: Koncentracija (tobamo)virusov iz vode



Naloga 3.2: Metode odkrivanja in identifikacije tobamovirusov

- validacija specifičnega testa za ToBRFV na vzorcih vode
- razvoj in validacija specifičnega testa za ToMMV
- razvoj in validacija generičnega testa za tobamoviruse



Skice narisane z orodjem BioRender.com

Vzorci vod:

- Nizke koncentracije virusa (ki so lahko še infektivni)
- Reprezentativen vzorec (npr. 5 litrov)



Koncentriranje virusov iz relativno velikih volumnov vodnih vzorcev, npr. na osnovi monolitne kromatografije z uporabo CIM (convective interaction media) diskov



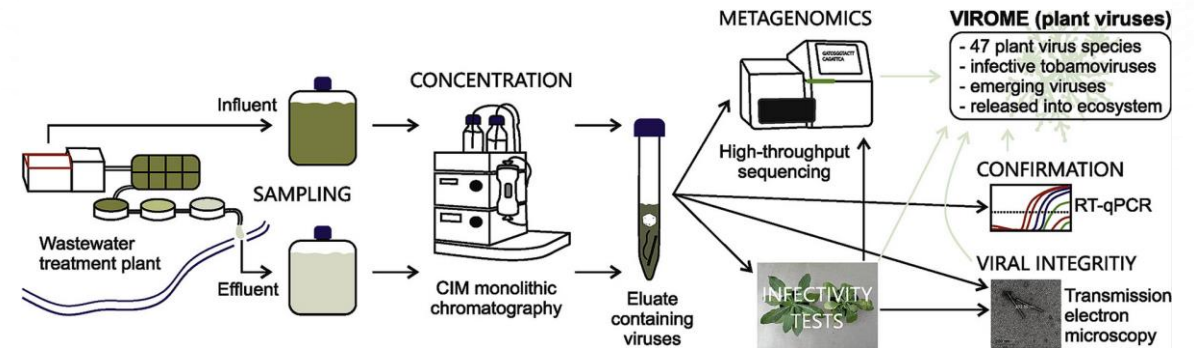
Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment

Katarina Bačnik ^{a,b}, Denis Kutnjak ^a, Anja Pecman ^{a,b}, Nataša Mehle ^a, Magda Tušek Žnidarič ^a, Ion Gutiérrez Aguirre ^a, Maja Ravnikar ^{a,c,*}

^a National Institute of Biology, Department of Biotechnology and Systems Biology, Večna pot 111, 1000, Ljubljana, Slovenia

^b Jožef Stefan International Postgraduate School, Jamova cesta 39, 1000, Ljubljana, Slovenia

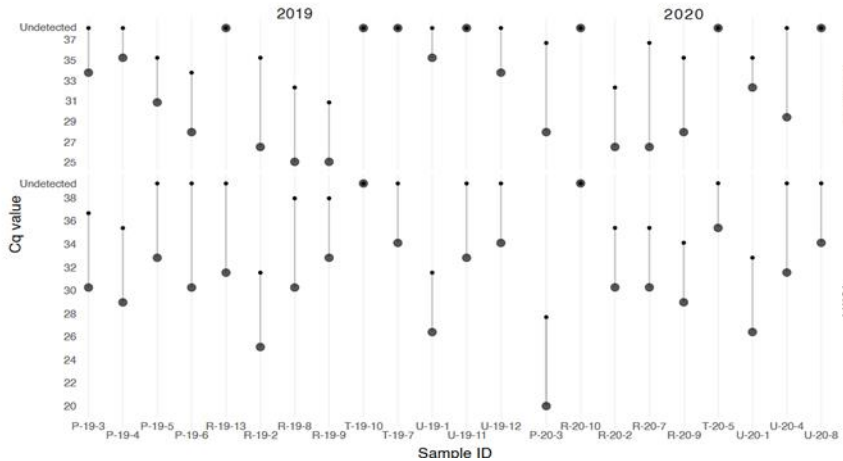
^c University of Nova Gorica, Vipavska cesta, 5000, Nova Gorica, Slovenia



Optimizacija koncentriranja z monolitnimi kromatografskimi kolonami CIM QA: za učinkovito koncentriranje tobamovirusov iz različnih vzorcev vod



Supplementary Figure 9 - Results of RT-qPCR detection for pepper mild mottle virus and tomato mosaic virus for two sampling years (reads divided due to subsampling, as indicated in Supplementary Information 1). Smaller dot represents the results before concentration and larger dot after concentration of the same sample. Length of the line indicates the effect of concentration expressed as decrease in obtained Cq.



Maksimović in sod. 2024 Water research

Table 3 Concentrations achieved by different methods from the same wastewater sample expressed as a reduction in average Cq value, from RT-qPCR replicates (marked as ΔCq ; $n=3$) before and after concentration for each performed assay (N1, N2, PMMoV)

| Concentration method | Start volume (mL) | End volume (mL) | ΔCq N1 | ΔCq N2 | ΔCq PMMoV | Samples per batch | Price per sample | Time per batch |
|--|-------------------|-----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------|
| Centricron Plus-70 Centrifugal Filter Experiment 1 | 100 | 0.5 | 5.1 | 5.9 | 5.7 | 8 | 245 € | 7 h |
| Centricron Plus-70 Centrifugal Filter Experiment 2 | 100 | 0.5 | 6.2 | 5.7 | 4.3 | | | |
| Centricron Plus-70 Centrifugal Filter Experiment 3 | 100 | 0.5 | 4.9 | 5.0 | 6.0 | | | |
| CIMmultus™-QA (8 mL) Experiment 1 | 2000 | 20 | 2.9 | 3.2 | 6.0 | 1 | 1400 € | 10 h |
| CIMmultus™-QA (1 mL) Experiment 2 | 600 | 8 | 3.4 | 3.1 | 5.1 | 1 | 1400 € | 8 h |
| CIMmultus™-SO3 (1 mL) Experiment 1 | 900 | 8 | 1.1 | 2.3 | 0.5 | 1 | 1400 € | 8 h |
| PEG-based concentration Experiment 1 | 35 | 0.4 | 2.6 | 3.4 | 4.9 | 5 | 255 € | 5 h |
| Skimmed Milk-based concentration Experiment 1 | 200 | 0.8 | -1.7 | -0.4 | 4.3 | 8 | 206 € | 8 h |
| Vivacell 100. 30.000 MWCO PES Experiment 1 | 150 | 0.5 | -1.0 | 0.5 | 2.5 | 8 | 248 € | 7 h |
| Wizard Enviro TNA Kit; Experiment 3 | 40 | 1 | 6.7 | 6.9 | 5.4 | 14 | 175 € | 7 h |

Associated sample volume for load (start) and elution (end), number of samples and time used per batch and price per sample are also shown

Maksimović in sod. 2022 Journal of food and environmental virology



Supplementary Material

Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments – survival and significance of water-mediated transmission

Nataša Mehle,[†] Katarina Bačnik, Irena Bajde, Jakob Brodarič, Adrian Fox, Ion Gutiérrez-Aguirre, Miha Kitek, Denis Kutnjak, Yue Lin Loh, Olivera Maksimović Carvalho Ferreira, Maja Ravnikar, Elise Vogel, Christine Vos, Ana Vučurović

* Correspondence: Nataša Mehle: natasa.mehle@nib.si

Supplementary Table 1. Origin of water samples and results of ToBRFV analyses in concentrated samples

| Sample designation | Type of sample | Source | Location | Collecti on year | Cq before concentration | Cq after concentration |
|--------------------|------------------|-------------|--------------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| IN17-Liab | Wastewater | Influent | Central Slovenia location 1 | 2017 | NT | 30 ^b |
| IN19SI02 | Area | River | Central Slovenia location 2 | 2019 | NT | 30 |
| IN19SI06 | Area | Pond | South-west Slovenia location 1 | 2019 | NT | 34-36 |
| IN19SI08 | Irrigation water | River | South-west Slovenia location 2 | 2019 | NT | 28 |
| IN20SI01 | Irrigation water | Underground | Central Slovenia location 2 | 2020 | NT | 38 |
| IN20SI02 | Area | River | Central Slovenia location 2 | 2020 | NT | 28 |
| IN20SI03 | Irrigation water | Pond | South-west Slovenia location 3 | 2020 | NT | 28 |
| IN20SI04 | Irrigation water | Underground | South-west Slovenia location 4 | 2020 | NT | 38 |
| IN20SI05 | Irrigation water | Tap water | South-west Slovenia location 5 | 2020 | NT | 37 |
| IN20SI07 | Irrigation water | River | South-west Slovenia location 6 | 2020 | NT | 30 |
| IN20SI08 | Irrigation water | Underground | South-east Slovenia location 1 | 2020 | NT | 38 |
| IN20SI09 | Irrigation water | River | South-east Slovenia location 2 | 2020 | NT | 29 |
| D691/21 | Irrigation water | Unknown | North-east Slovenia location 1 | 2021 | Undet | 32 ^c |
| D902/22 | Irrigation water | Unknown | North-east Slovenia location 2 | 2022 | Undet | Undet |

Vučurović in sod. 2023 Frontiers in plant science

- Optimiziran postopek smo uspešno uporabili tudi za koncentriranje uradnih vzorcev vod iz nacionalnega programa preiskav za ToBRFV

Koncentriranje tobamovirusov z alternativnimi metodami (ki ne zahtevajo kompleksne opreme in so preprostejše za izvedbo)?

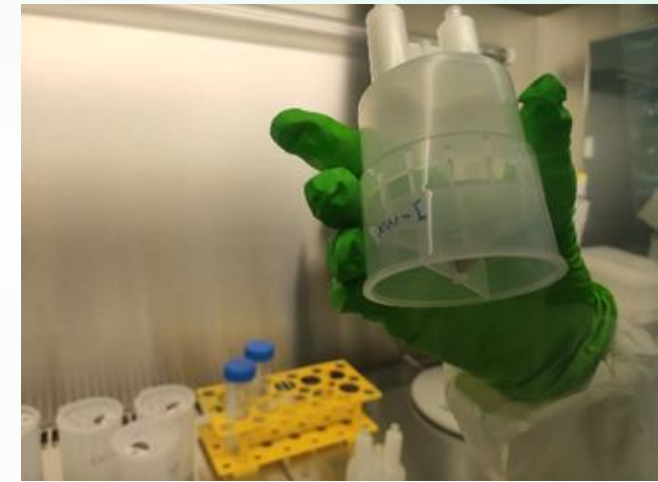
- Centricon, precipitacija s PEG, Promega Enviro TNA kit, flokulacija s posnetim mlekom,...

➤ Centricon filtri in Promega kit sta se na primeru koncentriranja PMMoV izkazala za podobno učinkovita kot CIM QA

Table 3 Concentrations achieved by different methods from the same wastewater sample expressed as a reduction in average Cq value, from RT-qPCR replicates (marked as ΔCq; n=3) before and after concentration for each performed assay (N1, N2, PMMoV)

| Concentration method | Start volume (mL) | End volume (mL) | ΔCq N1 | ΔCq N2 | ΔCq PMMoV | Samples per batch | Price per sample | Time per batch |
|---|-------------------|-----------------|--------|--------|-----------|-------------------|------------------|----------------|
| Centricon Plus-70 Centrifugal Filter Experiment 1 | 100 | 0.5 | 5.1 | 5.9 | 5.7 | 8 | 245 € | 7 h |
| Centricon Plus-70 Centrifugal Filter Experiment 2 | 100 | 0.5 | 6.2 | 5.7 | 4.3 | | | |
| Centricon Plus-70 Centrifugal Filter Experiment 3 | 100 | 0.5 | 4.9 | 5.0 | 6.0 | | | |
| CIMmultus™-QA (8 mL) Experiment 1 | 2000 | 20 | 2.9 | 3.2 | 6.0 | 1 | 1400 € | 10 h |
| CIMmultus™-QA (1 mL) Experiment 2 | 600 | 8 | 3.4 | 3.1 | 5.1 | 1 | 1400 € | 8 h |
| CIMmultus™-SO3 (1 mL) Experiment 1 | 900 | 8 | 1.1 | 2.3 | 0.5 | 1 | 1400 € | 8 h |
| PEG-based concentration Experiment 1 | 35 | 0.4 | 2.6 | 3.4 | 4.9 | 5 | 255 € | 5 h |
| Skimmed Milk-based concentration Experiment 1 | 200 | 0.8 | -1.7 | -0.4 | 4.3 | 8 | 206 € | 8 h |
| Vivacell 100, 30.000 MWCO PES Experiment 1 | 150 | 0.5 | -1.0 | 0.5 | 2.5 | 8 | 248 € | 7 h |
| Wizard Enviro TNA Kit; Experiment 3 | 40 | 1 | 6.7 | 6.9 | 5.4 | 14 | 175 € | 7 h |

Associated sample volume for load (start) and elution (end), number of samples and time used per batch and price per sample are also shown



➤ Centricon filtri učinkoviti tudi za koncentriranje ToBRFV

TABLE 2 Results of RT-qPCR analyses of nutrient solution exposed to ToBRFV-infected plants.

| No. of days ^a | Three infected plants per tray ^b | | | One infected plant and two healthy per tray ^b | | | Three healthy plants per tray ^b | | |
|--------------------------|---|----|-----|--|-------|-------|--|----|-------|
| | D | E | C+E | D | E | C+E | D | E | C+E |
| 2 | Undet | 35 | 35 | Undet | 37 | Undet | Undet | 36 | 36 |
| 5 | Undet | 36 | 30 | Undet | 40 | Undet | Undet | 36 | Undet |
| 7 | Undet | 34 | 28 | Undet | Undet | 36 | Undet | 37 | 37 |
| 9 | 35 | 30 | 24 | 34 | 28 | 25 | Undet | 36 | Undet |
| 12 | 35 | 23 | 17 | 35 | 24 | 20 | Undet | 35 | 32 |
| 14 | 36 | 23 | 17 | 36 | 22 | 15 | Undet | 34 | 31 |
| 16 | 33 | 19 | 15 | 33 | 25 | 18 | Undet | 32 | 34 |
| 19 | 33 | 22 | 15 | 33 | 23 | 15 | Undet | 34 | 28 |

^aDays after exposure of the nutrient solution to the ToBRFV-infected plants.

^bThe nutrient solution was analyzed by M&W RT-qPCR in three different ways: D, directly without RNA extraction; E, RNA extracted; C+E, RNA extracted from the concentrated sample. The average Cq values of three replicates are given. Variation among technical replicates was ±0.7 from the mean Cq. Undet, No signal obtained with RT-qPCR.

Maksimović in sod. 2022 Journal of food and environmental virology

Vučurović in sod. 2023 Frontiers in plant science

Prenosni sistem za koncentriranje tobamovirusov iz različnih vzorcev vod (specifikacije)

NIB sistem preizkušen v praksi



Iskanje primernejšega/
cenejšega materiala za
koncentracijo virusov v
vodnih vzorcih (CIM
monoliti so namenjeni
farmaciji, ne agro
aplikacijam):

- PolyHIPE monoliti

Prenosni „kovček“ (BIA)



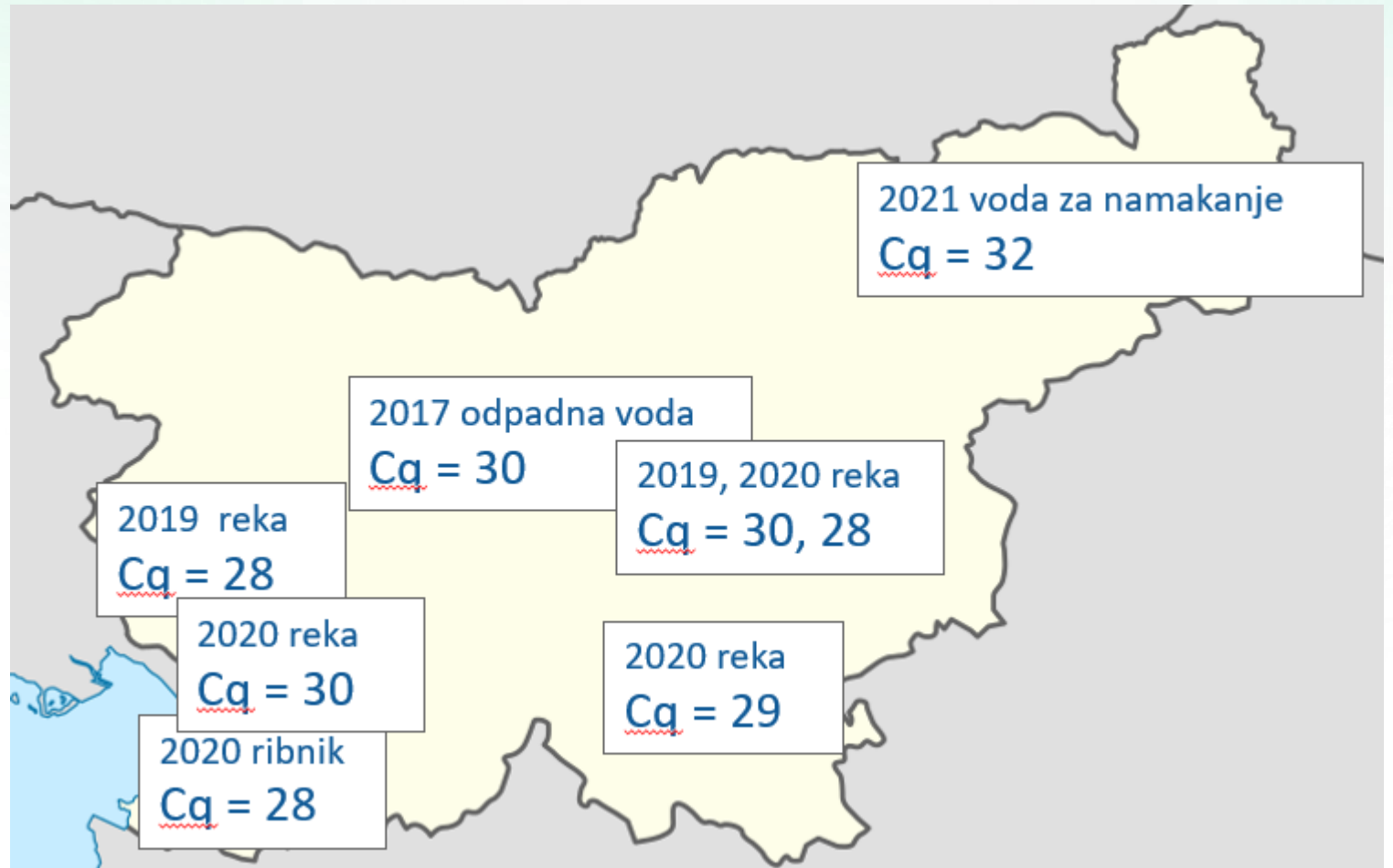
Opomba: Slika je zgolj simbolična

5 L vzorca vode:

- **filtriranje**
(filter papir, membrane – velikost por 0.8 μm)
- **koncentriranje**
(CIM monolithic column, BIA separations)
- **RNA izolacija**
(QIAamp viral RNA mini kit, Qiagen)
- **RT-qPCR**
EPPO PM7/146 (za ToBRFV)

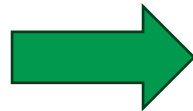


Validacija RT-qPCR za ToBRFV za vzorce vod



Generični testi za določanje tobamovirusov

- Oblikovani in preizkušeni različni za tobamoviruse generični **RT-qPCR**ji
- ni optimalna metoda s katero bi lahko zanesljivo zaznali vse tobamoviruse
- **Ugnezdeni RT-PCR** z začetniki po Dovas in sod. (2004) + **sekvenciranje PCR produkta**



| Tobamovirus | Akronim | NIB ID izolata | Redčitev | Rezultat |
|---------------------------------------|---------|------------------|-----------------------|--------------|
| bell pepper mottle virus | BPeMV | NIB V 363 | 1x | pos (BPeMV) |
| cucumber green mottle mosaic virus | CGMMV | NIB V 403 | 25x | pos (CGMMV) |
| obuda pepper virus | ObPV | NIB V 364 | 25x | pos (ObPV) |
| odontoglossum ringspot virus | ORSV | NIB V 365 | 25x | pos (ORSV) |
| paprika mild mottle virus | PaMMV | NIB V 366 | 25x | pos (PaMMV) |
| pepper mild mottle virus | PMMoV | NIB V 408 | 25x | pos (PMMoV) |
| | PMMoV | NIB V 409 | 1x | pos (PMMoV) |
| ribgrass mosaic virus | RMV | NIB V 367 | 1x | pos (RMV) |
| streptocarpus flower break virus | SFBV | NIB V 368 | 1x | pos (SFBV) |
| sunn-hemp mosaic virus | SHMV | NIB V 369 | 1x | pos (SHMV) |
| tobacco mild green mosaic virus | TMGMV | NIB V 404 | 25x | pos (TMGMV) |
| tobacco mosaic virus | TMV | NIB V 405 | 25x | pos (TMV) |
| | TMV | NIB V 413 | 25x | pos (TMV) |
| tomato brown rugose fruit virus | ToBRFV | NIB V 331 | 25x | pos (ToBRFV) |
| tomato mottle mosaic virus | ToMMV | NIB V 373 | 2.5 x 10 ¹ | pos (ToMMV) |
| | | | 2.5 x 10 ² | pos (NT) |
| | | | 2.5 x 10 ³ | pos (NT) |
| | | | 2.5 x 10 ⁴ | pos (NT) |
| | | | 2.5 x 10 ⁵ | pos (NT) |
| | | | 2.5 x 10 ⁶ | pos (NT) |
| | | | 2.5 x 10 ⁷ | pos (NT) |
| | | | 2.5 x 10 ⁸ | pos (NT) |
| | ToMMV | NIB V 414 | 2x | pos (ToMMV) |
| | | | 20x | pos (NT) |
| tomato mosaic virus | ToMV | NIB V 410 | 25x | pos (ToMV) |
| | ToMV | NIB V 406 | 25x | pos (ToMV) |
| | ToMV | NIB V 411 | 1x | pos (ToMV) |
| | ToMV | NIB V 412 | 1x | pos (ToMV) |
| youcai mosaic virus | YMoV | NIB V 374 | 1x | pos (YMoV) |
| semena paradižnika brez tobamovirusov | / | D1977/23, D93/23 | 25x | neg |
| semena paradižnika brez tobamovirusov | / | D1977/23 | 25x | neg |
| listi paradižnika brez tobamovirusov | / | / | 1x | neg |

Testi za določanje ToMMV

- **Razvit in validiran** (matrix seme, zeleni deli) (v sodelovanju s CREA):
 - ❖ **specifičen RT-qPCR** za ToMMV
 - ❖ RT-qPCR za sočasno detekcijo in razločevanje med ToMMV in ToBRFV

Plants 2022, 11, 489. <https://doi.org/10.3390/plants11040489>

Article

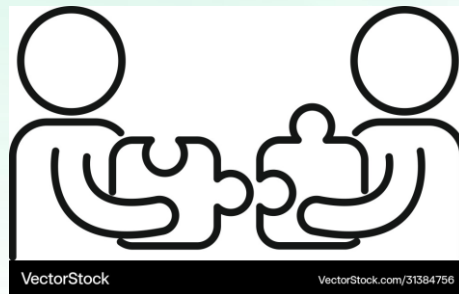
Development and Validation of a One-Step Reverse Transcription Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection and Identification of Tomato Mottle Mosaic Virus and Tomato Brown Rugose Fruit Virus



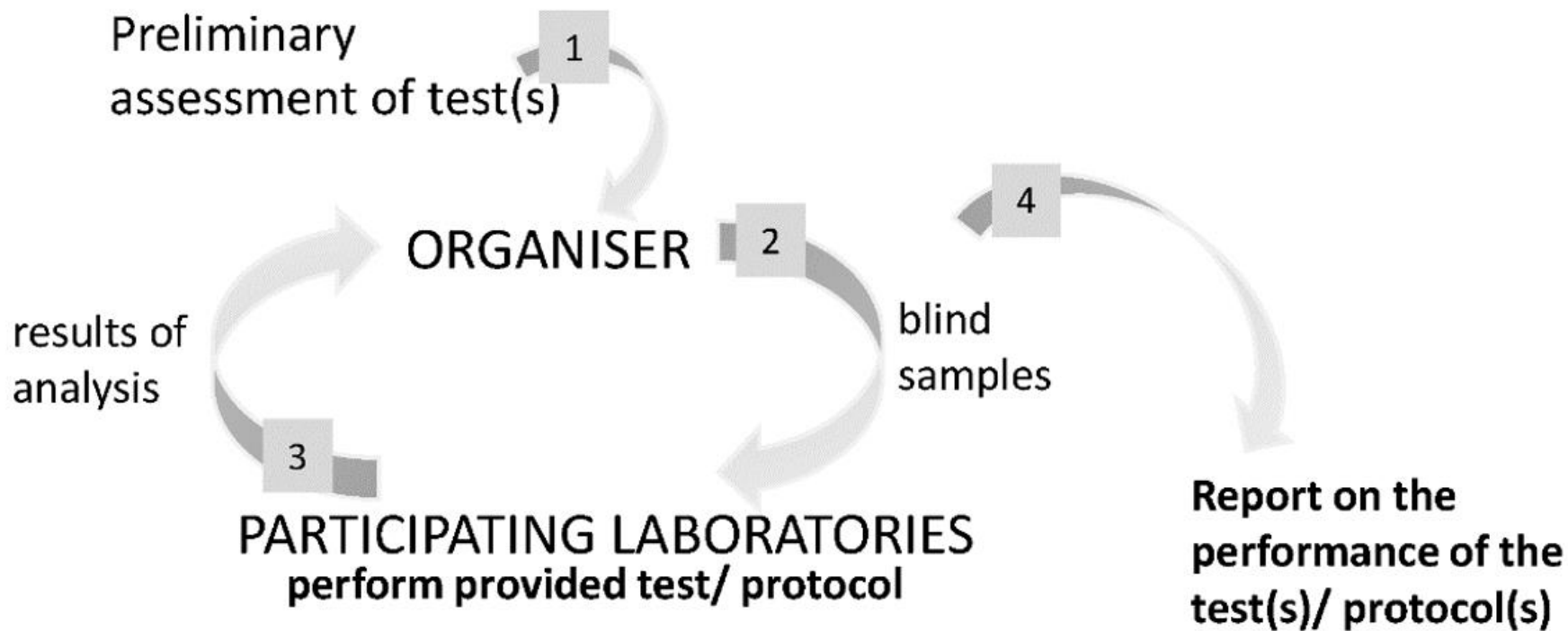
Analiza uradnih vzorcev

Antonio Tiberini ^{1,*}, Ariana Manglli ¹, Anna Taglienti ¹, Ana Vučurović ², Jakob Brodarič ², Luca Ferretti ¹, Marta Luigi ¹, Andrea Gentili ¹ and Nataša Mehle ^{2,3}

- Specifičen RT-qPCR za ToMMV validiran tudi za določanje ToMMV v vzorcih vod
- **Možnost določanja v vzorcih vod „on-site“ z izotermalnimi molekularnimi testi:**
 - ❖ **LAMP** test z oligonukleotidnimi začetniki po Kimura in sod. (2023) (modifikacija) -> (pre)majhna občutljivost
 - ❖ **RPA** (recombinase-polymerase amplicon) test z AmplifyRP® XRT kitom (Agdia) -> možnost zaznave nizke koncentracije ToMMV v vzorcu vode



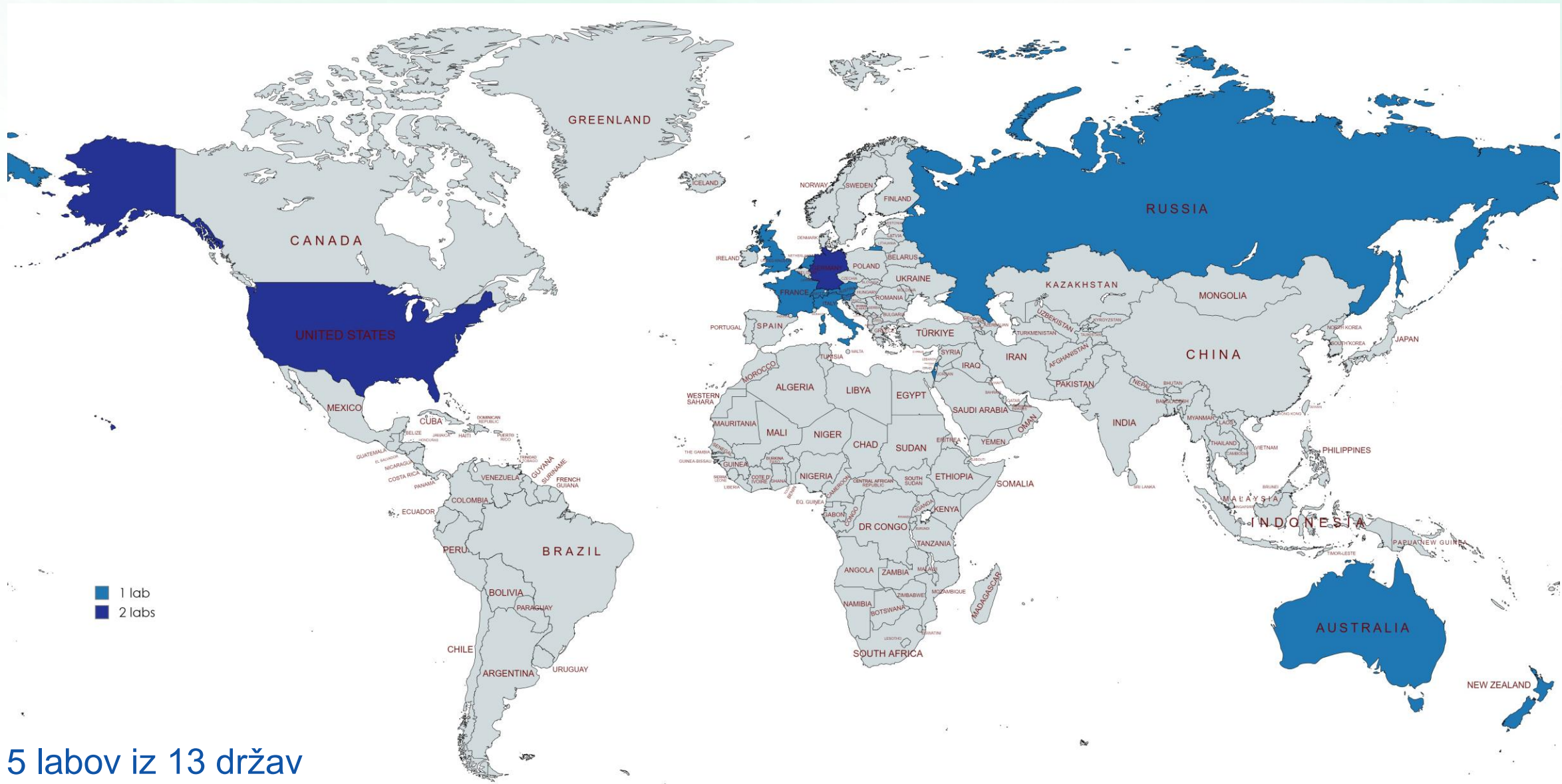
Test Performance Study:



TESTI VKLJUČENI V TPS-ToMMV:

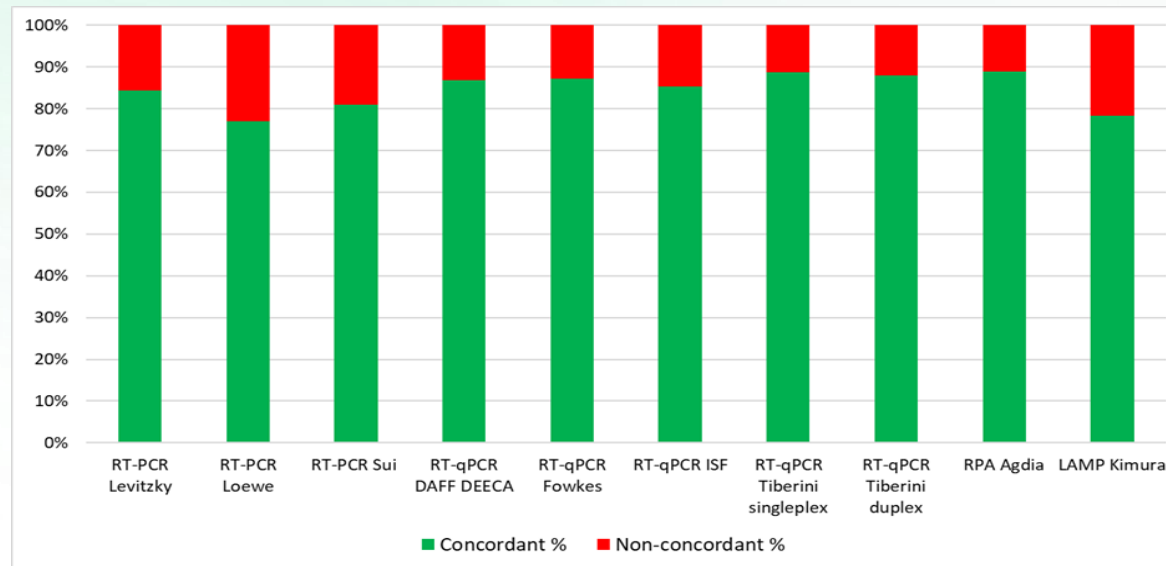
- **RT-PCR**
 - Test from Levitzky et al. (2019) + sequencing of the PCR product
 - Test from Sui et al. (2017)
 - Test from Loewe (Cat. No. 09181)
- **Real time RT-PCR (RT-qPCR)**
 - Test from Tiberini et al. (2022) singleplex / duplex
 - Test from Fowkes et al. (2022)
 - Test from ISF
 - Test from DAFF DEECA
- **Recombinase-Polymerase Amplification (RPA)**
 - Test from Agdia RPA (XCS 22800)
- **Loop-mediated amplification (LAMP)**
 - Test modified from Kimura et al. (2023)

SODELUJOČI V TPS:



Created with mapchart.net

Rezultati za set 22 vzorcev: različni tobamovirusi, različne redčitve ToMMV, vzorci prosti tobamovirusov, različni matriksi (semena in listi paradižnika, drugih rastlin)

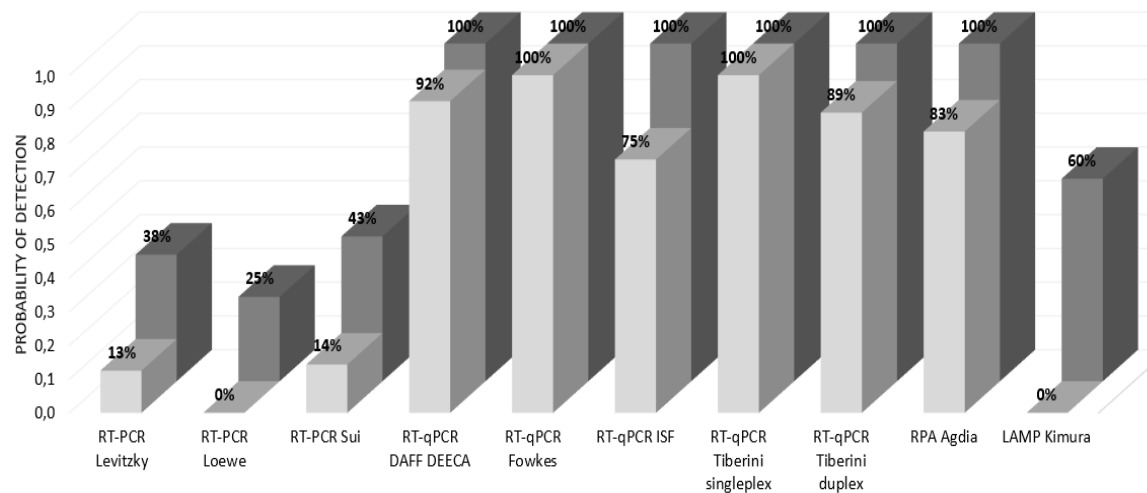


Poročilo objavljeno na spletni strani Euphresco (<https://drop.euphresco.net/data/af730655-4022-4e87-a952-b94cfda3a971/>)



Semena okužena s ToMMV:

■ Redčitev 2x
■ Redčitev 20x



- EPPO database on diagnostic expertise (https://dc.eppo.int/validation_data/validationlist)
- Prvi osnutek EPPO PM7 standarda

ZAKLJUČKI

V projektu smo dosegli vse zastavljene cilje in načrtovane naloge:

- Pripravljen je **katalog zaporedij možnih novih tobamovirusov**, ki omogoča boljšo pripravljenost v primeru pojava oziroma širjenja patogenih rastlinskih tobamovirusov.
- **Razjasnjena je možnost preživetja ToBRFV in ToMMV v vodi in možnost njihovega prenosa** do gospodarsko pomembnih rastlin (paradižnika) z vodo, kar je pomembno za študije ocene tveganja in za načrtovanje strategije ukrepov.
- **Razviti in validirani so zanesljivi, učinkoviti, hitri in relativno preprosti diagnostični postopki** za spremljanje možnega pojava porajajočih tobamovirusov v vzorcih vode in rastlin.

DISEMINACIJA REZULTATOV PROJEKTA – že objavljeni znanstveni članki

TIBERINI, Antonio, MANGLLI, Ariana, TAGLIENTI, Anna, VUČUROVIĆ, Ana, BRODARIČ, Jakob, FERRETTI, Luca, LUIGI, Marta, GENTILI, Andrea, MEHLE, Nataša. Development and validation of a one-step reverse transcription real-time PCR assay for simultaneous detection and identification of tomato mottle mosaic virus and tomato brown rugose fruit virus. *Plants*. 11 Feb. 2022, vol. 11, iss. 4, str. 1-20, ilustr. ISSN 2223-7747. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/4/489>, DOI: [10.3390/plants11040489](https://doi.org/10.3390/plants11040489).

MAKSIMOVIĆ, Olivera, LENGAR, Živa, KOGEJ, Zala, BAČNIK, Katarina, BAJDE, Irena, MILAVEC, Mojca, ŽUPANIČ, Anže, MEHLE, Nataša, KUTNJAK, Denis, RAVNIKAR, Maja, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion. Evaluation of methods and processes for robust monitoring of SARS-CoV-2 in wastewater. *Food and environmental virology*. 23 Aug 2022, str. 1-17, ilustr. ISSN 1867-0334. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12560-022-09533-0>, DOI: [10.1007/s12560-022-09533-0](https://doi.org/10.1007/s12560-022-09533-0).

MEHLE, Nataša, BAČNIK, Katarina, BAJDE, Irena, BRODARIČ, Jakob, FOX, Adrian, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, KITEK, Miha, KUTNJAK, Denis, LOH, Yue Lin, MAKSIMOVIĆ, Olivera, RAVNIKAR, Maja, VOGEL, Elise, VOS, Christine, VUČUROVIĆ, Ana. Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments : survival and significance of water-mediated transmission. *Frontiers in plant science*. 2023, vol. 14, art. 1187920, str. 1-15, ilustr. ISSN 1664-462X. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1187920>, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1187920/full#supplementary-material>, DOI: [10.3389/fpls.2023.1187920](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1187920).

RIVAREZ, Mark Paul Selda, PECMAN, Anja, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIĆ, Olivera, VUČUROVIĆ, Ana, SELJAK, Gabrijel, MEHLE, Nataša, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, RAVNIKAR, Maja, KUTNJAK, Denis. In-depth study of tomato and weed viromes reveals undiscovered plant virus diversity in an agroecosystem. *Microbiome*. 2023, vol. 11, art. 60, str. [1]-24, ilustr. ISSN 2049-2618. <https://doi.org/10.1186/s40168-023-01500-6>, <https://dirros.openscience.si/lzpisGradiva.php?id=16442>, DOI: [10.1186/s40168-023-01500-6](https://doi.org/10.1186/s40168-023-01500-6).

MAKSIMOVIĆ, Olivera, BAČNIK, Katarina, RIVAREZ, Mark Paul Selda, VUČUROVIĆ, Ana, MEHLE, Nataša, RAVNIKAR, Maja, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, KUTNJAK, Denis. Virome analysis of irrigation water sources provides extensive insights into the diversity and distribution of plant viruses in agroecosystems. *Water research*. Feb. 2024, vol. 249, art. no. 120712, str. [1]-15, ilustr., zvd. ISSN 0043-1354. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120712>, DiRROS - Digitalni repozitorij raziskovalnih organizacij Slovenije, DOI: [10.1016/j.watres.2023.120712](https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120712). [COBISS.SI-ID 172665347]

+ 2 v pripravi

DISEMINACIJA REZULTATOV PROJEKTA – predstavitve na konferencah/strokovnih srečanjih

Mednarodne konference/ srečanja:

1. ISFEV 2022 - The Seventh International Conference on Food and Environmental Virology (Santiago de Compostela, Španija, 16.-20.5.2022)
2. 5th ISPVE - Epidemiology and management of plant viruses under a changing climate (Madrid, Španija, 5.-8.6.2022)
3. MSS2022 - Monolith Summerschool and symposium (Portorož, Junij 2022)
4. International conference of the Slovenian Society of Plant Biology (Plants in Changing Environment) (15.-16.9.2022)
5. CEFood, 11th Central European Congress on Food and Nutrition “Food, technology and nutrition for healthy people in a healthy environment“ (Čatež ob Savi, 27.9.2022)
6. AAB, International Advances in Plant Virology (Ljubljana, 5.-7.10.2022)
7. XXXII Plant Protection Forum (Keszthely, Madžarska, 18.-20.1.2023)
8. EURL Virology Workshop - interpretation of ToBRFV results (online, 14.2.2023)
9. 12th International Congress on Plant Pathology - ICPP2023 (Lyon, France, 20.-25.8.2023)
10. 20th Meeting of the EFSA Network on plant health risk assessment (on-line, 6.12.2023)
11. 8th ISFEV Conference, International Society for Food and Environmental Virology (Tokyo, Japan, 9-14.6.2024)
12. Power of viruses (Zadar, Hrvaška, 25.-28.9.2024)

„Domače“ konference/srečanja:

1. 15. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin (Portorož, 1.-2.3.2022)
2. Občni zbor Slovenskega združenja za integrirano pridelavo zelenjave (spletno srečanje, 29.3.2022)
3. Novi izzivi v agronomiji 2023 (Laško, 26.-27.1.2023)
4. Slovenian Microbiome Network Symposium (Maribor, 30.11.-1.12.2023)
5. Varstvo vrtnin - Srečanje s kmetijskimi svetovalci JSKS (UVHVVR organizator) (on-line, 19. december 2023)
6. Usposabljanje za strokovni izpit s področja zdravstvenega varstva rastlin (KIS, 1. 2.2024)
7. 9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva (Maribor, 14.-16. 2.2024)
8. 16. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin (Bohinjska Bistrica, 5.-6.3.2024)

Skupno število izvedenih
predavanj: 22
Število predstavitev v obliki
posterjev: 9

DISEMINACIJA REZULTATOV PROJEKTA – druga javno dostopna poročila o rezultatih raziskav

MEHLE, Nataša, BAJDE, Irena, BRODARIČ, VUČUROVIĆ, Ana. Report on the results of the test performance study on detection and identification of tomato mottle mosaic virus (ToMMV) using molecular tests. Version: V2.0. (17.9.2024). Poročilo objavljeno na spletni strani Euphresco (<https://drop.euphresco.net/data/af730655-4022-4e87-a952-b94cfda3a971/>)

- Podatki iz tega poročila so vključeni in dostopni tudi na EPPO database on diagnostic expertise (https://dc.eppo.int/validation_data/validationlist)
- Pripravljen prvi osnutek EPPO PM7 standarda

Vključenost mladih raziskovalcev, dodiplomskih in podiplomskih študentov

Diplomska naloga:

- KITEK, Miha (mentor Nataša Mehle). Možnost razširjanja virusa rjave grbančavosti plodov paradižnika z vodo : diplomsko delo = Tomato brown rugose fruit virus - the possibility of water-mediated transmission : B. Sc. thesis. Ljubljana, 2022

Magistrska naloga:

- KITEK, Miha (mentor Nataša Mehle; somentor Ana Vučurović). Pomen obstojnosti virusa lisavosti in mozaika paradižnika v vodi za širjenje okužbe: magistrsko delo – v teku (zagovor predviden v začetku leta 2025)

Doktorati:

- MAKSIMOVIĆ, Olivera (mentor Ion GUTIÉRREZ-AGUIRRE). Development and employment of untargeted and targeted tools for virus detection in the frame of water-based epidemiology : PhD thesis. Ljubljana, 2023
- Delno tudi: RIVAREZ, Mark Paul Selda (mentor Denis KUTNJAK). Diversity of viruses infecting tomato and weed plants in agroecosystems : doctoral dissertation = Raznolikost virusov paradižnika in plevelnih rastlin v kmetijskih ekosistemih: doktorska disertacija. Ljubljana: [M. P. Selda Rivarez], 2022.

PRIPOROČILA

- 1. Izboljšanje nadzora nad semenskim in sadilnim materialom:** uvesti strožje kontrole in testiranja na prisotnost tobamovirusov v semenskem in sadilnem materialu, da se prepreči vnos okuženih rastlin v nova okolja. V primeru vnosa tobamovirusov lahko pride do njihovega širjenja na druge rastline, med drugim tudi prek vode za namakanje (kar je še posebej pomembno pri gojenju rastlin na hidroponijah, kjer voda kroži v sistemu).
- 2. Razvoj in uporaba okolju prijaznih dezinfekcijskih tehnik/postopkov, ki učinkovito uničijo tudi stabilne viruse:** spodbujati razvoj in uporabo naprednih dezinfekcijskih tehnik za čiščenje opreme in površin, ki lahko pridejo v stik z okuženimi rastlinami ali vodo, pa tudi dezinfekcijskih tehnik za reciklirano vodo, ki se uporablja za namakanje.
- 3. Izobraževanje in ozaveščanje pridelovalcev:** organizirati izobraževalne delavnice in kampanje za pridelovalce, da se **seznanijo z metodami za preprečevanje širjenja tobamovirusov** ter z **diagnostičnimi postopki za zgodnje odkrivanje okužb**.

PRIPOROČILA

- 4. Osvestiti druge raziskovalce in regulatorje o možnostih**, ki jih za odkrivanje virusov v javno dostopnih bazah podatkov **omogoča podatkovno rudarjenje**.
- 5. Vzpostavitev sistema za spremljanje in poročanje**: uvesti sistem za redno spremljanje prisotnosti tobamovirusov v vodnih virih in poročanje o izbruhih, da se omogoči hitra reakcija in zaježitev širjenja.
- 6. Podpora raziskavam in razvoju**: nadaljevati financiranje raziskav, ki se osredotočajo na odkrivanje novih virusov, ki predstavljajo potencialno nevarnost za gospodarsko pomembne rastline, vključno z razvojem diagnostičnih metod in študijami o možnosti preživetja rastlinskih virusov zunaj gostiteljev (v vodi, zemlji, kompostu itd.), kar je ključno za razumevanje epidemiologije novih virusov in nujno za pravilno načrtovanje ukrepov za učinkovito preprečevanje njihovega širjenja.

T B A M

<http://projects.nib.si/tobamo/>

Zahvala



NACIONALNI INŠTITUT ZA **BIOLOGIJO**
NATIONAL INSTITUTE OF **BIOLOGY**

Nataša Mehle (koordinator projekta)

Denis Kutnjak

Ana Vučurović

Ion Gutierrez Aguirre

Katarina Bačnik

Luka Kranjc

Irena Bajde

Jakob Brodarič

Maja Ravnikar

Olivera Maksimović

Mark Paul Selda Rivarez



Tomaž Curk

Neža Pajek Arambašič



Rok Stravs

- Študent UL, BF (študij Biotehnologije): Miha Kitek
- Fera Science Ltd. (UK)
- CREA (Italija)



Financerji:



REPUBLIC OF SLOVENIA
**MINISTRY OF AGRICULTURE,
FORESTRY AND FOOD**

Vsebinski spremljevalki:

- Anita Benko Beloglavec
- Iris Škerbot