



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

Oznaka projekta L4-3179

Aplikativni raziskovalni projekt, ki ga je financirala Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS), sofinancirala pa Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP) in BIA, podjetje za laboratorijsko in procesno opremo d.o.o.

Partnerji v projektu:

- Nacionalni inštitut za biologijo (NIB)
- Univerza v Ljubljani - Fakulteta za računalništvo in informatiko (ULJ)
- BIA d.o.o (BIA)

Koordinator projekta: Nataša Mehle (NIB)

Sodelujoči:

- NIB: Denis Kutnjak, Ana Vučurovič, Ion Gutierrez Aguirre, Katarina Bačnik, Luka Kranjc, Irena Bajde, Jakob Brodarič, Maja Ravnikar, Olivera Maksimović, Mark Paul Selda Rivarez
- ULJ: Tomaž Curk, Neža Pajek Arambašič
- BIA: Rok Stravs

Neformalna sodelovanja:

- Fera Science Ltd. (Združeno kraljestvo)
- CREA (Italija)
- Študent Univerze v Ljubljani: Miha Kitek

Projekt je bil povezan z mednarodnima Euphresco projektoma 2022-A-394 (Validation of molecular diagnostic methods for the detection and identification of tomato mottle mosaic virus) in 2022-A-392 (Insights into the biology of tomato brown rugose fruit virus: virus survival in soil).

Več o projektu na: <http://projects.nib.si/tobamo/>

Povzetek

Projekt se je osredotočal na raziskovanje porajajočih se tobamovirusov, ki okužujejo ekonomsko pomembne rastline, predvsem paradižnike in paprike, ter na njihovo epidemiologijo, zlasti v povezavi s prenosom preko vodnih medijev. Glavni cilji projekta so bili identifikacija novih tobamovirusov, njihova genetska karakterizacija, preučevanje mehanizmov prenosa in preživetja teh virusov v vodnem okolju ter razvoj učinkovitih diagnostičnih orodij za njihovo spremljanje v vzorcih vode. Raziskava je ugotovila, da lahko infektivni delci tobamovirusov, kot sta virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ToBRFV) in virus lisavosti in mozaika paradižnika (ToMMV), preživijo v vodi več mesecev in se učinkovito prenašajo na rastline preko korenin, kar pomeni, da lahko kontaminirana voda predstavlja pomemben vir širjenja teh virusov. Razvite so bile tudi nove metode za koncentriranje virusnih delcev iz vode in optimizirani diagnostični postopki, ki omogočajo hitro in zanesljivo detekcijo virusov v vodnih medijih. Poleg tega je projekt omogočil pripravo kataloga novih tobamovirusnih sekvenc, ki prispeva k boljšemu razumevanju raznolikosti teh virusov ter bo omogočil hitrejše in učinkovitejše ukrepe za preprečevanje širjenja okužb s tobamovirusi v prihodnosti.

Abstract

The project focused on investigating emerging tobamoviruses that infect economically important crops, primarily tomatoes and peppers, and on their epidemiology, particularly in relation to transmission through water media. The main objectives of the project were the identification of new tobamoviruses, their genetic characterization, the study of transmission mechanisms and survival of these viruses in water environments, and the development of efficient diagnostic tools for monitoring them in water samples. The research found that infectious particles of tobamoviruses, such as tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) and tomato mottle mosaic virus (ToMMV), can survive in water for several months and effectively transmit to plants through roots, indicating that contaminated water can be a significant source of virus spread. New methods for concentrating viral particles from water were developed, and diagnostic procedures were optimized, enabling fast and reliable virus detection in water media. Additionally, the project facilitated the creation of a catalog of new tobamovirus sequences, contributing to a better understanding of the diversity of these viruses and enabling faster and more effective measures to prevent the spread of tobamovirus infections in the future.

Opis problema in ciljev

Rastlinski virusi so odgovorni za znatne izgube pridelka po svetu. **V zadnjem desetletju so zaradi številnih primerov uničenja nasadov poljščin v ospredju porajajoči se virusi rodu *Tobamovirus*.** Za tobamoviruse je značilno, da so njihovi virioni izjemno stabilni (Mutombo in sod. 1992; Bawden & Pirie 1959), obenem pa se hitro in učinkovito razširjajo z različnimi mehanskimi načini (npr. preko ran v rastlinskem tkivu ali fizičnega stika med rastlinami). Za nekatere vrste tobamovirusov že velja, da se tudi pasivno razširjajo preko vod, prsti in s semeni (Dombrovsky and Smith 2017; Mehle in sod. 2018). V preteklosti sta bila najpomembnejša tobamovirusa, znana po hudih izgubah pridelka razhudnikovk, ki jih povzročata, virus mozaika tobaka (TMV) in virus mozaika paradižnika (ToMV). Odkritje in uporaba treh genov za odpornost (*Tm-1*, *Tm-2*, *Tm-2²*) sta signifikantno zmanjšala ekonomsko škodo zaradi okužb poljščin z omenjenima tobamovirusoma (Pfitzner 2006). Vendar so ti geni neučinkoviti pri varovanju rastlin pred okužbo z **virusom rjave grbančavosti plodov paradižnika (ToBRFV)** in nekatere študije nakazujejo, da tudi v primeru okužbe z **virusom lisavosti in mozaika paradižnika (ToMMV)**, **dvema nedavno odkritima vrstama rodu *Tobamovirus***, ki sta posledično odgovorna za uničenje ogromnih količin pridelka (Dombrovsky & Smith 2017).

Virus ToMMV je bil prvič izoliran leta 2013, in sicer iz okuženih paradižnikov, gojenih v rastlinjaku v Mehiki in katerih listi so bili popačeni in mozaično razbarvani (Li in sod. 2013). Rast okuženih rastlin je bila znatno okrnjena, njihovi cvetovi so bili poškodovni, obenem pa rastline niso obrodile (Ambrós in sod. 2017; Sui in sod. 2017). Izbruhi virusa so bili kasneje zaznani v nasadih paprik na Kitajskem, kjer so bili listi rastlin lisasti, zviti in skrčeni ter so kazali znake nekroze (Li in sod. 2014). Simptomi okužbe z virusom ToMMV so se hitro razširili še na druge rastline, kar je značilno tudi za preostale že poznane viruse iz rodu *Tobamovirus*. Kmalu so o okužbah rastlin s ToMMV poročali še iz drugih držav (EPPO GD 2024).

Virus ToBRFV je bil prvič zaznan na rastlinah paradižnika gojenih na polju, katerih listi so poleg značilnega mozaičnega razbarvanja bili še zoženi, plodovi pa so bili prekriti z rumenimi ali rjavimi pikami. Posledica okužbe so bile ogromne izgube pridelka leta 2014 v Izraelu in leta 2015 v Jordaniji (Luria in sod. 2017). Podobno škodo zaradi okužbe z virusom ToBRFV so poročali tudi v različnih nasadih paprik (OEPP/EPPO 2020). Virus naj bi nastal preko rekombinacije virusa mozaika tobaka (TMV) seva Ohio in ToMMV (Mansour and Falk 2016). Po prvi zaznavi virusa ToBRFV v Izraelu in Jordaniji se je ta naglo razširil v številne druge države (EPPO GD 2024).

Glede na gospodarski in biološki pomen razhudnikovk lahko pojav virusov ToMMV in ToBRFV v njihovi pridelovalni verigi primerjamo s pandemijo virusa SARS-CoV-2, ki je izpostavila vpliv porajajočega se virusnega obolenja na vedno bolj globalizirano človeško družbo. Pojav virusa SARS-CoV-2 je obenem sprožil združitev znanstvenih ciljev po svetu, predvsem na področju zbiranja in genomskega karakteriziranja drugih koronavirusov, najdenih pri divjih živalih, kar pripomore k razumevanju njegovega izvora in epidemioloških značilnosti ter izboljša pripravljenost družbe in znanstvene sfere na možne prihodnje izbruhe virusnih obolenj, ki prizadenejo človeka (Lam in sod. 2020). Porajajoči se rastlinski virusi imajo za področje kmetijstva in posledično za dostopnost hrane ter celotno družbo posledice podobnih razsežnosti (Anderson in sod. 2004).

V zadnjem času se torej poroča o pojavu in razširjanju vsaj dveh tobamovirusov, ki povzročata obsežne izgube na področju kmetijstva. Zaradi njihovih fizioloških in bioloških lastnosti sta **za tobamoviruse značilna sposobnost hitrega razširjanja in visok potencial za sproženje epidemije**. Kot velja za iskanje koronavirusov, podobnih virusu SARS-CoV-2, v divjih živalih, bo tudi **iskanje novih tobamovirusov v vzorcih različnih rastlinskih gostiteljev in medijev**

podalo pomembne informacije za preprečevanje pojavljanja in razširjanja rastlinskih patogenov ter njihovega obvladovanja. To bo omogočilo hitrejši razvoj diagnostičnih testov in zagotovilo boljše predvidevanje možnih točk izvora ekonomsko pomembnih virusov, s čimer bi lažje razumeli njihove mehanizme prenosa in zajezili njihovo možno širjenje.

Pretekle študije (Zhang in sod. 2006; Cantalupo in sod. 2011; Aguado-García in sod. 2020) in naši rezultati (Bačnik in sod. 2020) so dokazali, da so nukleinske kisline tobamovirusov (tako zaporedja novih kot že znanih tobamovirusov) prisotne v raznolikih okoljih in vzorcih. Cilj predlaganega projekta je bil poiskati še nepoznane tobamoviruse preko meta-analize obsežnega števila podatkovnih serij zaporedij, pridobljenih iz vzorcev, ki tobamoviruse navadno vsebujejo (npr. odpadne vode, vzorci človeškega in živalskega blata ter transkriptomski podatki različnih vrst rastlin).

Za gojenje rastlin v velikem obsegu so potrebne znatne količine vode. Po nekaterih podatkih poraba pitne vode v kmetijstvu predstavlja več kot 80% svetovne porabe vode (Xinchun in sod. 2017), obenem pa so njene naravne zaloge ogrožene zaradi podnebnih sprememb, kar lahko vodi v globalno pomanjkanje hrane (Murtaza in sod. 2019). Za namakanje poljščin se uporablja bodisi pitna, odpadna voda, podtalnica ali meteorna voda. Tehnološki napredek na področju kmetijstva je spremenil postopke zalivanja in namakanja pridelovalnih površin, vendar so konvencionalne metode, ki se poslužujejo namakanja površja, še vedno najpogostejše uporabljene (Kavianand in sod. 2016). Uporaba odpadnih vod v kmetijstvu torej predstavlja enega izmed načinov zmanjšanja njene porabe, vendar so **odpadne in podobne vode pogosto nizkokvalitetne in mikrobiološko oporečne, zaradi česar zahtevajo stalen nadzor** (Murtaza in sod. 2019).

Porabo lahko zmanjšamo tudi z gojenjem nekaterih vrst rastlin na hidroponiji, kar znatno prispeva k preprečevanju in reševanju težave pomanjkanja vode (Sambo in sod. 2019). Vendar pa **kroženje vode in hranil v hidroponičnem sistemu omogoča hitro in učinkovito razširjanje rastlinskih patogenov po celotnem nasadu**, česar posledica v primeru neustreznega ukrepanja so izbruhi (Stewart-Wade 2011). Pretekle študije so že dokazale, da odpadne vode predstavljajo možni vir okužbe rastlin z nekaterimi stabilnimi virusi (Mehle & Ravnkar 2012; Mehle in sod. 2014), vendar je potrebno poudariti, da je bila **stopnja preživetja v vodi raziskana za zgolj peščico patogenih rastlinskih virusov, pri čemer je znanje o njihovem prenosu preko vodnega medija še manj obsežno in dovršeno**. Možnost preživetja virusa ToBRFV v vodnem okolju in njegova sposobnost razširjanja ter okuževanja rastlin preko vode za namakanje še ni bila poznana. Te informacije so ključnega pomena za določitev njegovega epidemiološkega potenciala in izvedbo analiz tveganja. **Podobno znanje je potrebno tudi za razumevanje mehanizmov prenosa in lastnosti virusa ToMMV** ter drugih (ponovno) porajajočih se tobamovirusov.

V sklopu mednarodnih konferenc so strokovnjaki s področja rastlinske virologije z nami delili svoje skrbi in domneve glede vloge, ki jo imajo vodni mediji pri prenosu patogenih rastlinskih virusov. Pomisleke so izrazili tudi znanstveniki iz Jordanije in Izraela, kjer se kmetje soočajo z uničujočimi posledicami izbruha tobamovirusa ToBRFV, a jim primanjkuje znanja oziroma ustreznih metod potrebnih za izvedbo monitoringa vod. Poleg tega je v stik z nami stopilo ameriško podjetje, ki se ukvarja s hidroponično pridelavo paradižnika na velikem nivoju in ki je bilo zaradi izbruha virusa ToBRFV v njihovih nasadih primorano zavreči večinski delež gojenih rastlin. Podjetje kljub analizi možnih virov virusa in uvedbi strogih higienskih ukrepov ni uspelo odstraniti tobamovirusa iz pridelovalne verige. Posledično so se osredotočili na namakalno vodo, vendar zaradi pomanjkanja komercialnih diagnostičnih metod (npr. kitov in uporabniku prijaznih protokolov) niso bili uspešni pri zaznavanju možne prisotnosti virusa v njej. Zato so se s prošnjo po analizi namakalne vode obrnili na naš laboratorij (NIB), a se je težava, ki je onemogočila izvedbo teh analiz, pojavila že pri transportu potrebnih velikih količin

ohlajene vode v laboratorij. Navedeni in trenutno aktualni primeri nazorno prikazujejo **potrebo po definiranih in standardiziranih metodah zaznavanja ter spremljanja porajajočih se rastlinskih virusov v vodnih medijih**.

Kot osnovno smo v predlaganem projektu za koncentriranje vod uporabili monolitno kromatografijo, s katero smo že uspeli skoncentrirati infektivne tobamoviruse iz odpadnih voda (Bačnik in sod. 2020). Sledilo je vrednotenje nadomestnih metod koncentriranja, pri čemer smo se osredotočili na preprostost tehnik, odsotnost potrebe po kompleksni in dragi opremi ter na njihov potencial za uporabo na terenu. Obenem smo testirali vpliv zmanjšanja volumna vzorčene vode z litrskega na mililitrsko območje na učinkovitost zaznave tobamovirusov v njej. Tehnike z navedenimi lastnostmi bodo omogočile preprostejši in dostopnejši nadzor nad odpadnimi vodami tako v laboratorijih kot tudi v nasadih samih.

Kljub postopkom koncentriranja so virusi v vzorcih vode lahko še vedno prisotni v prenizki količini da bi jih lahko zaznali s konvencionalnimi metodami, obenem pa predstavljajo znatno fitosanitarno tveganje, saj so za okužbo rastlin največkrat potrebni le nizki titri patogenov (Mehle in sod. 2018). Posledično se za zaznavanje tobamovirusov v odpadnih vodah priporoča uporaba metod z visoko občutljivostjo, kot je kvantitativni PCR v realnem času z reverzno transkriptazo (RT-qPCR). Glavna pomanjkljivost takšnih molekularnih testov je ravno njihova specifičnost – posamezni test je namenjen zaznavanju zgolj enega patogena, pri čemer za mnogo tobamovirusov takšen test še ni razvit. To nakazuje, da bodo pri analiziranju odpadnih vod nekateri pomembni patogeni tobamovirusi pogosto spregledani.

Obenem zaradi intenzivne pridelave poljščin, visokega selekcijskega pritiska, usmerjenega žlahtnjenja rastlin, obsežnega trgovanja s semenskim in sadilnim materialom ter sočasnih okužb z različnimi virusi v kmetijstvu obstaja tveganje za pojav novih vrst tobamovirusov. Tako je nevarnost pojava in izbruha novih vrst tobamovirusov stalno prisotna, zaradi česar so redno vrednotenje metod za njihovo zaznavanje in identifikacijo ter harmonizacija rezultatov še toliko pomembnejša. Da se izognemo tej težavi je smiselna uporaba metod visoko zmogljivega sekvenciranja (HTS) (Huang in sod. 2019).

Za reševanje potencialnih težav, kot je pojav virusa ToBRFV v namakalnih vodah, pri hidroponiki in sorodnih tehnikah gojenja poljščin, je potrebno vzpostaviti načine stalnega nadzora. Kot velja za večino postopkov koncentriranja, so metode, trenutno uporabljene za zaznavanje nizkih titrov in velike raznolikosti patogenih rastlinskih virusov, dolgotrajne in delovno zahtevne, za njihovo izvedbo pa so obvezni dobro opremljen laboratorij ter visoko usposobljeno osebje. Rešitev tega izziva je v optimizaciji celotnega diagnostičnega postopka, tako laboratorijskih testov kot testov primernih za uporabo na terenu. V primeru potencialnega izbruha okužb z novimi tobamovirusi bodo metode, razvite in izboljšane v sklopu tega projekta, učinkovale kot prvi nivo varstva rastlin ter preprečevanja nadaljnjega širjenja okužb. To bo skrajšalo odzivni čas ter zmanjšalo tako finančni kot časovni vložek, potreben za preprečitev epidemije okužb pomembnih poljščin.

V okviru projekta smo obravnavali pomembna raziskovalna vprašanja v zvezi z nastankom, epidemiologijo in diagnostiko tobamovirusov. Naši cilji so bili:

- pripraviti katalog zaporedij možnih **novih tobamovirusov** preko pregleda obsežnih podatkovnih serij, pridobljenih iz različnih metagenomskih podatkovnih baz. Rezultati meta-analize bodo omogočili višjo stopnjo pripravljenosti relevantnih organizacij in znanstvene sfere na možno pojavitev in razširjanje patogenih rastlinskih tobamovirusov.
- določiti stabilnost porajajočih tobamovirusov v vodi in možnost njihovega prenosa po vodi, razjasniti vlogo **z vodo povezane epidemiologije** nastajajočih tobamovirusov, ki okužijo poljščine, kar je pomembno za študije ocene tveganja in strategije ukrepov.
- razviti in validirati **zanesljive, učinkovite, hitre in preproste diagnostične postopke** za spremljanje možnega pojava porajajočih tobamovirusov v vzorcih vode.

Kratek povzetek ključnih ugotovitev iz literature

V zadnjem desetletju so principi metagenomike spodbudili raziskovanje in obravnavanje virusov ne le kot povzročiteljev bolezni, temveč tudi kot raznolikih in številčnih pripadnikov ekosistemov. Tehnologije HTS omogočajo tvorbo obsežnih serij podatkov (t.i. »big data«) in zaporedij iz vzorcev, pridobljenih v okoljih z različnimi pogoji. Večina serij pridobljenih podatkov je javno objavljenih in shranjenih v podatkovnih bazah ter so tako znanstvenikom na voljo za dodatne analize, kar omogoča odkritje novih vrst virusov (Phadke in sod. 2019). Za zaznavanje potencialno novih zaporedij v že objavljenih podatkih se uporablja pristop konvencionalne klasifikacije na podlagi poravnave. Ta primerja neznana zaporedja z že identificiranimi in sestavljenimi genomi ter določi njihovo stopnjo prekrivanja oziroma podobnosti. Poleg uporabe klasičnih metod taksonomske klasifikacije se za pregled metagenomskih podatkov in identifikacijo domnevnih virusnih zaporedij lahko uporabijo tudi tehnike strojnega učenja (Bzhalava in sod. 2018). Predhodne raziskave so za določanje novih vrst RNA virusov preko uporabe podatkov transkriptomskih študij prikazale neverjetno raznolikost njihovih genomov (Li in sod. 2015; Shi in sod. 2016). Preko tovrstnih študij je bilo odkritih mnogo novih vrst in drugih taksonomskih stopenj virusov (Zhang in sod. 2018). Iskanje novih virusnih zaporedij predstavlja priložnost za izboljšanje postopkov zgodnjega odkrivanja možnih patogenih rastlinskih virusov, njihovih gostiteljev in optimalnih okoljskih parametrov za njihovo razširjanje, še preden pride do izbruha okužb na rastlinah (Grubaugh in sod. 2019). Tobamovirusi so bili odkriti v izredno raznolikih vzorcih zunaj gostiteljev, zaradi česar je aktivno iskanje novih vrst ključno za boljšo pripravljenost na preprečevanje in zaježitev možnih prihodnjih porajanj patogenih tobamovirusov.

Podatkovni nizi z veliko verjetnostjo, da vsebujejo neraziskana znana in morda nova zaporedja tobamovirusov, vključujejo nabore podatkov iz blata ljudi, okoljskih vzorcev (voda, tla) in nize podatkov, pridobljene iz divjih rastlin (pleveli) in posevkov. Karakterizacija in analize črevesnega viroma ljudi so dokazale, da so v blatu zdravih odraslih oseb poleg bakteriofagov in humanih virusov prisotni tudi rastlinski virusi (Zhang in sod. 2006). Najbolj številčen je bil tobamovirus PMMoV (virus blage lisavosti paprike), ki je v blatu bil v visoki koncentraciji in ohranil sposobnost okuževanja rastlin. Virus PMMoV napada različne sorte paprik, njegova prisotnost v človeškem prebavnem traktu pa izvira iz uživanja z virusom okuženih paprik in prehrabnih izdelkov, proizvedenih iz njih (Peng in sod. 2015; Zhang in sod. 2006). V eni izmed študij so bili v ustno-žrelnem predelu in blatu dojenčkov do enega leta starosti zaznani genomi tobamovirusov, pri čemer sta prednjačila ravno PMMoV in virus mozaika tropskega soda jabolka (Aguado-García in sod. 2020). Kljub prisotnosti virusa PMMoV v človeškem blatu le-ta ni bil zaznan v večini testiranih vzorcev živalskih iztrebkov (Rosario, Symonds, in sod. 2009).

Tobamovirusi so bili zaznani tudi v različnih okoljskih vzorcih, vključno s prstjo (Fillhart in sod. 1998), v oblakih (Castello in sod. 1995) in vodi (Kuroda in sod. 2015). Genomska zaporedja tobamovirusov so bila zaznana tudi v različnih okoljskih vodah, vključno s pitno vodo (Haramoto in sod. 2013), balastno vodo (Haramoto in sod. 2013), namakalnih sistemih (Boben in sod. 2007) in v mestnih ter podeželskih odplakah (Fernandez-cassi in sod. 2018; Cantalupo in sod. 2011). Visoka raznolikost vrst tobamovirusov je bila detektirana v predelanih vodah (Rosario, Nilsson, in sod. 2009) in v odpadni vodi iz vtoka in iztoka ene izmed večjih čistilnih naprav v Sloveniji (Bačnik in sod. 2020). V odpadni vodi v Sloveniji, je bilo odkritih deset vrst tobamovirusov, vključno z genomskimi zaporedji virusa zelene lisavosti mozaika kumare (CGMMV) (Bačnik in sod. 2020), ki je z ekonomskega vidika najpomembnejši rastlinski virus, katerega gostitelji so bučevke (Dombrovsky & Smith 2017). Sekvence virusa ToBRFV so bile prav tako odkrite v vzorcih vtoka, še predno je bil ta virus odkrit na rastlinah v Sloveniji (Bačnik

in sod. 2020). To dejstvo načne vprašanje o njegovem izvoru in prisotnosti v okolju, ki je s trenutnimi metodami ne zaznamo, ter tveganju, ki ga predstavlja njegovo razširjanje z vodo.

Poleg odkritja nukleinskih kislin, je bila v odpadnih vodah iz vtoka in iztoka iz čistilne naprave potrjena tudi prisotnost infektivnih tobamovirusov, kot so PMMoV, ToMV in TMGMV (virus blagega zelenega mozaika tobaka) (Bačnik in sod. 2020). To dokazuje na tveganje, prisotno pri nenadzorovani uporabi sicer prečiščenih odpadnih vod v kmetijstvu. Infektivni tobamovirusi pa niso bili odkriti le v odpadnih vodah. Infektivni delci virusa ToMV so bili zaznani v namakalnih in odtočnih kanalih ter v vodah, ki se stekajo iz gozdov (Büttner & Nienhaus 1989; Pleše in sod. 1996; Jeżewska in sod. 2018). Od drugih tobamovirusov, so bili v rekah, namakalnih in odtočnih kanalih, gozdnih jarkih in v potoku odkriti infektivni virioni virusa TMV (Tošić & Tošić 1984; Koenig & Lesemann 1985; Piazzolla in sod. 1986; Pleše in sod. 1996; Jeżewska in sod. 2018). V eni izmed študij je bil opisan tudi prenos virusa CGMMV iz vode za namakanje na rastline lubenic (Li in sod. 2016). Glede na predstavljene rezultate raziskav in informacije o visoki stabilnosti tobamovirusov je pri vrednotenju tveganja okužb poljščin s porajajočimi se virusi potrebno upoštevati tudi mehanizem njihovega razširjanja preko vodnih medijev.

Potrjen prenos tobamovirusov iz odpadnih vod na testne rastline in prisotnost tobamovirusov v odpadnih vodah kaže, da se lahko infektivni rastlinski virusi v okolje preko odpadnih vod naglo razširijo na območja, do katerih pod naravnimi pogoji nimajo dostopa. V primeru stabilnih tobamovirusov, kot sta virusa ToBRFV in TMMoV, lahko infektivni virusni delci odpadne vode dosežejo že po uživanju z virusom okuženih plodov paradižnika in paprike, saj takšni tobamovirusi prestopajo čiščenje in obdelavo vode v čistilnih napravah. Visoka stabilnost jim tako omogoča povratno sproščanje v okoliško vodo in prst, preko katerih lahko nato okužijo še večje število rastlin. Zaradi možnosti pričetka epidemije okužb poljščin je posebno pozornost potrebno nameniti globalnemu trgovanju s plodovi paradižnika in paprike, kjer bi se moralo uvažati zgolj če so certificirani s strani fitosanitarnega organa, ki tako zagotavlja, da plodovi niso okuženi z virusom ToBRFV (OEPP/EPPO 2020).

Zaradi možnosti prenosa patogenih tobamovirusov z vodo, se lahko pojavnost obolenj poljščin (vključno s paradižnikom in papriko) in možnost negativnih vplivov na ekosistem sunkovito poveča (Mehle in sod. 2018). Številna vprašanja, trenutno aktualna na področju znanosti o kmetijstvu in virologiji, zadevajo vpliv razširjanja rastlinskih virusov preko vode in njihovega preživetja v vodnih okoljih na varnost povečane uporabe odprtih in zaprtih hidroponičnih sistemov (Mehle in Ravnikar 2012). Gojenje rastlin brez uporabe prsti je namreč vedno pogostejše uporabljena metoda v kmetijstvu. V zaprtem sistemu se raztopina hranil, že dovedena rastlinam, zbere, obnovi in reciklira, v odprtem sistemu pa se te ne obnavlja ali reciklira, lahko pa se jo zbere (Stanghellini in Rasmussen 1994). Tehnika gojenja brez prsti prinaša prednosti predvsem kmetom, ki se soočajo s težavami, kot so prisotnost nematod in talnih patogenov ter pomanjkanje oziroma neuravnovešenost hranil v okoliški prsti (Schnitzler 2004; Stanghellini in Rasmussen 1994). V hidroponskem sistemu bo večina rastlin večkrat inokuliranih ne glede na to, ali je bil patogeni virus prisoten v izvorni napajalni vodi ali je vanjo vstopil tekom kroženja po sistemu. Zato je pred ponovno uporabo vode za gojenje poljščin potrebno natančno ovrednotiti tveganje za okužbo in posledično možno izgubo celotnega pridelka (Bandte in sod. 2009).

Do pričetka tega projekta je bilo izvedenih le peščica podrobnih raziskav o prenosu rastlinskih virusov preko vode, pri čemer se nobena ni osredotočila na razširjanje porajajočih se tobamovirusov. V eni izmed naših raziskav smo prenos virusa mozaika pepina (PepMV; poteksvirus), virusa Y krompirja (PVY; potivirus) in viroida vretenatosti gomoljev krompirja (PSTVd; pospiviroid) z vodo v hidroponičnih sistemih že potrdili (Mehle in sod. 2014). V tej pionirski študiji smo dokazali, da virus PepMV v vodi sobne temperature ostane stabilen do treh tednov, virus PVY do enega tedna, viroid PSTVd pa pri enakih pogojih ostaja stabilen do

sedem tednov. Ti patogeni lahko iz korenin izstopajo v raztopino hranil, se z njo prenašajo po celotnem sistemu ter okužijo preostale rastline. Vanje vstopijo preko korenin in se razširijo do ozelenelih delov, v katerih se prisotnost virusa lahko zazna po nekaj mesecih. Tekom poskusov smo opazili, da lahko okužbe korenin ostanejo omejene na ta rastlinski organ ali pa se razširijo. V tem primeru se okužba s precejšnjim časovnim zamikom prenese na poganjke rastlin in se neenakomerno izrazi po celotni rastlini. Izsledki študije nakazujejo, da voda morda ni najpomembnejši medij za prenos virusov PepMV, PVY in viroida PSTVd med rastlinami, vendar pa kljub temu omogoča okužbo posameznih rastlin. Pri tem se lahko virusi in viroidi naglo prenesejo na druge rastline preko vektorjev, mehanskih postopkov ali drugih načinov, ki ne vključujejo razširjanja z vodo. Zaradi visoke stabilnosti in hitrega razširjanja virusov PepMV in PVY, viroida PSTVd ter drugih tobamovirusov je pri raziskavah prenosa virusov preko vodnih medijev potrebno upoštevati še navedene dodatne načine razširjanja. Poleg tega se je pri interpretaciji rezultatov potrebno zavedati, da lahko stabilni tobamovirusi rastline okužijo ne le preko korenin, temveč tudi ozelenelih delov rastlin. Virus v tem primeru v rastlino vstopi preko mikroskopskih ran, ki se lahko na njeni površini pojavijo zaradi vetra ter ob postopku zalivanja oziroma namakanja in drugih kmetijskih dejavnostih (Mehle & Ravnikar 2012).

Namen projekta je bil potrditi vse več dokazov iz literature, ki kažejo, da je voda pomemben dejavnik v epidemiologiji tobamovirusov, in oceniti, ali je potrebno uvesti spremljanje prisotnosti virusov v vodnih virih, ki se uporabljajo za namakanje, za napovedovanje ali preprečevanje izbruhov virusnih bolezni. Prisotnost tobamovirusov v različnih okoljskih vzorcih poudarja potrebo po razvoju metod za njihovo spremljanje in oceno njihovega potencialnega biološkega vpliva na pridelavo rastlin. Glavne izzive pri zaznavanju in karakterizaciji rastlinskih virusov v vodnih vzorcih navadno predstavljajo nizke, vendar kljub temu infektivne koncentracije živega virusa ter tehnični izzivi pri koncentriranju in zaznavanju proučevanega virusa (Bačnik in sod. 2020). Viruse lahko iz vodnega medija pridobivamo z različnimi načini koncentriranja, ki obsegajo precipitacijo virusnih delcev, ultracentrifugiranje, ultrafiltracijo ali eno izmed adsorpcijskih metod (Fong and Lipp 2005). Metoda, ki jo uporabljamo v zadnjem desetletju in ki nam omogoča koncentriranje rastlinskih in humanih virusov iz relativno velikih volumnov vodnih vzorcev, učinkuje na osnovi monolitske kromatografije z uporabo CIM (convective interaction media) diskov. Za koncentriranje različnih enteričnih virusov in tobamovirusov smo uporabili CIM QA (torej pozitivno nabit kvartarni amin) anionsko-izmenjevalne monolitske kolone (Steyer in sod. 2015; Bačnik in sod. 2020). Z njimi smo iz vzorcev vode iz pipe, vode iz rek in odpadne vode uspešno pridobili izolate virusov PMMoV, ToMV in TMMoV (Bačnik in sod. 2020). Čeprav je opisana tehnika za koncentriranje virusov izredno učinkovita, za njeno izvedbo potrebujemo specifično laboratorijsko opremo, na primer FPLC kromatografski sistem, ter zadostno znanje s področja kromatografije, zato je potreben razvoj v smeri enostavnejših pristopov, ki se lahko uporabljajo na kraju samem ali v laboratorijih z zelo osnovno opremo. Obetavne alternativne metode koncentriranja, za izvedbo katerih uporabnik ne potrebuje specializirane opreme in dodatnega znanja so na primer ultrafiltracija na kolonah Centricon (Millipore) in kiti za ekstrakcijo virusne RNA oziroma DNA iz vzorcev odpadnih vod in koncentriranje le-te (Promega). Slednja se je uporabljala za nadzor nad pojavljanjem virusa SARS-CoV-2 v odpadnih vodah (Ahmed in sod. 2020). Nenazadnje, cilj je tudi preprosta laboratorijska metoda, ki jo lahko uporabnik izvede neodvisno od komercialnih kitov ali filtrov, kot na primer precipitacija s polietilen glikolom (Hjelmsø in sod. 2017).

Zaradi znatnega pomena virusa ToBRFV in tveganja za njegov vnos v in razširjanje po evropskih državah je komisija Evropske unije 26. septembra 2019 uvedla določilo o nujnih ukrepih v primeru pojava tveganja (Commission Decision (EU) 2019/1615), ki je veljalo za države Evropske unije. Obenem so bili diagnostiki, raziskovalci in druge interesne skupine s strani Evropske unije spodbujeni, da sodelujejo pri ovrednotenju in razvoju najbolj zanesljivih in učinkovitih testov za zaznavanje in identifikacijo virusa ToBRFV v vzorcih ter njihovi validaciji. Izvedla sta se dva evropska projekta za validacijo številnih molekularnih testov

(različni RT-qPCR, RT-PCR, LAMP, Agdia AmplifyRP® XRT) za zaznavanje in identifikacijo virusa ToBRFV v rastlinskem in semenskem materialu (evropski projekt H2020 Valitest in projekt Euphresco 2019-A-327), a v nobenem primeru ni bila vključena validacija za namen testiranja vode in tudi ne za namen testiranja vzorcev na kraju samem.

Ker namakalna voda lahko vsebuje tudi druge tobamoviruse, ki se širijo preko vode, je za nadzor nad v kmetijstvu uporabljenimi vodami pomembna uporaba generičnih testov. Z uporabo tehnik HTS smo v najrazličnejših okoljskih vzorcih, vključno z odpadno vodo, zaznali nukleinske kisline različnih tobamovirusov (Bačnik in sod. 2020). Tehnika omogoča pridobivanje celostnih ali skoraj popolnih zaporedij virusnih genomov, zaradi česar je izjemno primerna za identifikacijo virusov (van de Vossenberg in sod. 2020). Ker je HTS časovno zahtevna in predstavlja velik finančni vložek, so šle raziskave v smeri tehnologije Nanopore sekvenciranja (npr. projekt ARRS L7-2632 in projekt Euphresco Virfast 2017-A-243). Prednosti Nanopore tehnologije, izvedene na MinION napravi, predstavljajo predvsem njena kompaktnost, možnost uporabe na terenu in napajanja preko USB-kabla. Obenem je tržno dostopna, relativno hitra in preprosta za uporabo (Chalupowicz in sod., 2018). Za zaznavanje tobamovirusov v okuženih rastlinah se lahko uporablja tudi eden izmed generičnih klasičnih protokolov RT-PCR (Letschert in sod. 2002; Li in sod. 2018; Levitzky in sod. 2019; Menzel in sod. 2019). Glavna pomanjkljivost pri spremljanju vzorcev vode z vsemi omenjenimi generičnimi preskusi je ta, da morda ni mogoče zaznati zelo nizkih koncentracij virusa, kar je pričakovano in tudi pomembno za vzorce vode. Torej, v primeru monitoringa vod za spremljanje morebitne prisotnosti tobamovirusov, potrebujemo občutljive, bodisi za tobamoviruse generične ali pa specifične RT-qPCR teste.

Uporabljen metoda dela

Projekt je obravnaval porajajoče tobamoviruse, ki so sposobni okuževanja ekonomsko pomembnih poljščin, njihov epidemiološki potencial ter mehanizem prenosa preko vodnih medijev. Delo je bilo deljeno na tri delovne pakete (DP), kot prikazuje Slika 1.

DP1 Katalog sekvenc možnih novih tobamovirusov in njihova karakterizacija

Namen prvega delovnega paketa je bilo iskati nove in že poznane tobamoviruse preko meta-analize znatnega števila že objavljenih podatkovnih serij. Zaporedja, ki so bila predmet pregleda, so bila pridobljena z analizo vzorcev odpadnih vod, vzorcev človeškega in živalskega blata ter transkriptoma različnih vrst rastlin. V obliki kataloga smo pripravili zbir zaporedij možnih novih tobamovirusov ter te genomsko okarakterizirali. Obenem smo izvedli še filogenetske analize in analize rekombinacije dobljenih zaporedij virusni genomov.

Naloga 1.1: Zbiranje metagenomskih podatkov za analizo

Iz javnih podatkovnih smo zbrali raznolike serije podatkov iz naključnega (shotgun) sekvenciranja virusne RNA v vzorcih, pridobljenih iz različnih okolij: (i) vzorce odpadnih vod (odplake, vtok, iztok, predelana voda); (ii) vzorce blata (človeško, živalsko); in (iii) tkiva različnih vrst rastlin (poljščine, divje vrste). Podatke smo pridobili iz podatkovne zbirke 1000 Plant (1KP) Transcriptomes in z uporabo orodja Serratus, ki omogoča pregled vseh zaporedij odloženih v največji zbirki kratkih zaporedij (NCBI SRA). S pomočjo orodja snakemake smo razvili programski delotok, ki omogoča avtomatsko analizo takih podatkov in vsebuje različne korake. Surovi odčitki ali *de-novo* sestavljeni kontigi so bili pregledani in opredeljeni z dostopnimi metapodatki, kot so npr. ime izvirne podatkovne serije in podatkovne baze, tip okolja, iz katerih vzorec izhaja, in tamkajšnji že poznani gostitelji tobamovirusov, lokacije vzorčenja, uporabljene tehnologije sekvenciranja.. Na ta način vzpostavljene podatkovne baze smo uporabili v analizah, opisanih v točkah 1.2 in 1.3.

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

Serije podatkov sekvenciranja, pri katerih so bila zaznana zaporedja, podobna tobamovirusnim zaporedjem, so bila izbrana za nadaljnje analize. Skupine odčitkov so bile z algoritmi *de-novo* sestavljanja, kot sta SPAdes (Bankevich in sod. 2012) in metaSPAdes (Nurk in sod. 2017), združene v kontige. Za detekcijo možnih tobamovirusnih zaporedij v zbirkah metagenomskih podatkov je bilo izvedeno iskanje podobnosti med vrstami na proteinskem nivoju, pri čemer so bila prevedena nukleotidna zaporedja iz vzpostavljene podatkovne baze primerjane z bazo podatkov vseh poznanih (klasificiranih in neklasificiranih) proteinskih zaporedij vrst rodu *Tobamovirus*. Pri tem so bili uporabljeni algoritmi, ki so omogočili hitro in občutljivo analizo obsežnih podatkovnih serij virusnih zaporedij na osnovi programskih orodij BLASTx in Diamond za iskanje podobnosti (Buchfink in sod. 2015; Steinegger in Söding 2017; Skewes-Cox in sod. 2014) in za odkrivanje možnih novih vrst tobamovirusov. Vsi ti koraki so bili prav tako dodani v avtomatiziran delotok izdelan s pomočjo orodja snakemake. Serije podatkov sekvenciranja, pri katerih so bila zaznana zaporedja, podobna tobamovirusnim zaporedjem, so bila izbrana za nadaljnje analize. Skupine odčitkov so bile združene v kontige z algoritmi *de-novo* združevanja, kot sta SPAdes (Bankevich in sod. 2012) in metaSPAdes (Nurk in sod. 2017). Rezultat bioinformacijske analize je nova podatkovna serija, ki je bila ponovno pregledana za podobnosti med zaporedji z uporabo zgoraj opisanih pristopov, pri čemer so bili dobljeni kontigi, podobni zaporedjem tobamovirusov, preneseni v novo podatkovno bazo. V podatkovni bazi smo zbrali zaporedja, ki so glede na analize iz prejšnjih točke ustrezala

kriterijem, na podlagi katerih smo sklepali, da morda predstavljajo tobamoviruse. To so bila zaporedja novih in že znanih tobamovirusov.

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

Kontigi, ki niso bili klasificirani kot že poznani tobamovirusi, so bili dalje analizirani z različnimi pristopi. Med seboj izjemno podobni kontigi so bili združeni glede na merila za razmejitev vrst mednarodnega komiteja o taksonomiji virusov (International Committee on Taxonomy of Viruses). Metapodatki povezani z izvornimi vzorci, iz katerih smo pridobili zaporedja, so bili pridobljeni iz podatkovne baze izdelane v točki 1.1. Kontigi izbranih domnevno novih tobamovirusov so bili nato anotirani. Glede na organizacijo genoma tobamovirusov in primerjavo pridobljenih rezultatov s podatki baze InterproScan ter orodij Getorf in Orfipy so bili napovedani možni virusni bralni okvirji. Na ta način smo pridobili neredundanten seznam potencialno novih tobamovirusov.

Naloga 1.4: Filogenetska in rekombinacijska analiza sekvenc tobamovirusov

Za namene razumevanja filogenetskih odnosov med poznanimi in na novo zaznanimi domnevnimi tobamovirusi smo iz podatkovne baze GenBank in obsežne zbirke metagenomskih podatkov RVMT (<https://riboviria.org>) zbrali podatke o zaporedjih virusov, ki so tako uvrščeni v rod *Tobamovirus* ali pa so podobni virusom uvrščenim v ta rod. Izvedli smo številne poravnave zaporedij genomskih sekvenc domnevnih novih vrst z zaporedji že poznanih tobamovirusov. Analize smo opravili na več nivojih – za veliko število zaznanih virusov na podlagi kratkih ohranjenih zaporedij in na podlagi daljših zaporedij za manjše skupine virusov, za katere smo pridobili celotna zaporedja. Za analizo so bile uporabljene filogenetske analize na osnovi pristopov največjega verjetja (Guindon in sod. 2010), kar je omogočilo dodatno klasifikacijo domnevnih novih vrst tobamovirusov.

Za bolj avtomatsko taksonomsko klasifikacijo sestavljenih zaporedij, ki jih pridobimo iz takih podatkov, smo na podlagi simulacij parnih poravnav tobamovirusov in njim sorodnih virusov iz družine *Virgaviridae* pripravili orodje, ki s pomočjo strojnega učenja omogoča tako klasifikacijo. Orodje in njegove prednosti in omejitve smo testirali na reprezentativnem setu znanih tobamovirusov pa tudi na setu zaporedij, ki smo jih pridobili v nalogi 1.3.

DP2 Študija epidemiologije, povezane z vodo

Namen tega delovnega paketa je bil ovrednotiti sposobnost razširjanja porajajočih se tobamovirusov z vodo in možnost njihovega preživetja v vodnem okolju. Pripadajoči poskusi so bili izvedeni z uporabo eksperimentalnega sistema, ki smo ga razvili za druge rastlinske viruse in viroide, ki se prenašajo mehansko (Mehle in sod. 2014). Raziskave stopnje preživetja so določile, kako dolgo lahko izbrani tobamovirusi v vodi preživijo. Razširjanje virusov smo spremljali z uporabo eksperimentalnega hidroponičnega sistema in na primeru gojenja rastlin na substratu, pri katerem se inokulum vbrizga direktno v substrat. Tak pristop nam je omogočal testiranje postavljene hipoteze, da voda predstavlja alternativno pot za infekcijo rastlin z virusoma ToBRFV in ToMMV, ter ovrednotenje učinkovitosti takšne poti prenosa virusov in njenega pomena za pridelovanje poljščin.

Vsi poskusi iz tega DP so bili izvedeni z izolatoma ToBRFV PV-1236 oziroma z izolatoma ToMMV PV-1267, ki smo ju pridobili iz zbirke DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH). V primeru poskusov s ToBRFV smo kot testne rastline uporabili paradižnik cv. Moneymaker, v primeru ToMMV pa paradižnika cv. Roma.

Naloga 2.1 Preživetje ToBRFV in ToMMV v vodnem okolju

Za ovrednotenje možnosti preživetja virusov ToBRFV in ToMMV v namakalnih vodah smo izvedli dva ločena poskusa. Najprej smo izolata virusov ToBRFV in ToMMV namnožili v testnih rastlinah paradižnika. Nato smo njihove liste homogenizirali z uporabo vrečk za ekstrakcijo in ročnega homogenizatorja, ostanke rastlinskega tkiva iz homogenata odstranili ter pripravili različne razredčitve virusa v vodi. Z mehansko inokulacijo testnih rastlin paradižnika smo najprej preverili minimalno koncentracijo virusa v vzorcu vode za uspešno mehansko okužbo testnih rastlin.

Na podlagi tega preliminarne poskusa so bile nato za vsak virus izbrane tri redčine virusa v vodi, s katerimi smo preverjali preživetje. Redčine virusa v vodi smo več mesecev hranili v karantenskem rastlinjaku z nadzorovanimi pogoji. Vsak teden smo testirali vodo z RT-qPCR (razvitim in/ali validiranim v okviru naloge 3.2) z namenom preverjanja prisotnosti virusne RNA. Obenem smo z mehansko inokulacijo 4-5 testnih rastlin paradižnika vsak teden tudi ovrednotili kužnost kontaminirane vode. Mehansko inokulirane testne rastline smo vzdrževali v karantenskem rastlinjaku in 4 tedne po inokulaciji preverili, če so rastline razvile bolezenske znake, z RT-qPCR pa smo preverili, če se je virus v testnih rastlinah namnožil. V študijo je bilo vključenih več kontrolnih rastlin, ki so bile inokulirane z vodo brez dodanega virusa, pri čemer smo odsotnost okužbe prav tako potrdili z molekularnimi testi.

Naloga 2.2 Prenos virusov ToBRFV in ToMMV preko vode v eksperimentalnih hidroponičnih sistemih

Za posamezni testni virus smo oblikovali in pripravili več ločenih eksperimentalnih sistemov hidroponije, vsi pa so se nahajali v karantenskem rastlinjaku z nadzorovanimi pogoji. Rastline paradižnika, mehansko inokulirane z virusom ToBRFV oziroma ToMMV, smo posadili v steklen akvarij (6 rastlin na akvarij velikost $0.6 \times 0.4 \times 0.4$ m), napolnjen z hranilno raztopino. V ločene akvarije smo posadili zdrave rastline paradižnika, ki smo jih imeli za vabo (6 rastlin na akvarij velikost $0.6 \times 0.4 \times 0.4$ m). Slednje smo namakali v hranilni raztopini, pridobljeni iz akvarija okuženih paradižnikov. Pri delu smo bili pozorni, da ni bilo stika med okuženimi rastlinami in t.i. rastlinami za vabo ter med hranilno raztopino in zelenimi deli rastlin. Tekom poskusa smo hranilno raztopino iz akvarija z okuženimi rastlinami prečrpavali vsak teden neposredno do korenin rastlin, ki smo jih imeli za vabo. Naši poskusni pogoji so tako ponazarjali dejanske hidroponične sisteme, pri katere velja, da so lahko rastline v stiku z reciklirano vodno raztopino tekom rastne sezone več mesecev. Za dodatno posnemanje resničnih pogojev v hidroponičnih sistemih, pri katerih se lahko pojavijo poškodbe korenin zaradi makrobiotskih dejavnikov in njihove rasti na stekleni volni, smo v nekaterih od poskusov občasno nežno ali nekoliko bolj grobo premešali korenine okuženih in neinokuliranih rastlin. Vsak teden smo vzorčili zelene dele poskusnih rastlin in hranilno raztopino ter jih analizirali z RT-qPCR (glej točko 3.2). Infektivnost hranilne raztopine smo preverili z mehansko inokulacijo testnih rastlin. Znotraj istega rastlinjaka smo sočasno gojili in analizirali tudi več neinokuliranih kontrolnih rastlin, ter redno izvajali analize sveže pripravljene (kontrolne) hranilne raztopine. V poskusih s ToBRFV smo skušali ovrednotiti tudi parametre raztopine v eksperimentalnem hidroponičnem sistemu z uporabo senzorja, ki omogoča istočasno zaznavanje več parametrov in ki so ga razvili podjetje BIA d.o.o. in preostali člani projekta EUREKA WaQuMoS.

Naloga 2.3 Prenos ToBRFV in ToMMV z vbrizgavanjem onesnažene vode v substrat

Poskusi za izbrana virusa (ToBRFV in ToMMV) so bili izvedeni ločeno v karantenskem rastlinjaku pod kontroliranimi pogoji. Sadike in/ali semena paradižnika smo posadili v prst (ena sadika na lonček), z brizgalko pa vsak teden dodajali sveže pripravljeno vodo z dodanim virusom (ekstrakt okuženih listov z odstranjenimi rastlinskimi ostanki) in/ ali hranilno raztopino

iz akvarija z okuženimi rastlinami. Ob vsakem zalivanju z onesnaženo vodo, smo količino virusa v vodi ocenili z RT-qPCR (glej točko 3.2). V poskus je bilo vključenih več kontrolnih rastlin, zalitih izključno z vodo brez virusa. Redno smo opazovali pojav simptomov, z RT-qPCR pa preverjali prisotnost virusa v novo zrastleh zgornjih listih rastlin.

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

Namen tretjega dela projekta je bil izboljšati že obstoječe teste za nadzor nad porajajočimi se virusi v različnih vzorcih vode in razviti dodatne teste, ki bodo izboljšali zanesljivost diagnostičnih postopkov. Cilj je bil tudi preveriti in pripraviti osnovo za hitre, zanesljive, cenovno dostopne in relativno preproste metode testiranja vodnih vzorcev na terenu.

Naloga 3.1 Koncentriranje (tobamo)virusov iz vode

Preizkusili smo različne postopke koncentriranja tobamovirusov iz različnih vzorcev in različnih volumnov vod. Vzorce namakalne vode z volumnom do 5.0 L smo z uporabo FPLC sistema AKTA pure 25M (GE Healthcare) koncentrirali na 8 mL CIM-QA kolonah. Izvedli smo še korak pred filtracije s filtri z mejno velikostjo por 800 nm. Koncentrirani virusi so bili s kolone sprani s povečanjem koncentracije NaCl, in sicer ali preko izokratskega gradienta ali direktnega spiranja. RNA izolirana iz koncentriranih vzorcev je bila testirana z RT-qPCR. Za povečanje dostopnosti opisane metode za manj specializirane laboratorije in za proizvodnje nasade smo v sodelovanju z industrijskim partnerjem BIA d.o.o. iskali bolj primerne rešitve, pri čemer smo se osredotočili na možnost optimizacije črpalke, detektorja UV-žarkov, ventilov in različnih tipov filtrov za predfiltracijo vzorcev vode. Pri iskanju rešitve smo upoštevali dejstvo, da čista voda potrebuje izjemno preprosto predfiltracijo, pri nekaterih drugih vzorcih (npr. vzorcih vode iz hidroponičnih sistemov) pa je predfiltracijo predvidoma potrebno izvesti večkrat ter da bi za učinkovanje vseh komponent filtrirnega sistema morala zadostovati električna energija iz avtomobilske baterije. Preizkusili smo tudi nov material polyHipe kot stroškovno učinkovitejšo alternativo monolitom CIM za koncentriranje tobamovirusov, da bi ga lahko vključili v specifikacije prototipa sistema/naprave za koncentriranje tobamovirusov iz vode.

Dodatno smo ovrednotili alternativne metode koncentriranja virusa iz različnih vzorcev vod, ki za svojo izvedbo ne zahtevajo kompleksne opreme in dodatnega znanja. V poskuse so bili vključeni vzorci okoljskih vod, ki že naravno vsebujejo nekatere tobamoviruse (npr. PMMoV). Metode, ki smo jih primerjali z razvitim sistemom koncentriranja, so vključevale med drugimi ultrafiltracijo s Centricon 70-10 kDa MWCO enotami, kiti za ekstrakcijo in koncentriranje virusne RNA podjetja Promega ter precipitacija infektivnih virusov s polietilenglikolom. V Za posamezno metodo smo določili časovno učinkovitost ter stroške pridobivanja virusa ter pridobljene rezultate primerjali z lastnostmi naše interno razvite CIM kromatografske metode. Obenem smo določili, ali uporaba manjših začetnih volumnov (npr. ~100 mL za metodi Centricon in Promega) negativno vpliva na občutljivost končne detekcije virusov. Z vzorci nižjih volumnov se namreč lažje rokuje, obenem pa jih je preprosteje transportirati, navadno kar preko običajne pošte.

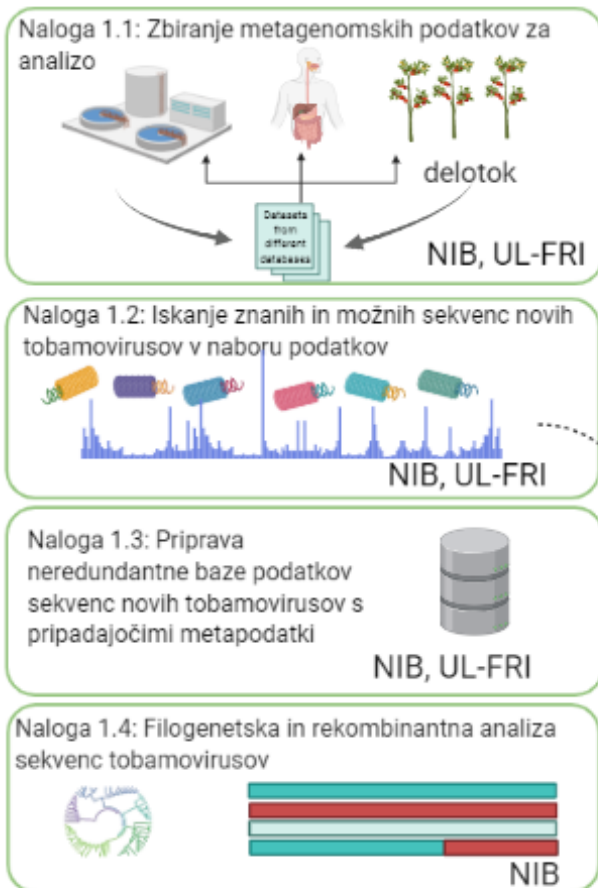
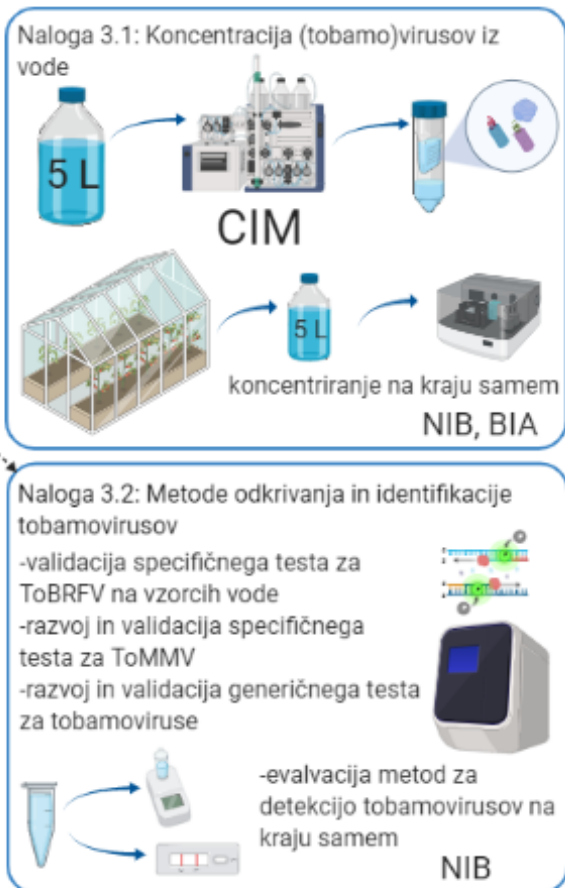
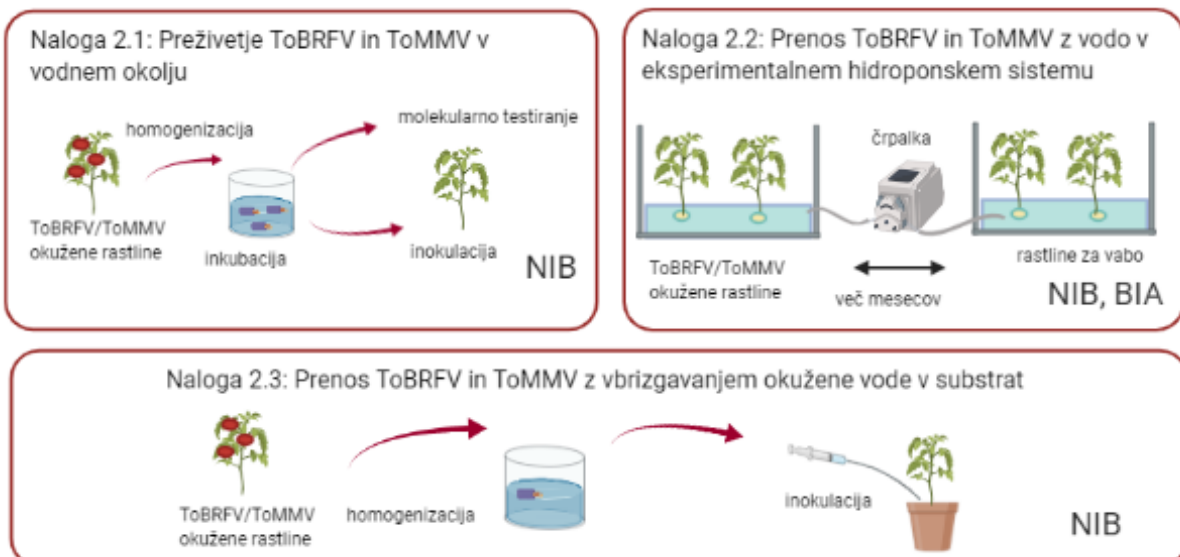
Naloga 3.2 Metode odkrivanja in identifikacije tobamovirusov

Na trgu so na voljo številni molekularni testi za zaznavanje in identifikacijo virusa ToBRFV v vzorcih, vendar noben od njih ni bil validiran za namen testiranja vodnih vzorcev. Posledično smo v okviru tega projekta izbrali visoko občutljiv RT-qPCR (Menzel in Winter, 2020; v nadaljevanju M&W) ter ovrednotili njegovo učinkovitost za zaznavanje ToBRFV v vodnih

medijih glede na zahteve standarda EPPO PM7/98(4). Poleg tega smo ovrednotili teste, ki bi bili lahko primerni za ugotavljanje prisotnosti ToBRFV na terenu – to vključuje komercialno dostopen hiter serološki test (lateral flow immunochromatography; ImmunoStrip®, Agdia, USA) in metodo LAMP (loop-mediated isothermal amplification) (Sarkes in sod. 2020) (slednjo smo evalvirali v sodelovanju s Fera, UK).

V sklopu projekta smo v sodelovanju s CREA (Italija) oblikovali specifičen in občutljiv molekularni test RT-qPCR za ToMMV. Razvit test smo validirali – ocenili njegovo občutljivost, specifičnost ter točnost in natančnost za zaznavanje ciljnega tobamovirusa v različnih medijih, tako v vodi kot tudi v vzorcih rastlinskega tkiva. Za namen ugotavljanja prisotnosti ToMMV na mestu vzorčenja pa smo evalvirali dva izotermalna molekularna testa specifična za ToMMV: RPA (recombinase-polymerase amplicon) test z AmplifyRP® XRT kitom (Agdia, USA) in LAMP test z oligonukleotidnimi začetniki po Kimura in sod. (2023). Teste za ToMMV, ki smo jih razvili oziroma modificirali in evalvirali v okviru tega projekta smo nato skupaj z nekaterimi drugimi testi za ToMMV (RT-PCR Levitzky in sod (2029) + sekvenciranje PCR produkta, RT-PCR Loewe, RT-PCR Sui in sod. (2017), RT-qPCR DAFF DEECA, RT-qPCR Fowkes in sod. (2022), RT-qPCR ISF) vključili v medlaboratorijsko primerjavo testov, ki smo jo organizirali v okviru Euphresco projekta 2022-A-394 (Validation of molecular diagnostic methods for the detection and identification of tomato mottle mosaic virus).

Za zanesljivo evalvacijo vodnih vzorcev, ki morda vsebujejo tudi druge tobamoviruse, sposobne prenosa z vodo, so bila zaporedja, pridobljena iz podatkovne baze NCBI GenBank, uporabljena za poskus razvoja visokoobčutljivih generičnih molekularni testov RT-qPCR, sposobnih detekcije ključnih tobamovirusov. Hkrati je bila preverjena tudi možnost uporabe drugih za tobamoviruse generičnih metod.

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**

Slika 1: Povzetek strukture projekta s podanimi delovnimi paketi (DP) in nalogami ter vključenimi partnerji. NIB, Nacionalni inštitut za biologijo; BIA, BIA d.o.o.; UL-FRI, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za računalništvo in informatiko. Opomba: nekatere podnaloge znotraj naloge 3.2. bodo narejene s pomočjo izmenjave znanja z zunanjo sodelujočo organizacijo, CREA (Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria, Centro di Ricerca Difesa e Certificazione, Rim, Italija).

Rezultati raziskave

V okviru projekta smo pripravili katalog sekvenc možnih novih tobamovirusov in jih okarakterizirali, raziskali možnost širjenja ToBRFV in ToMMV preko vodnih medijev ter razvili, optimizirali in validirali učinkovite diagnostične postopke za spremljanje tobamovirusov v vzorcih vode. V nadaljevanju podajamo podrobnejši opis rezultatov projekta po posameznih delovnih sklopih.

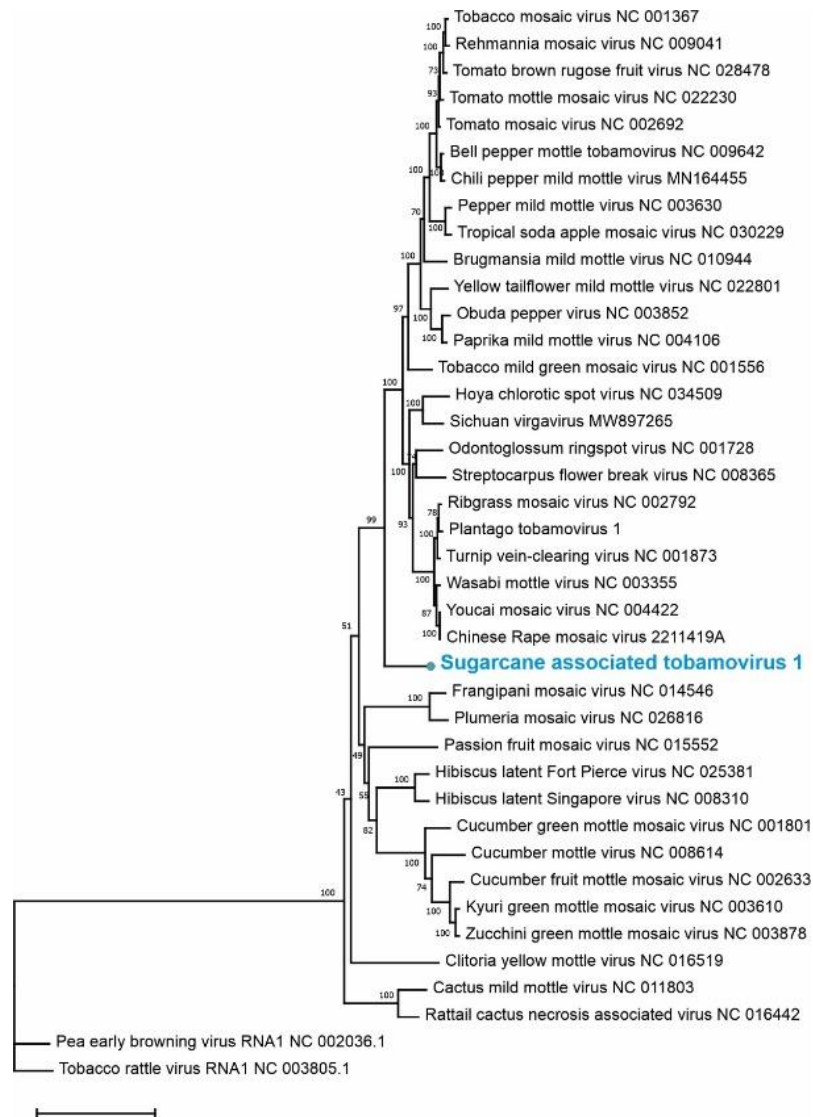
DP1 Katalog sekvenc možnih novih tobamovirusov in njihova karakterizacija

V okviru tega delovnega paketa smo se osredotočili na iskanje novih in že poznanih tobamovirusov preko meta-analize izbranih že objavljenih podatkovnih setov.

Naloga 1.1: Zbiranje metagenomskih podatkov za analizo in

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

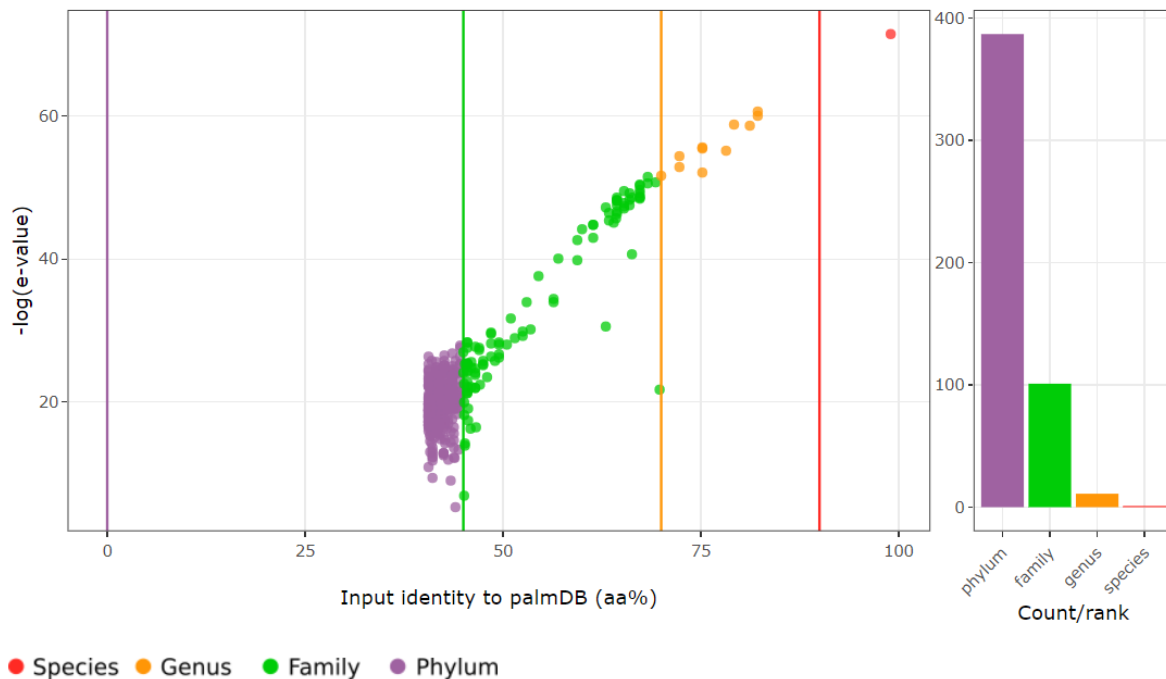
V prvem letu projekta smo začeli z zbiranjem metagenomskih podatkov v okviru Naloge 1.1 in sicer smo se najprej usmerili v nabor transkriptomskih podatkov različnih rastlinskih vrst. Pri tem smo si pomagali s podatki mednarodnega multidisciplinarnega konzorcija imenovanega 1000 Plant (1KP) Transcriptomes, ki je zbral podatke o več kot 1000 rastlinskih vrstah na podlagi tehnologije visokozmogljivega sekvenciranja. Za analizo sestavljenih sekvenc rastlinskih transkriptomov v okviru Naloge 1.2 smo najprej oblikovali bazo podatkov tobamovirusnih proteinskih sekvenc (vklučenih 2177 sekvenc). Sestavljene sekvence rastlinskih transkriptomov smo nato primerjali z uporabo orodij diamond in blastx tako s tobamovirusno bazo kot s celotno proteinski bazo vseh organizmov. Pri rezultatih, ki smo jih pridobili na ta način, smo se osredotočili na zaporedja, klasificirana znotraj družine *Virgaviridae*. Zaznali smo prisotnost celotnega genoma znanega tobamovirusa (*odontoglossum ringspot virus*). Poleg tega smo v nekaterih transkriptomih rastlin zaznali tudi prisotnost potencialnih novih virga-like in tobamo-like zaporedij z relativno nizkimi podobnostmi z znanimi virusi, npr. v podatkovnem setu povezanem s sladkornim trsom.



Slika 2: Odkritje novega tobamovirusa iz podatkov 1000 Plant (1KP) Transcriptomes. Na sliki je prikazan rezultat preliminarne analize: filogenetsko drevo pridobljeno z metodo največjega verjetja, ki je pripravljeno na podlagi poravnave zaporedja domnevno novega tobamovirusa z znanimi predstavniki tega rouda. Gre za virus (označen z modro – Sugarcane associated tobamovirus 1), ki je bil odkrit v metatranskriptomskih podatkih pridobljenih iz sladkornega trsa.

V drugem delu smo nadaljevali z analizo metagenomskih podatkov drugih tipov vzorcev, pri čemer smo za iskanje najbolj perspektivnih vzorcev za naše analize uporabili pred kratkim uporabljeno orodje in bazo podatkov Serratus. Gre za objavo mednarodne skupine znanstvenikov, ki so vzpostavili računalniško infrastrukturo in analizirali sekvenčne podatke iz približno šestih milijonov bioloških vzorcev. Iskali so izključno zaporedje gena od RNK odvisne RNK polimeraze (RdRp) oziroma t.i. palmprint, značilnega za vse RNK viruse. Našli so sledi več kot 130 tisoč različnih potencialnih novih virusov. Pomemben del študije pa je predstavljalo tudi oblikovanje javno dostopne baze rezultatov študije, ki so na voljo raziskovalcem, ki želijo poglobiti analize za specifične skupine virusov ali gostiteljev. Da bi lahko optimalno izkoristili te najnovejše izsledke v okviru Naloge 1.1, smo za iskanje po Serratus podatkih z orodjem PalmID uporabili RdRp zaporedja vseh znanih tobamovirusov. Na ta način smo za vsak znan tobamovirus pridobili seznam metagenomskih podatkov, kjer so bila zaznana zaporedja s podobnostjo temu virusu. Za nadaljnje analize smo izbrali metagenomske podatke, v katerih je bila zaznana identiteta na ohranjenih delih RdRp med 50% in 95%. Izvor tako izbranih

metagenomskih podatkov so bili različni okoljski vzorci (voda, odpadna voda, zemlja), vzorci človeškega in živalskega blata ter različne rastlinske, nevretenčarske in tudi vretenčarske vrste. Za slednje smo z nadaljnjimi analizami pridobili najmanj rezultatov oziroma podobnosti s tobamovirusnimi sekvencami.



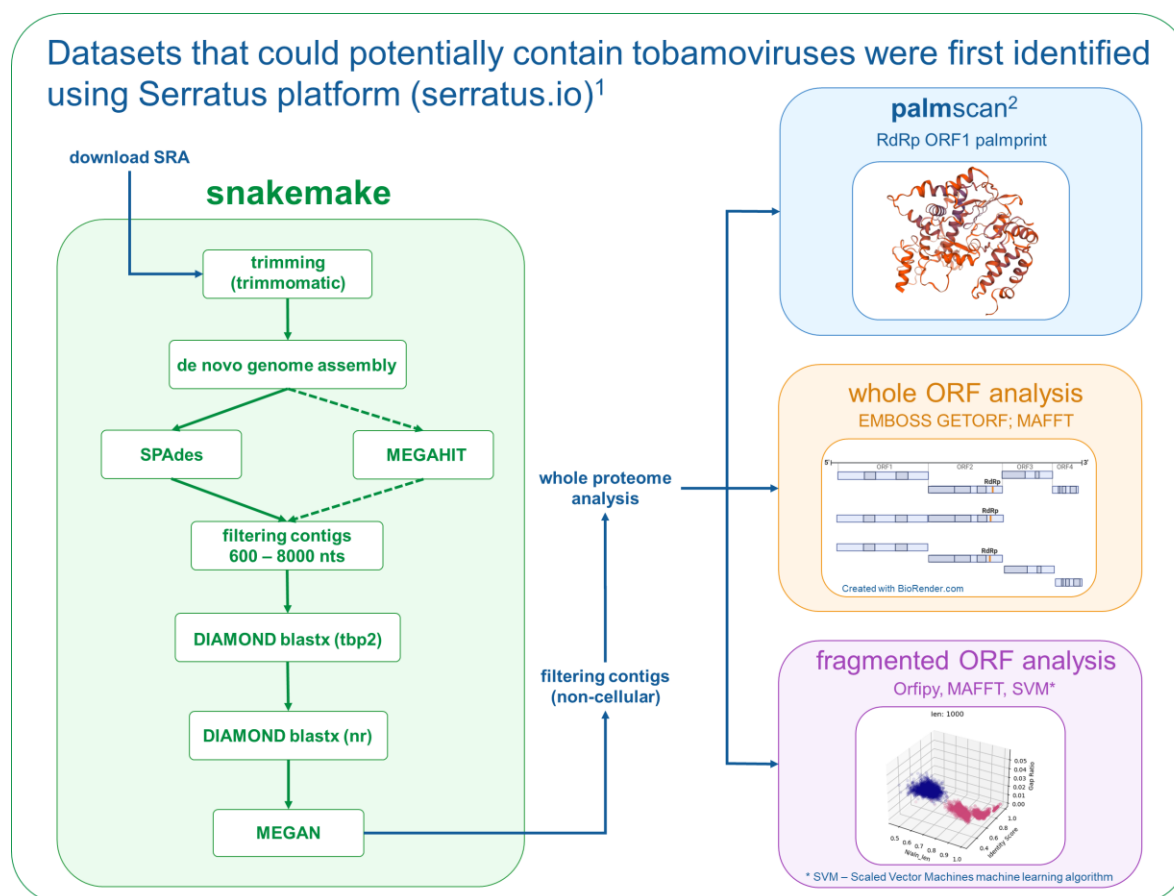
Slika 3: Primer pridobivanja rezultatov s pomočjo orodja Serratus (<https://serratus.io>). Na sliki je prikazan rezultat iskanja zaporedij podobnih virusu zelene lisavosti mozaika kumare, pri čemer vsaka točka predstavlja podatkovni set, ki potencialno vsebuje zaporedja podobna temu virusu. Barve razmejujejo range podobnosti, npr. oranžne točke predstavljajo podatkovne sete, ki bi potencialno lahko vsebovali nove viruse iz istega rodu – taki so bili najbolj zanimivi za naše nadaljnje analize.

Bioinformatične analize za iskanje novih tobamovirusov (Naloga 1.2) v izbranih vzorcih so vključevale različne algoritme (Spades, rna-spades, rnaviral-spades) sestavljanja zaporedij. V nadaljnjo analizo (diamond) sestavljenih sekvenc smo vključili iskanje podobnosti tako z bazo tobamovirusnih proteinov kot s celotno proteinsko bazo vseh organizmov. Za povezovanje različnih korakov analize smo uporabili orodje Snakemake za upravljanje z delotoki. Na podlagi baze Serratus smo v izbranih, že objavljenih, metagenomskih podatkih identificirali 812 unikatnih sekvenc, ki potencialno predstavljajo nove tobamovirusne vrste.

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

Za 812 sekvenc, pridobljenih z zgoraj opisano bioinformatično analizo, smo se želeli prepričati ali pripadajo že znanim tobamovirusnim vrstam, predstavljajo nove tobamoviruse ali pa morda predstavnik drugih ali še ne karakteriziranih novih rodov znotraj *Virgaviridae* družine. Sekvencam smo določili bralne okvirje, znotraj katerih se nahaja polimerazna domena oziroma palmprint (Getorf, Orfipy, PalmScan) in generirali poravnavo zaporedij palmprinta novo zaznanih sekvenc in referenčnih sekvenc znanih tobamovirusov ter drugih predstavnikov sorodnih rodov (MAFFT). Poravnavo smo uporabili za filogenetsko analizo (IQ-TREE), s katero smo identificirali deset skupin potencialnih novih tobamovirusov, ki so vsebovale različno število med seboj podobnih virusnih sekvenc. Na podlagi nukleotidnih poravnav za določitev identitete za posamezne pare sekvenc smo upoštevali kriterij za ločevanje med vrstami (eng.

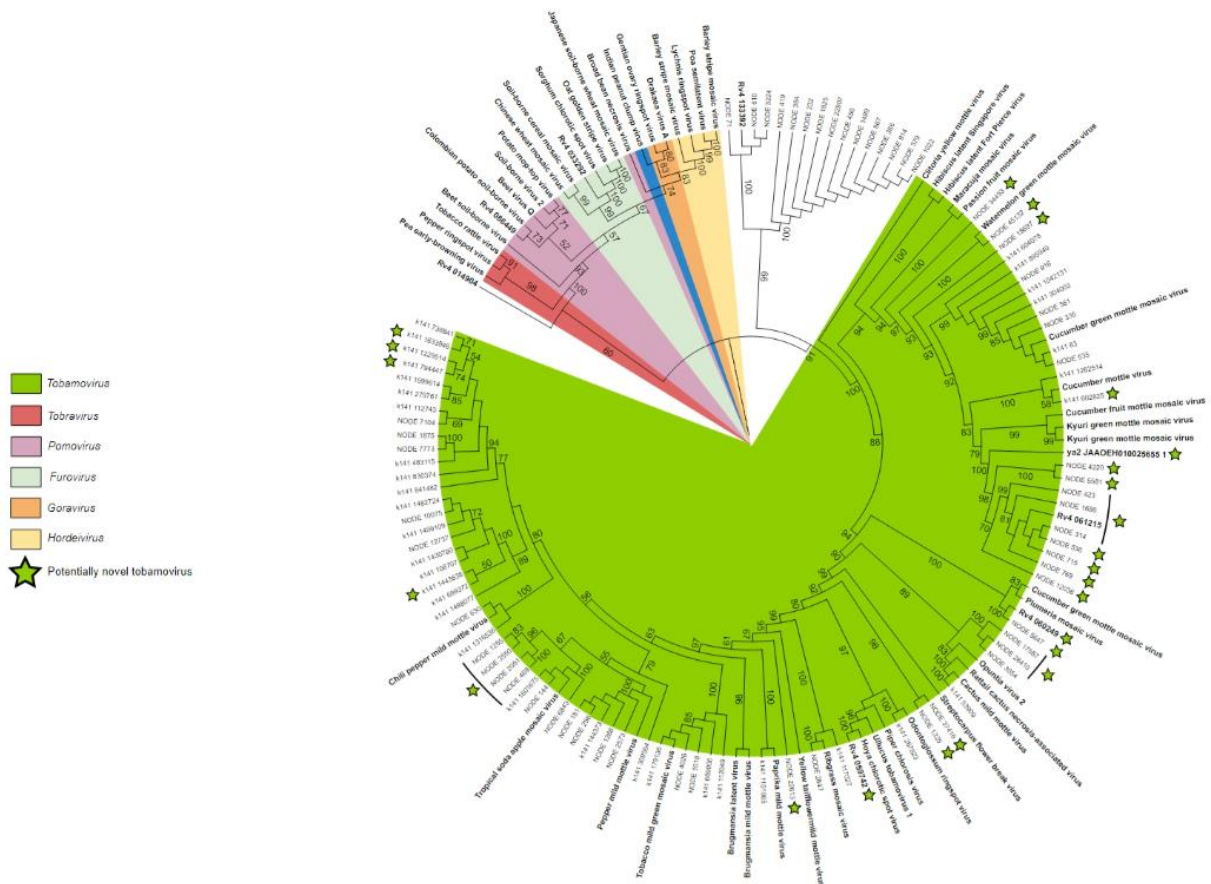
species demarcation criteria) določili reprezentativne sekvence za posamezne skupine, ki so bile v nadaljevanju (naloge 1.4) uporabljene za filogenetske analize.



Slika 4: Pregled korakov analize, ki smo jih uporabili v okviru delovnega paketa 1. V zelenem okvirčku so predstavljeni koraki, ki smo jih avtomatizirali s pomočjo orodja snakemake in vsebujejo dele nalog 1.1, 1.2 in 1.3. Rezultat tega avtomatiziranega delotoka je zbirka zaporedij znanih in potencialno novih tobamovirusov v okviru naloge 1.3. Nadaljne podrobne analize (predstavljene v modrem, oranžnem in vijoličnem okvirčku) so bile opravljene v okviru naloge 1.4.

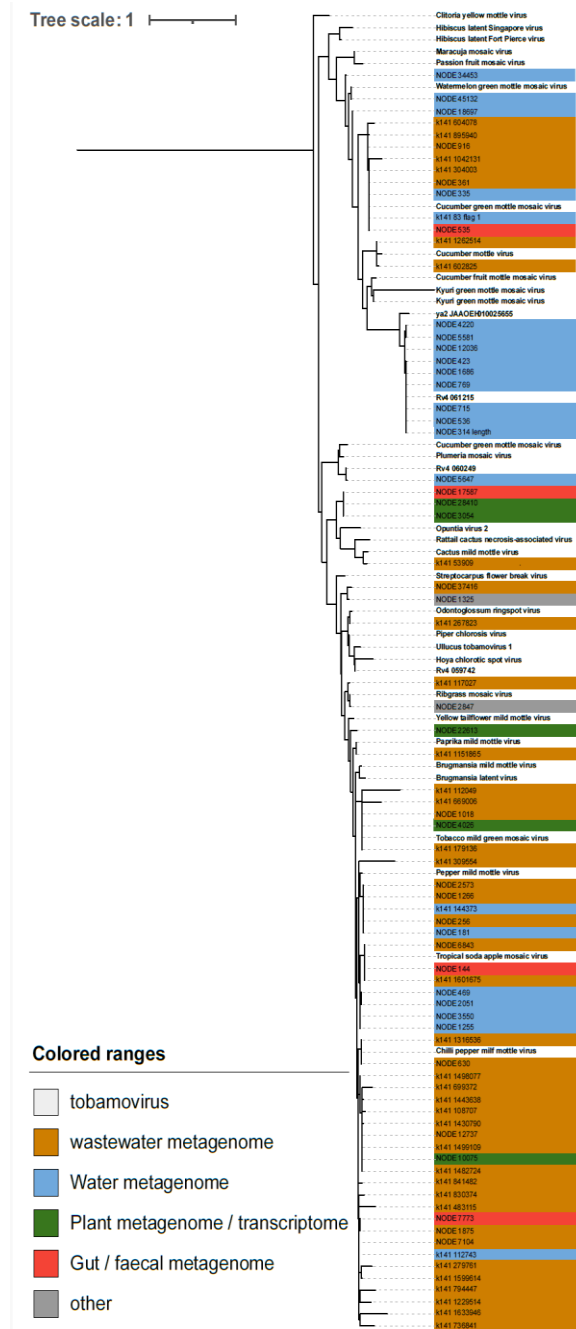
Naloga 1.4: Filogenetska in rekombinacijska analiza sekvenc tobamovirusov

Virusna zaporedja, ki smo jih izbrali v nalogi 1.3 smo nadalje analizirali, da bi potrdili ali predstavljajo nove vrste, hkrati pa ugotovili kako sorodna so si med seboj odkrita zaporedja potencialno novih tobamovirusov. Filogenetske in rekombinacijske analize smo opravili na več nivojih. V najširšo analizo smo zajeli vsa zaporedja na katerih smo zaznali ohranjen del proteina RdRp imenovan palmpoint. Z omenjenim pristopom smo potrdili zaporedja, ki se klasificirajo znotraj rodu *Tobamovirus*, in zaporedja, ki morda predstavljajo viruse, ki so tobamovirusom podobni, a morda predstavljajo predstavnike drugih znanih ali še neznanih rodov. Na ta način smo zaznali 24 potencialno novih tobamovirusov, od katerih so bili nekateri predstavljeni z zelo kratkimi, nekateri pa tudi z daljšimi, skoraj celotnimi zaporedji genomov. Odkrili smo tudi večje število zaporedij, ki se niso gručila znotraj rodu *Tobamovirus*, so pa predstavljala temu sestrsko skupino.



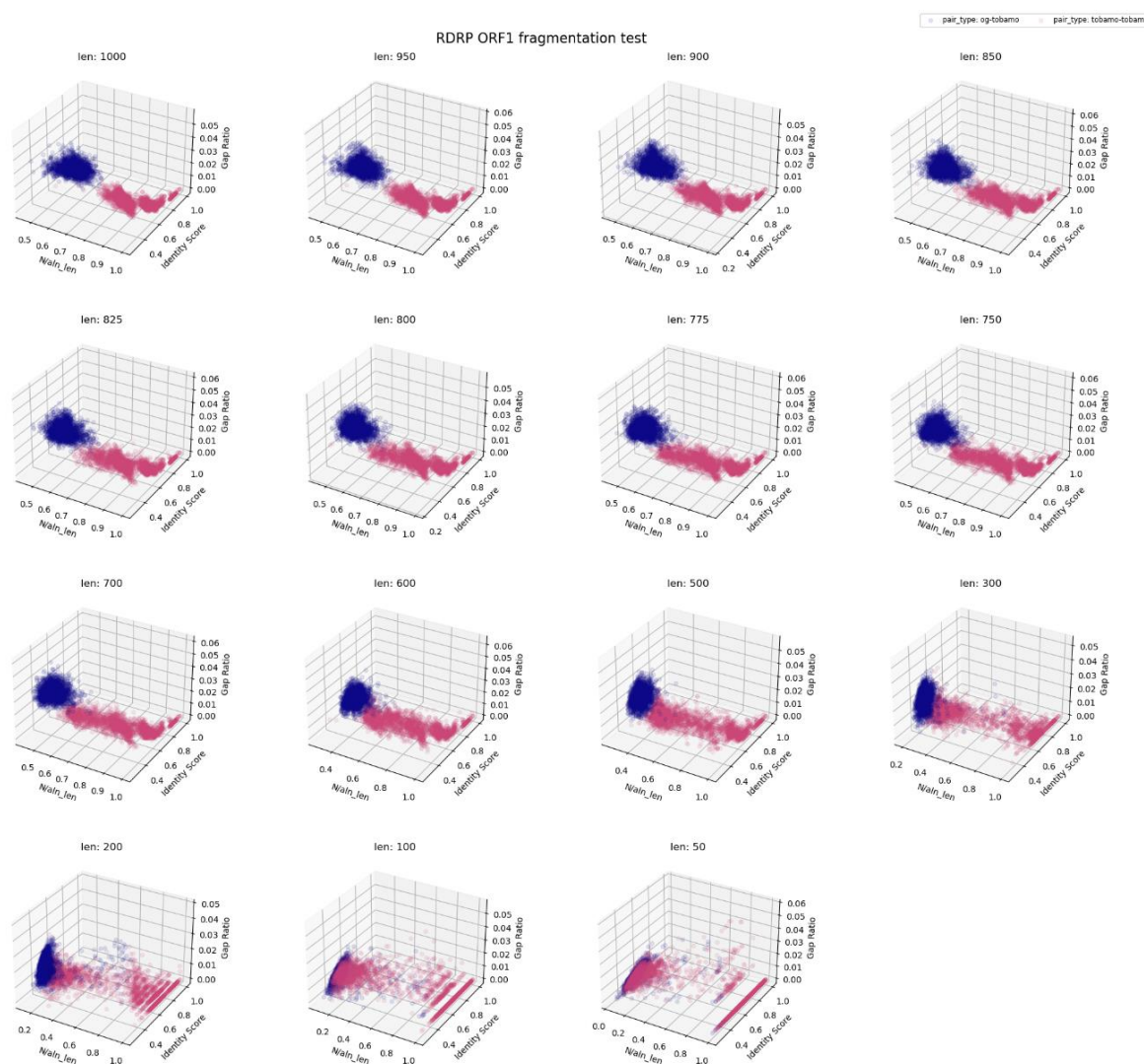
Slika 5: Kladogram, ki prikazuje razmerja med potencialno novimi in že znanimi predstavniki rodu Tobamovirus, pripravljen na podlagi kratkega ohranjenega zaporedja od RNA odvisne RNA polimeraze. Prej znana zaporedja so označena s krepkim tiskom, zaporedja, ki smo jih odkrili v tej študiji, pa z običajnim. Barve označujejo različne rodove znotraj družine Virgaviridae, pri čemer je rod Tobamovirus označen zeleno. Potencialno novi tobamovirusi so označeni z zvezdico.

Naredili smo tudi ločeno analizo za nekatere predstavnike potencialno novih tobamovirusov, za katere smo pridobili daljša genomska zaporedja. Na ta način smo na primer klasificirali več novih predstavnikov tobamovirusov pridobljenih iz podatkovnih setov iz različnih koncev sveta, npr. takih, ki so izvirali iz rečnih vzorcev Amazonke iz Braziliije in npr. nov virus, ki je bil pridobljen iz podatkov povezanih z rženo silažo iz Nemčije.



Slika 6: Primer analize posameznih virusov z daljšimi zaporedji. Na sliki vidimo filogram, ki je pripravljen z metodo največjega verjetja na podlagi poravnane daljšega dela zaporedij znanih in potencialno novih tobamovirusov. Barve predstavljajo povezavo z izvornimi metapodatki za podatkovne sete iz katerih smo pridobili zaporedja potencialno novih virusov.

Za bolj avtomatizirno taksonomsko klasifikacijo sestavljenih zaporedij, ki jih pridobimo iz tovrstnih podatkov, smo na podlagi simulacij parnih poravnav tobamovirusov in njim sorodnih virusov iz družine *Virgaviridae* pripravili orodje, ki s pomočjo strojnega učenja omogoča tako klasifikacijo. Orodje in njegove prednosti in omejitve smo testirali na reprezentativnem setu znanih tobamovirusov pa tudi na setu zaporedij, ki smo jih pridobili v nalogi 1.3.



Slika 7: Simulacija vpliva dolžine zaporedij na parametre parnih poravnjav tobamovirusov in virusov iz njim sorodnih rodov iz družine Virgaviridae na primeru enega izmed proteinov, ki je zapisan na genomih tobamovirusov. Modre točke predstavljajo parne poravnave predstavnikov znotraj rodu Tobamovirus, rožnate pa parne poravnave predstavnikov rodu Tobamovirus s predstavniki drugih rodov iz družine. Vidimo lahko, da sta dve skupini pri večjih dolžinah zaporedij med sabo ločeni, pri krajših dolžinah pa se začneta zlivati. To nam pove, da je pri takih dolžinah klasifikacija takih zaporedij v pravilno skupino bolj negotova. Te podatke smo uporabili kot izhodišče za pripravo orodja, ki bi s pomočjo strojnega učenja lahko upoštevalo take parametre za napoved pripadnosti neznanih zaporedij rodu Tobamovirus.

Rezultate pridobljene v okviru delovnega paketa 1 bomo v obliki znanstvenega članka predstavili širši znanstveni skupnosti. V članku, ki je trenutno v pripravi, bomo opisali novo zaznane tobamoviruse, in hkrati predstavili orodja za bolj enostavno pridobivanje takih rezultatov s pomočjo podatkovnega rudarjenja. Zaključevanje članka pričakujemo proti koncu leta 2024.

DP2 Študija epidemiologije, povezane z vodo

V okviru tega delovnega paketa smo ovrednotiti sposobnost razširjanja porajajočih se tobamovirusov z vodo in možnost njihovega preživetja v vodnem okolju.

Naloga 2.1 Preživetje ToBRFV in ToMMV v vodnem okolju

Z analizo razredčitev ToBRFV in ToMMV v vodi smo določili minimalno koncentracijo obeh virusov, ki je potrebna za uspešno mehansko okužbo testnih rastlin. S testnimi rastlinami smo prisotnost ToBRFV lahko zaznali v vseh vzorcih vod s $C_q \leq 20$, v enem primeru tudi v primeru višje redčine (10^{-8} , $C_q = 25$), kar kaže, da je možen sporadičen prenos na testne rastline iz vzorcev vode z nizko koncentracijo ToBRFV (Tabela 1).

V poskusu s ToMMV pa smo s testnimi rastlinami prisotnost ToMMV lahko zaznali v vseh vzorcih vod s $C_q \leq 25$ (Tabela 2).

Tabela 1: Rezultati testiranja redčin ToBRFV v vodi (objavljeno v Mehle in sod., 2023)

Redčina	ToBRFV onesnažena voda		Testne rastline ^f			
	LFD	RT-qPCR (Cq) ^a	Simptomi ^b	LFD ^c	RT-qPCR (Cq) ^d	RT-qPCR (Cq) ^e
10^{-1}	+	4	+	+	NT	NT
10^{-2}	+	7	+	+	NT	NT
10^{-3}	+	10	+	+	NT	NT
10^{-4}	+	13	+	+	NT	NT
10^{-5}	+	17	+	+	NT	NT
10^{-6}	+	20	+	+	NT	NT
10^{-7}	-	22	-	-	NT	undet
10^{-8}	-	25	-	+	13	NT
10^{-9}	NT	25	-	-	NT	undet
10^{-10}	NT	26	-	-	30	NT
10^{-11}	NT	29	-	-	37	38
10^{-12}	NT	33	-	-	NT	undet
10^{-13}	NT	34	-	-	38	37
10^{-14}	NT	35	NT	NT	NT	NT
NC	-	undet	-	-	37	undet

^aPrisotnost RNA virusa ToBRFV v vodi izmerjena z RT-qPCR M&W (glej nalogo 3.2). Podana je povprečna vrednost C_q treh paralelk.

^bOpažena bolezenska znamenja: zvijanje listov, mehurji in mozaik na listih.

^cTestne rastline so bile analizirane 2 tedna po mehanski okužbi s hitrim serološkim testom (LFD; glej nalogo 3.2).

^dTestne rastline so bile analizirane 4 tedne po mehanski okužbi z RT-qPCR. Podana je povprečna vrednost C_q treh paralelk.

^eTestne rastline so bile analizirane 9 tednov po mehanski okužbi z RT-qPCR. Podana je povprečna vrednost C_q treh paralelk.

^fZ vsako redčino ToBRFV smo okužili 4 rastline paradižnika, razen za negativno kontrolo (NC) dve.

+, Pozitivno; -, Negativno; Undet, ni signala z RT-qPCR; NT, ni testirano; NC, negativna kontrola.

Tabela 2: Rezultati testiranja redčin ToMMV v vodi

Redčina	ToMMV kontaminirana voda	
	RT-qPCR (Cq) ^a	Testne rastline ^b RT-qPCR (Cq) ^c
10^{-1}	11	NT
10^{-2}	15	NT
10^{-3}	18	+
10^{-4}	22	+
10^{-5}	25	+
10^{-6}	28	-
10^{-7}	31	-
10^{-8}	30	-
10^{-9}	33	-

10 ⁻¹⁰	undet	-
10 ⁻¹¹	undet	-
10 ⁻¹²	37	-
10 ⁻¹³	undet	-
10 ⁻¹⁴	undet	-
10 ⁻¹⁵	undet	NT
10 ⁻¹⁶	37	NT
10 ⁻¹⁷	undet	NT
10 ⁻¹⁸	undet	NT
NC	undet	-

^aPrisotnost RNA virusa ToMMV v vodi izmerjena z RT-qPCR Tiberini in sod. – singlepex (glej nalogo 3.2). Podana je povprečna vrednost Cq treh paralelk.

^bZ vsako redčino ToMMV smo okužili 4 rastline paradižnika.

^cTestne rastline so bile analizirane 4 tedne po mehanski okužbi z RT-qPCR Tiberini in sod. – singlepex (glej nalogo 3.2).

+, Pozitivno; -, Negativno; Undet, ni signala z RT-qPCR; NT, ni testirano; NC, negativna kontrola.

S poskusi preživetja ToBRFV v vodi shranjeni v karantenskem rastlinjaku, smo dokazali, da lahko ToBRFV v vodi preživi do 4 tedne (poskus z visoko (redčina 10⁻²) in srednjo koncentracijo virusa ToBRFV (redčina 10⁻⁴)), v primeru poskusa z nizko koncentracijo ToBRFV v vodi (redčina 10⁻⁶), pa smo infektivnost ToBRFV potrdili le prvi teden po pričetku izvajanja poskusov (Tabela 3). Hkrati smo ugotovili, da lahko z RT-qPCR RNA virusa ToBRFV v vodi zaznamo še bistveno dlje (potrjeno da vsaj 15 tednov po pripravi onesnažene vode; podatki niso prikazani).

Rezultati poskusov preživetja ToMMV pa so sledeči: ToMMV lahko v vodi preživi vsaj 6 mesecev (poskus z visoko koncentracijo virusa ToMMV (redčina 10⁻²); poskus je še v teku z namenom preverjanja o možnosti preživetja več kot 6 mesecev). V primeru poskusa s srednjo koncentracijo ToMMV v vodi (redčina 10⁻⁴), pa smo infektivnost ToMMV potrdili le pri sveže pripravljeni onesnaženi vodi, v primeru poskusa z nizko koncentracijo ToMMV (redčina 10⁻⁶) pa niti takrat; smo pa v obeh teh dveh primerih z RT-qPCR RNA virusa ToMMV v vodi zaznali tudi sedmi mesec po pripravi onesnažene vode, pri čemer v primeru srednje koncentracije ToMMV niti ni bil zaznan upad koncentracije RNA (Tabela 4).

Tabela 3: Preživetje ToBRFV v vodi shranjeni na sobni temperaturi v karantenskem rastlinjaku (objavljeno v Mehle in sod., 2023)

čas (tedni) ^a	Visoka konc. ToBRFV		Srednja konc. ToBRFV		Nizka konc. ToBRFV	
	RT-qPCR (Cq) ^b	Testne rastline ^c	RT-qPCR (Cq) ^b	Testne rastline ^c	RT-qPCR (Cq) ^b	Testne rastline ^c
0	7	+	14	+	21	+
1	7	+	14	+	21	+
2	7	+	15	+	22	-
3	7	+	16	-	23	-
4	8	+	15	+	27	-
5	10	-	21	-	26	-
6	10	-	20	-	21	-
7	10	-	21	-	22	-
8	12	-	21	-	22	-
9	11	-	21	-	21	-

^aTedni po pripravi onesnažene vode

^bPrisotnost ToBRFV v vodi določena z RT-qPCR M&W. Podana je povprečna Cq vrednost treh ponovitev.

^cKužnost vode preverjena z mehansko inokulacijo 4-5 testnih rastlin paradižnika. Namnožitev virusa v testnih rastlinah je bila preverjena na podlagi opazovanj bolezenskih znamenj in s serološkim testom; v primeru, da se bolezenska znamenja niso pojavila pa na podlagi rezultatov testiranj z RT-qPCR.

+, pozitivno (bolezenska znamenja in pozitiven serološki test ali Cq < 10); -, negativno (ni bolezenskih znamenj in RT-qPCR negativno). Negativne kontrole so bile vedno negativne.

Tabela 4: Preživetje ToMMV v vodi shranjeni na sobni temperaturi v karantenskem rastlinjaku

čas (tedni) ^a	Visoka konc. ToMMV		Srednja konc. ToMMV		Nizka konc. ToMMV	
	RT-qPCR (Cq) ^b	Testne rastline ^c	RT-qPCR (Cq) ^b	Testne rastline ^c	RT-qPCR (Cq) ^b	Testne rastline ^c
0	15	+	22	+	28	-
1	15	+	21	-	27	-
2	14	+	21	-	29	-
3	15	+	21	-	28	-
4	19	+	21	-	29	-
5	14	+	21	-	29	-
6	15	+	22	-	30	-
7	15	+	20	-	29	-
8	12	+	20	-	32	NT
9	13	+	19	-	32	NT
10	15	+	21	NT	33	NT
11	14	+	20	NT	32	NT
12	11	-	21	NT	32	NT
13	14	+	20	NT	33	NT
14	15	+	22	NT	34	NT
15	16	+	23	NT	34	NT
16	14	+	20	NT	32	NT
17	17	-	20	NT	33	NT
18	14	-	19	NT	33	NT
19	14	+	21	NT	33	NT
20	14	+	20	NT	33	NT
21	14	-	19	NT	33	NT
22	14	+	20	NT	34	NT
23	13	-	20	NT	35	NT
24	13	+	21	NT	34	NT
25	15	+	21	NT	33	NT
26	15	+	22	NT	35	NT
27	14	-	21	NT	35	NT
28	16	-	23	NT	32	NT
29	13	V teku	21	NT	34	NT
30	14	V teku	21	NT	35	NT

^aTedni po pripravi onesnažene vode^bPrisotnost ToMMV v vodi določena z RT-qPCR Tiberini in sod. – singlepex. Podana je povprečna Cq vrednost treh ponovitev.^cKužnost vode preverjena z mehansko inokulacijo 4 testnih rastlin paradižnika. Namnožitev virusa v testnih rastlinah je bila preverjena z RT-qPCR.

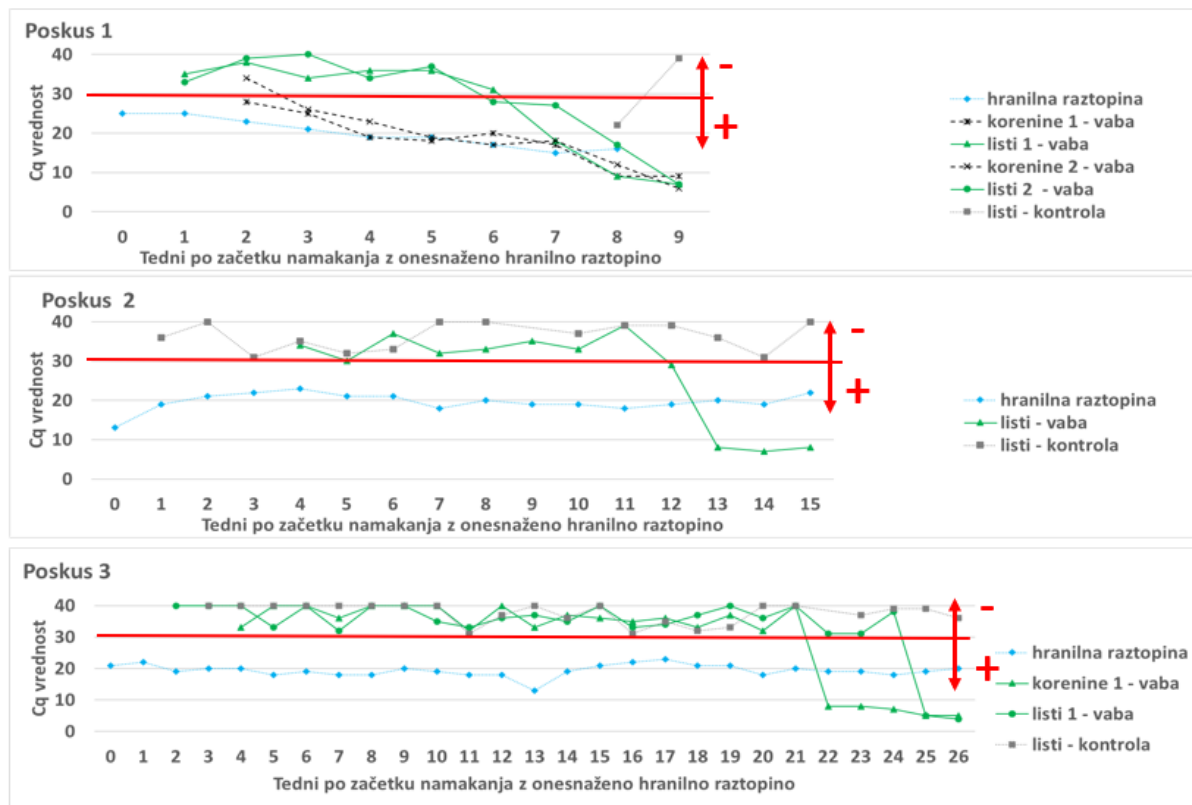
+, pozitivno (bolezenska znamenja in Cq vrednosti med 9 in 17); -, negativno (ni bolezenskih znamenj in RT-qPCR negativno). Negativne kontrole so bile vedno negativne.

Naloga 2.2 Prenos virusov ToBRFV in ToMMV preko vode v eksperimentalnih hidroponičnih sistemih in

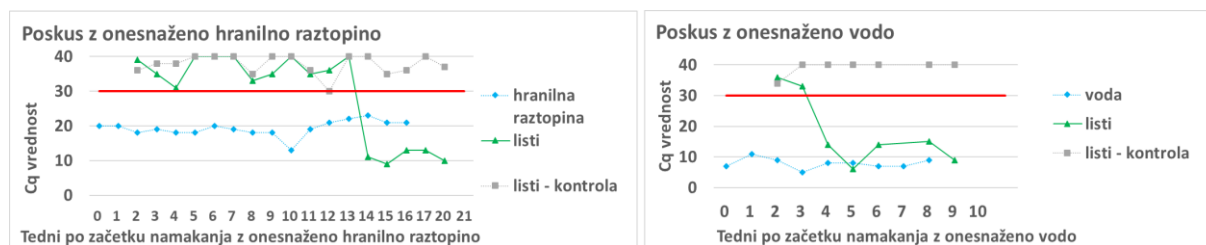
Naloga 2.3 Prenos ToBRFV in ToMMV z vbrizgavanjem onesnažene vode v substrat

Najprej smo s poskusi preverili, če se iz okuženih rastlin preko korenin v vodno okolje sproščajo infektivni delci virusa ToBRFV. Slednje smo tudi potrdili. Nato smo izvedli poskuse prenosa virusa ToBRFV preko vode v eksperimentalnem hidroponskem sistemu (izvedeni so bili trije ločeni poskusi) in poskuse z vbrizgavanjem onesnažene vode s ToBRFV v substrat (izvedena sta bila dva ločena poskusa). Vse te poskuse smo izvajali več mesecev. Tedensko smo analizirali nadzemne dele poskusnih rastlin (rastlin za vabo) ter vodo/ hranilno raztopino, ki smo jo uporabljali za namakanje le-teh. Vsakič smo analizirali tudi številne kontrolne rastline, ki so rastle v istem rastlinjaku. Ugotovili smo, da ToBRFV lahko okuži zdrave rastline preko korenin, če so le-te v stiku z onesnaženo vodo tako v primeru rasti na hidroponiki (Slika 8), kakor tudi v primeru rasti na substratu (Slika 9). Namnožitev virusa ToBRFV v prej zdravih

rastlinah smo dokazali v obdobju od 1 do 6 mesecev, kar je odvisno od koncentracije virusa v vodi, ki se je uporabljala za namakanja in od tega ali so bile korenine ranjene ali ne. Pri izvajanju poskusov v hidroponičnem sistemu smo (NIB, BIA) preverili možnost uporabe senzorja, ki omogoča istočasno zaznavo več parametrov in so ga razvili podjetje BIA d.o.o. in preostali člani projekta EUREKA WaQuMoS.

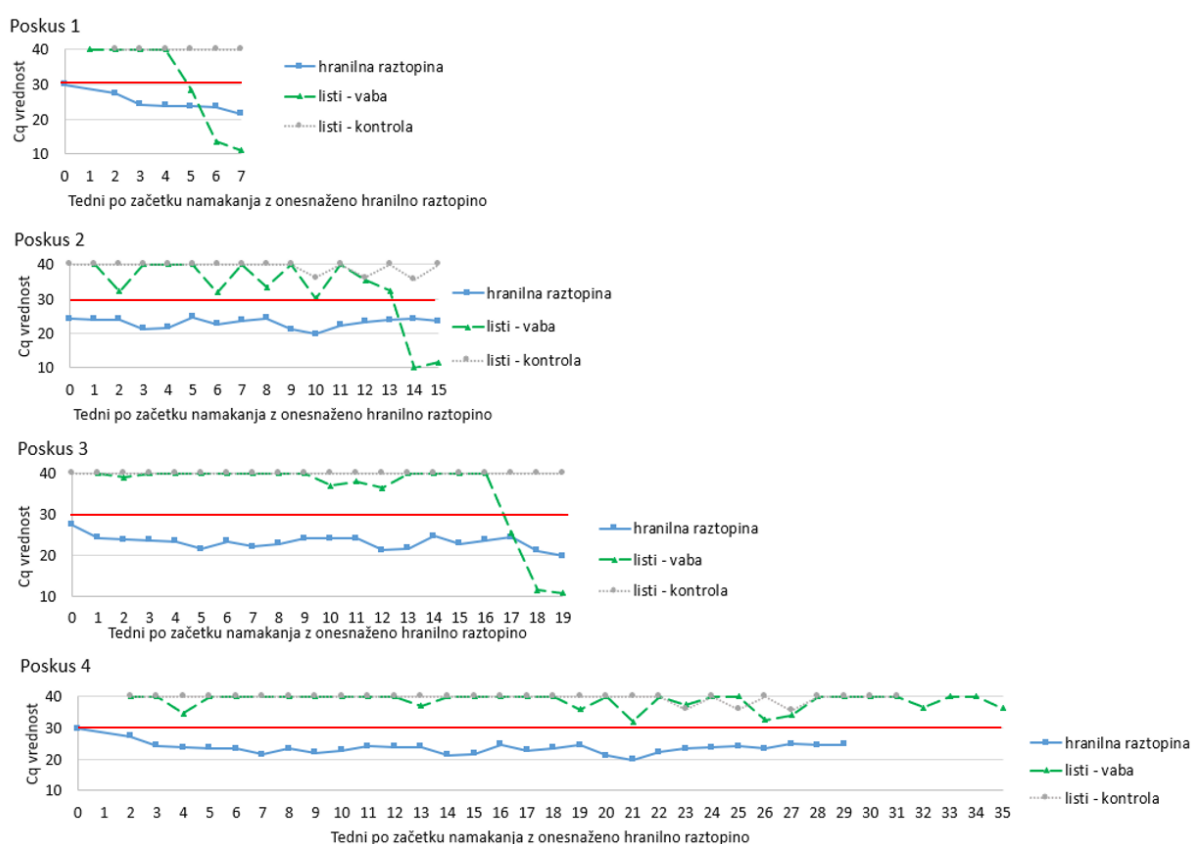


Slika 8: Vrednotenje okužbe s ToBRFV pri rastlinah paradižnika, ki so rasle v poskusnem hidroponskem sistemu s hranilno raztopino, onesnaženo s ToBRFV, v treh ločenih poskusih (poskus 1 in 2: občasno premešanje korenin rastlin z namenom ranitve koreninskih laskov; poskus 3: korenine tekom poskusa pustili nedotaknjene) (objavljeno v Mehle in sod., 2023). Os Y prikazuje vrednosti Cq iz RT-qPCR M&W. Izrisane vrednosti Cq predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev. Razlika med tehničnimi ponovitvami je bila $\pm 0,5$ od povprečja Cq za vrednosti Cq < 32 in $\pm 0,7$ od povprečja Cq za vrednosti Cq ≥ 33 . Os X prikazuje tedne po začetku namakanja z onesnaženo hranilno raztopino. Rdeča črta prikazuje vrednost Cq 30, pod katero se rezultat šteje za pozitivnega.

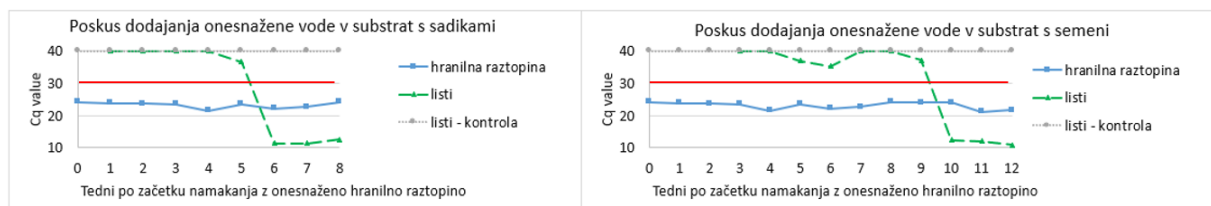


Slika 9: Vrednotenje okužbe s ToBRFV pri rastlinah paradižnika, ki rastejo v substratu, namakanem s hranilno raztopino/vodo iz pipe, onesnaženo s ToBRFV (objavljeno v Mehle in sod., 2023). Os Y prikazuje Cq iz RT-qPCR M&W. Izrisane vrednosti Cq predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev. Razlike med tehničnimi primerki so bile $\pm 0,5$ od za vrednosti Cq < 32 in $\pm 0,7$ od povprečja Cq za vrednosti Cq ≥ 33 . Os X prikazuje tedne po začetku namakanja z onesnaženo hranilno raztopino/vodo iz pipe. Rdeča črta prikazuje vrednost Cq 30, pod katero se rezultat šteje za pozitivnega.

Podobne poskuse kot s ToBRFV, smo izvedli tudi s ToMMV. Tudi v tem primeru smo dokazali, da se iz korenin okuženih rastlin sproščajo v vodno okolje infektivni delci virusa ToMMV ter da je voda, onesnažena z virusom ToMMV, lahko vir za nove okužbe, tako v primeru namakanja v hidroponičnih sistemih, kot tudi v primeru namakanja rastlin, ki rastejo v rastnem substratu. Tudi v primeru poskusov s ToMMV smo potrdili, da se lahko rastline, ki rastejo na hidroponiji okužijo preko korenin, namnožitev virusa ToMMV v listih prej zdravih rastlin paradižnika pa smo dokazali po 5 oziroma 14 tednih v primeru, ko smo korenine poskusnih rastlin občasno ranili, po 17 tednih pa v primeru, ko smo korenine občasno ranili le nežno (Slika 10). V poskusu kjer korenin nismo ranili, pa do okužbe rastlin ni prišlo niti po 35 tednih. V primeru vbrizgavanja onesnažene vode v rastni substrat s posajenimi zdravimi sadikami paradižnika, smo okužbo na listih rastlin zaznali po 6 tednih zalivanja z onesnaženo vodo (Slika 11). V primeru vbrizgavanja onesnažene vode v rastni substrat, v katerega smo posejali neokužena semena paradižnika, pa smo okužbo na listih rastlin, ki so zrasle iz teh semen, zaznali 10. teden zalivanja z onesnaženo vodo (Slika 11).



Slika 10: Vrednotenje okužbe s ToMMV pri rastlinah paradižnika, ki so rasle v poskusnem hidroponskem sistemu s hranilno raztopino, onesnaženo s ToMMV, v štirih ločenih poskusih (poskus 1 in 2: občasno premešanje korenin rastlin z namenom ranitve koreninskih laskov; poskus 3: občasno nežno premešanje korenin rastlin z namenom ranitve koreninskih laskov; poskus 4: korenine tekom poskusa pustili nedotaknjene). Os Y prikazuje vrednosti Cq iz RT-qPCR Tiberini in sod. Izrisane vrednosti Cq predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev. Osi X prikazujejo tedne po začetku namakanja z onesnaženo hranilno raztopino. Rdeča črta prikazuje vrednost Cq 30, pod katero se rezultat šteje za pozitivnega.



Slika 11: Vrednotenje okužbe s ToMMV pri rastlinah paradižnika, ki rastejo v substratu, namakanem s hranilno raztopino onesnaženo s ToMMV. Os Y prikazuje Cq iz RT-qPCR Tiberini in sod. Izrisane vrednosti Cq predstavljajo povprečje treh tehničnih ponovitev. Osi X prikazuje tedne po začetku namakanja z onesnaženo hranilno raztopino. Rdeča črta prikazuje vrednost Cq 30, pod katero se rezultat šteje za pozitivnega.

Rezultate tega delovnega sklopa smo predstavili na številnih različnih znanstvenih in strokovnih konferencah. Rezultate s poskusi s ToBRFV smo, skupaj z izkušnjami raziskovalcev iz Belgije, ki so spremljali ToBRFV v vodi v komercialnih rastlinjaki paradižnika gojenega na hidroponiji, objavili v Mehle in sod. (2023).

Dodatno smo izvedli tudi poskuse s katerimi smo preverili ali lahko pride do okužbe rastlin paradižnika s ToMMV in ToBRFV, če v kontaminirano zemljo posadimo zdrave sadike ali vanjo posejemo zdrava semena. V tem primeru smo rastline zalivali z neonesnaženo vodo. Prva bolezenska znamenja na poskusnih rastlinah smo opazili po 2 do 15 tednih po sajenju v kontaminirano zemljo, takrat smo okužbo poskusnih rastlin s ToBRFV oziroma ToMMV tudi potrdili z RT-qPCR. Poskusi, ki smo jih izvedli so služili kot osnova za oblikovanje poskusov preživetja virusa ToBRFV v zemlji, kar proučujemo v okviru Euphresco projekta 2022-A-392 (Insights into the biology of tomato brown rugose fruit virus: virus survival in soil).

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

Namen tretjega dela projekta je bil izboljšati že obstoječe teste za nadzor nad porajajočimi se virusi v različnih vzorcih vode in razviti dodatne teste, ki bodo izboljšali zanesljivost diagnostičnih postopkov, vključno s testi primernimi za analizo vzorcev vode na terenu.

Naloga 3.1 Koncentriranje (tobamo) virusov iz vode

Glede na pretekle izkušnje lahko monolitne kromatografske kolone CIM QA koncentrirajo tobamoviruse, kot je PMMoV, iz odplak in dotokov odpadne vode (Bačnik in sod., 2020). V okviru te naloge smo testirali, ali lahko CIM QA koncentrira 3 različne tobamoviruse, vključno s ToBRFV, iz različnih vrst okoljskih namakalnih voda, vključno z rekami, ribniki in podtalnico. Metoda se je izkazala za učinkovito pri koncentriranju izbranih virusov, ki so bili po pričakovanjih v bolj umazanih vzorcih (reke, ribniki) prisotni v višjih koncentracijah kot v čistejših (podtalnica, tekoča voda). Rezultate o možnosti koncentriranja za dva tobamovirusa, ToMV in PMMoV, smo vključili v članek, objavljen v reviji Water research, katere faktor vpliva je 12,8 (Maksimovic in sod., 2024), rezultati na primeru ToBRFV pa so vključeni v članek Mehle in sod. (2023). Pripravili smo tudi diagnostični protokol (SOP), ki vključuje to metodo koncentriranja. Postopek smo uspešno uporabili tudi za koncentriranje uradnih vzorcev vod, ki smo jih prejeli za analizo na ToBRFV.

Ker je monolitna kromatografija CIM precej kompleksna metoda, ki zahteva posebno usposabljanje in opremo ter ne omogoča visoko zmogljive obdelave vzorcev, smo v drugem poskusu izvedli pregled delovanja alternativnih metod za koncentracijo naravno prisotnega tobamovirusa (PMMoV) v vzorec okoljske vode (v tem primeru odpadne vode). Poleg

monolitne kromatografije smo testirali še druge metode, ki bodisi omogočajo večjo prepustnost bodisi so manj zapletene. Najuspešnejše metode, poleg monolitov CIM-QA, so bile ultrafiltracijske enote Centricon Plus-70 100 kDa in komplet Promega Enviro TNA. Kljub temu, da smo s Centricon in Promega enotami/kompleti analizirali bistveno manjše volumne vzorca vode (40–100 ml vzorca vode; v primeru CIM pa 2 l), je bila koncentracija virusa uspešna, saj smo s Centricon in Promega enotami/kompleti uspeli učinkovito koncentrirati PMMoV (koncentriran vzorec je rezultiral z do 6 Cq nižjo vrednostjo s PMMoV specifičnim RT-qPCR). Druge metode, kot so obarjanje s PEG, flokulacija s posnetim mlekom, monoliti CIM-SO3 in ultrafiltracijske enote Vivacell, so se izkazale za manj primerne ali celo za neprimerne. Rezultate smo objavili v znanstvenem članku (Maksimovic in sod., 2022).

V naslednjem koraku smo v sodelovanju s FERA (UK), preverili možnost koncentriranja virusa ToBRFV s Centricon Plus-70, in sicer v vzorcih vode iz poenostavljenega sistema, ki je oponašal hidroponsko gojenje v laboratorijih na FERL. Ugotovili smo, da je koncentriranje virusa ToBRFV iz vzorcev vod iz hidroponije s pomočjo teh Centricon enot uspešno, saj smo v primerjavi z nekoncentriranimi vzorci vode, po analizi z RT-qPCR dobili signale, ki so bili močnejši za do 8 Cq. Taka metoda se da izvesti v kateremkoli laboratoriju s klasično centrifugo. Rezultate smo objavili skupaj z rezultati DP2 v reviji *Frontiers in plant science* (Mehle in sod., 2023).

Zbrali smo (NIB, BIA) podatke za pripravo prenosnega sistema za koncentracijo tobamovirusov v vzorcih različnih vod. Poiskali smo tudi alternativne kromatografske nosilce – polyHipe, saj so CIM materiali namenjeni biofarmaceutski uporabi in zato dragi. V poskusu smo potrdili, da je PolyHipe primeren za koncentriranje PMMoV, ki je prisoten v odpanih vodah. Podjetje BIA d.o.o. je pripravilo specifikacije, katerim mora sistem zadoščati, ter oblikovalo (zgolj dokumentacijsko) prenosni sistem za koncentriranje tobamovirusov v vzorcih različnih vod (npr. čiste in sveže vode iz pipe, vode, očiščene v čistilni napravi, namakalne ter hidroponične vode).

Naloga 3.2 Metode odkrivanja in identifikacije tobamovirusov

Generični testi za določanje tobamovirusov:

Na podlagi sekvenc tobamovirusov smo oblikovali različne generične RT-qPCR za sočasno ugotavljanje prisotnosti številnih gospodarsko pomembnih tobamovirusov. Te teste smo nato preizkusili na kontrolnih vzorcih, a smo žal pri vseh naleteli na omejitve zaradi katerih smo se odločili, da generični RT-qPCR trenutno ni optimalna metoda s katero bi lahko zanesljivo zaznali vse tobamoviruse. Kot trenutno najbolj obetavna metoda s katero lahko zanesljivo zaznamo številne tobamoviruse tudi v nizki koncentraciji se je izkazal ugnezdjeni RT-PCR z začetniki po Dovas in sod. (2004) (Tabela 5). Analiza sekvence produkta ugnezdenega RT-PCR pa omogoča tudi identifikacijo tobamovirusa, ki ga zaznamo (Tabela 5).

Tabela 5: Rezultati preverjanja ustreznosti ugnezdenega RT-PCR z začetniki po Dovas in sod. (2004) za namen detekcije različnih tobamovirusov

Tobamovirus	Akronim	NIB ID izolata	Analizirana redčitev	Rezultat ugnezdenega RT-PCR (rezultat analize sekvence produkta)
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)
sunh-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

NT-ni testirano

Testi za določanje ToBRFV:

Za namen ugotavljanja prisotnosti ToBRFV v vzorcih vod smo preverili občutljivost postopka, ki vključuje ekstrakcijo celokupne RNA iz vzorcev vod ter ugotavljanje prisotnosti RNA virusa ToBRFV z RT-qPCR M&W. Ugotovili smo, da lahko s tem postopkom ToBRFV v vzorcih vod zaznamo vse do redčine 10⁻¹⁴ (Tabela 1).

V sodelovanju s Fera, smo preverili možnost analize vzorcev vod na ToBRFV z metodo LAMP, ki bi omogočala detekcijo na mestu vzorčenja (npr. v rastlinjakih). Preizkusili smo za ToBRFV specifičen LAMP test, ki so ga razvili na Feri v sodelovanju z Optigen. LAMP test smo preizkusili na vzorcih vod iz hidroponskega poskusa izvedenega na Feri. Rezultati preizkusa LAMP testa niso bili optimalni in kažejo da je potrebna nadaljnja optimizacijo zasnove bodisi na nivoju dizajniranja oligonukleotidnih začetnikov ali na nivoju izbire kemikalij za izvedbo reakcije.

Za namen detekcije ToBRFV na mestu vzorčenja smo evalvirali tudi komercialno dostopen hiter serološki test (lateral flow immunochromatography - LFD; ImmunoStrip®, Agdia, USA), s katerim smo ToBRFV v vzorcu vode zaznali do 10⁻⁶ redčitve (z RT-qPCR pa smo v istem tipu vzorca lahko virus zanesljivo zaznali tudi v redčitvi 10⁻¹⁴) (Tabela 1). Glede na primerjavo s pričakovano koncentracijo ToBRFV v vzorcih vod (na podlagi podatkov, ki jih imamo za že analizirane vzorce vod iz Slovenije), je jasno, da ta hiter serološki test ni primeren za analizo vzorcev vod (niti za vzorce vod po koncentriranju). Tudi te rezultate primerjave smo objavili v Mehle in sod. (2023).

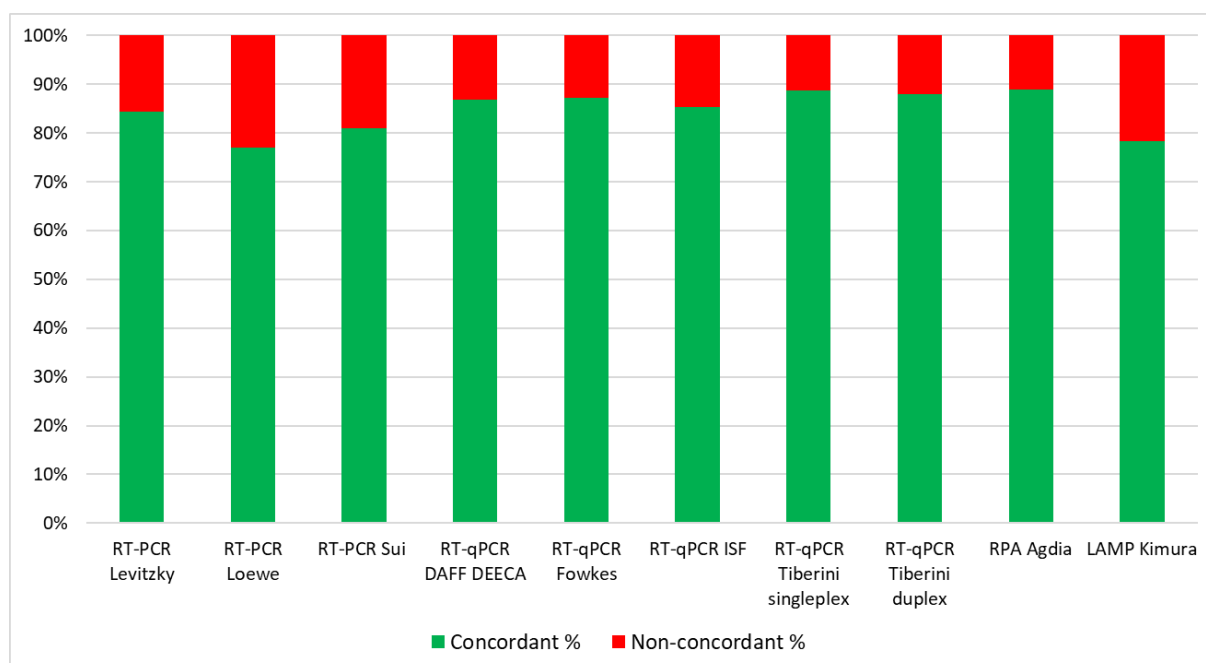
Testi za določanje ToMMV:

V sodelovanju s CREA (Italija) smo razvili in v skladu z EPPO PM7/98 validirali RT-qPCR za določanje ToMMV. Razvili in validirali smo dva tipa RT-qPCR za določanje ToMMV: kot posamezen test s katerim določamo le ToMMV in kot test s katerim lahko poleg ToMMV

sočasno določamo tudi ToBRFV. Razvit test smo skupaj z validacijskimi podatki objavili v Tiberini in sod. (2022). Dodatno smo preverili tudi občutljivost tega RT-qPCR za določanje ToMMV v vzorcih vod (Tabela 2).

Za namen ugotavljanja prisotnosti ToMMV na mestu vzorčenja smo evalvirali dva izotermalna molekularna testa specifična za ToMMV: RPA (recombinase-polymerase amplicon) test z AmplifyRP® XRT kitom (Agdia, USA) in LAMP test z oligonukleotidnimi začetniki po Kimura in sod. (2023), ki pa smo ga modificirali v smislu, da se lahko za njegovo izvedbo uporabijo kemikalije, ki so dostopne v EU. Primerjava občutljivosti obeh izotermalnih testov je pokazala, da je RPA test bolj občutljiv od testa LAMP, zato smo možnost uporabe na primeru vzorcev vod preverili le za RPA test. Ugotovili smo, da lahko ToMMV zaznamo v vzorcu vode z RPA testom tudi ko je le-ta prisoten v relativno nizki koncentraciji.

Teste za ToMMV, ki smo jih razvili oziroma modificirali in evalvirali v okviru tega projekta (RT-qPCR Tiberini in sod. (2022), RPA-Agdia in LAMP Kimura in sod. (2023)) smo skupaj z nekaterimi drugimi testi za ToMMV (RT-PCR Levitzky in sod (2029) + sekvenciranje PCR produkta, RT-PCR Loewe, RT-PCR Sui in sod. (2017), RT-qPCR DAFF DEECA, RT-qPCR Fowkes in sod. (2022), RT-qPCR ISF) vključili v medlaboratorijsko primerjavo testov, ki smo jo organizirali v okviru Euphresco projekta 2022-A-394 (Validation of molecular diagnostic methods for the detection and identification of tomato mottle mosaic virus). V tej medlaboratorijski primerjavi testov je sodelovalo 15 laboratorijev iz 13 držav (Australija, Avstrija, Francija, Italija, Izrael, Nemčija, Nizozemska, Nova Zelandija, Rusija, Slovenija, Švica, UK, USA). Rezultati medlaboratorijske primerjave so pokazali, da sta od vseh primerjanih testov, testa RT-qPCR Tiberini in sod. (2022) in RPA-Agdia najbolj zanesljiva (Slika 12). Podrobni rezultati in drugi validacijski parametri (občutljivost, specifičnost, ponovljivost) so podani v poročilu z naslovom »Report on the results of the test performance study on detection and identification of tomato mottle mosaic virus (ToMMV) using molecular tests«, ki bo objavljen na Euphresco spletni strani.



Slika 12: Delež ustreznih (zeleno) in delež neustreznih (rdeče) rezultatov dobljenih s testi na istem setu vzorcev v okviru medlaboratorijske primerjave testov kjer je sodelovalo 15 laboratorijev (objavljeno na Euphresco spletni strani).

Razprava

Projekt je obravnaval porajajoče tobamoviruse, ki so sposobni okuževanja ekonomsko pomembnih rastlin, njihov epidemiološki potencial ter mehanizem prenosa preko vodnih medijev. Delo je bilo strukturirano v tri delovne sklope.

Prvi delovni sklop je vključeval pripravo kataloga možnih novih tobamovirusnih sekvenc in njihovo karakterizacijo. Ključne ugotovitve tega sklopa vključujejo identifikacijo novih in že znanih tobamovirusov ter filogenetsko karakterizacijo njihovih genomov. Ta odkritja so pomembna, saj omogočajo boljše razumevanje raznolikosti in evolucije tobamovirusov, kar je ključno za razvoj strategij za njihovo obvladovanje. Posodobili smo seznam pripadnikov rodu *Tobamovirus*, kar lahko služi kot osnova za raziskovanje njihovega vpliva na pridelavo gospodarsko pomembnih rastlin. Katalog zaporedij znanih in novih tobamovirusov, pripravljen v okviru projekta, omogoča boljšo pripravljenost na zaznavanje in omejevanje možnih porajajočih okužb rastlin s tobamovirusi. Hkrati smo v okviru tega delovnega paketa razvili nova orodja, ki na eni strani omogočajo avtomatično in hitrejšo ponovno analizo javno dostopnih podatkov za tobamoviruse v prihodnosti, ko bodo v podatkovne baze dodani novi podatki, na drugi strani pa so lahko ta orodja uporabljena tudi za pomoč pri podatkovnem rudarjenju za druge skupine RNA virusov, ki lahko prav tako pomembno vplivajo na pridelavo hrane.

Svetovna potreba po vodi letno narašča predvsem zaradi podnebnih sprememb. Na področju tradicionalnega kmetijstva in pridelovanja rastlin v hidroponičnih sistemih lahko porabo pitne vode zmanjšamo z nadomeščanjem le-te z odpadno vodo. Vendar pa ima tudi ta pristop nekatere pomanjkljivosti, saj odpadne vode pogosto predstavljajo vir okužbe s stabilnimi rastlinskimi patogeni, ki se hitro razširijo na druge rastline, zaradi česar je potreben stalen nadzor nad mikrobiološko neoporečnostjo voda, ki se uporabljajo za namakanje. V okviru drugega delovnega sklopa je bil naš cilj ovrednotiti sposobnost razširjanja porajajočih se tobamovirusov z vodo in možnost njihovega preživetja v vodnem okolju. Dokazali smo, da se lahko infektivni delci ToBRFV in ToMMV sproščajo iz korenin okuženih rastlin v vodo za namakanje ter da lahko ToBRFV pri sobni temperaturi preživi v vodi do štiri tedne, ToMMV pa vsaj šest mesecev. Dokazali smo tudi, da je voda, onesnažena s ToBRFV/ToMMV, lahko vir inokuluma za rastline, tako v primeru uporabe za namakanje v hidroponskih sistemih kot tudi v primeru namakanja zemlje, v kateri vzgajamo rastline. S poskusi smo potrdili, da lahko ToBRFV/ToMMV iz vode okuži zdrave rastline prek korenin in se nato razširi v zelene dele, kjer pa ga lahko zaznamo po enem ali šele po več mesecih. Ta odkritja so ključna za razumevanje, kako se tobamovirusi širijo v naravnem okolju in kako lahko onesnažena voda prispeva k širjenju teh virusov, kar je ključno za pripravo zanesljive ocene tveganja ter za prepoznavanje kritičnih točk, pomembnih za spremljanje in nadzor bolezni. Z ovrednotenjem, ali vodni mediji predstavljajo možno pot prenosa znanih in porajajočih se tobamovirusov, smo prispevali k zavedanju o pomenu uvedbe novih tehnik varstva rastlin tako pri tradicionalnem kot hidroponskem gojenju rastlin, kar bi lahko zmanjšalo finančne izgube zaradi okužb s tobamovirusi.

Za preprečevanje okužb pomembnih rastlin s patogeni in s tem zagotavljanje globalnih potreb po hrani je ključno zgodnje zaznavanje tako neznanih kot že identificiranih tobamovirusov, pri čemer mora biti postopek hiter, ekonomičen in zanesljiv. S tem ciljem smo se v tretjem delovnem sklopu osredotočili na razvoj učinkovitega diagnostičnega postopka za spremljanje porajajočih se tobamovirusov v vzorcih vode. Optimizirali in primerjali smo različne postopke koncentriranja tobamovirusov iz vzorcev vode, tudi takšne, ki se lahko uporabljajo v manj

specializiranih laboratorijih (v laboratorijih z osnovno laboratorijsko opremo). Pripravili smo tudi specifikacije, potrebne za razvoj prenosnega sistema za koncentriranje vzorcev vode. Slednje bo podjetju BIA d.o.o. (partner in sofinancer projekta) služilo kot osnova za razvoj cenovno dostopnih in uporabniku prijaznih komercialnih sistemov za koncentriranje vodnih vzorcev, uporabljenih tako v laboratoriju kot na terenu. V okviru tretjega delovnega sklopa smo tudi razvili in/ali validirali za tobamoviruse generičen test in različne specifične molekularne teste za detekcijo ToMMV in ToBRFV, vključno z enostopenjskim RT-qPCR testom za sočasno detekcijo obeh virusov in testom, ki bi bil primeren tudi za določanje ToMMV na terenu (RPA, Agdia). Nadgrajene in na novo uvedene metode za zaznavanje rastlinskih patogenih virusov smo že uvedli v uporabo za diagnostično dejavnost, ki jo NIB izvaja kot diagnostično storitev po naročilu Uprave za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin. Kot partnerji v EU referenčnem laboratoriju smo poskrbeli tudi za prenos znanja, pridobljenega v okviru te študije, v druge laboratorije v EU. Z vključitvijo v tem projektu razvitih oziroma preverjenih ali optimiziranih testov v medlaboratorijsko primerjavo, ki smo jo organizirali v okviru projekta Euphresco 2022-A-394, smo zagotovili prenos znanja o teh testih tudi v laboratorije izven EU, vključno z laboratoriji v ZDA, Združenem kraljestvu, Novi Zelandiji, Rusiji, Izraelu, Avstraliji in Švici. V okviru tega projekta razviti in validirani testi pa bodo vključeni tudi v diagnostični standard evropske in mediteranske organizacije za varstvo rastlin (EPPO), ki ga že pripravljamo.

Zaključki in priporočila naročniku

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.

Rezultati so objavljeni v različnih javno dostopnih znanstvenih člankih oziroma poročilih. Tekom projekta smo rezultate predstavili tudi na številnih strokovnih in znanstvenih srečanjih. V projektu so bili vključeni tudi študenti in mladi raziskovalci, kar je prispevalo k njihovem akademskemu razvoju.

Na podlagi rezultatov projekta priporočamo:

- 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).
- 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.
- Izobraževanje in ozaveščanje pridelovalcev: organizirati izobraževalne delavnice in kampanje za pridelovalce, da se seznani z metodami za preprečevanje širjenja tobamovirusov ter z diagnostičnimi postopki za zgodnje odkrivanje okužb.
- Osvestiti druge raziskovalce in regulatorje o možnostih, ki jih za odkrivanje virusov v javno dostopnih bazah podatkov omogoča podatkovno rudarjenje.
- 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.
- 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.

Bibliografski in drugi doseženi rezultati projektne skupine

Že objavljeni znanstveni članki, ki so rezultat tega projekta

- TIBERINI, Antonio, MANGILLI, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. [COBISS.SI-ID 172665347]

Predstavitve rezultatov dela na konferencah/ strokovnih srečanjih v obliki predavanj ali postrov:

15. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo (Portorož, 1.-2.3.2022):

- Predavanje: MEHLE, Nataša, KUTNJAK, Denis, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, RAVNIKAR, Maja, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIĆ, Olivera, BRODARIČ, Jakob, BAJDE, Irena, KITEK, Miha, VUČUROVIĆ, Ana. Pomen vode za razširjanje virusa rjave grbančavosti plodov paradižnika = Water-linked epidemiology of tomato brown rugose fruit virus.
- Poster: VUČUROVIĆ, Ana, BRODARIČ, Jakob, TIBERINI, Antonio, LUIGI, Marta, FAGGIOLI, Francesco, MEHLE, Nataša. Virus lisavosti in mozaika paradižnika : nov sovražnik paradižnika in paprike = Tomato mottle mosaic virus : new enemy affecting tomatoes and peppers.

Občni zbor Slovenskega združenja za integrirano pridelavo zelenjave (spletno srečanje, 29.3.2022):

- Predavanje: MEHLE, Nataša, KUTNJAK, Denis, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, RAVNIKAR, Maja, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIĆ, Olivera, BRODARIČ, Jakob, KITEK, Miha, BAJDE, Irena, VUČUROVIĆ, Ana. Virus rjave grbančavosti plodov paradižnika (ToBRFV) in pomen vode za njegovo razširjanje.

ISFEV 2022 - The Seventh International Conference on Food and Environmental Virology (Santiago de Compostela, Španija, 16.-20.5.2022):

- Predavanje: MAKSIMOVIĆ, Olivera, BAČNIK, Katarina, KUTNJAK, Denis, RIVAREZ, Mark Paul Selda, VUČUROVIĆ, Ana, MEHLE, Nataša, SELJAK, Gabrijel, RAVNIKAR, Maja, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion. A plant virus tale : from wastewater to irrigation crops.
- Predavanje: MAKSIMOVIĆ, Olivera, BAČNIK, Katarina, LENGAR, Živa, KOGEJ ZWITTER, Zala, MILAVEC, Mojca, RAVNIKAR, Maja, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion. Lesson learned from monitoring of SARS-COV-2 in Slovenian wastewater.

MSS2022 - Monolith Summerschool and symposium (Portorož, Junij 2022):

- Predavanje: MAKSIMOVIC Olivera et al. Combination of CIM monolith chromatography and high throughput sequencing (HTS) to study the plant virus composition of irrigation waters and its impact in crop plants.

5th ISPVE - Epidemiology and management of plant viruses under a changing climate (Madrid, Španija, 5.-8.6.2022):

- Predavanje: VUČUROVIĆ, Ana, KUTNJAK, Denis, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, RAVNIKAR, Maja, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIĆ, Olivera, FOX, Adrian, BRODARIČ, Jakob, BAJDE, Irena, KITEK, Miha, MEHLE, Nataša. Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments : survival and significance of water-mediated transmission.

International conference of the Slovenian Society of Plant Biology (Plants in Changing Environment) (15.-16.9.2022):

- Predavanje: VUČUROVIĆ, Ana, BRODARIČ, Jakob, BAJDE, Irena, TIBERINI, Antonio, LUIGI, Marta, MANGLLI, Ariana, FAGGIOLI, Francesco, MEHLE, Nataša. Tomato mottle mosaic virus: newly discovered enemy affecting tomatoes and peppers.

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):

- Poster: VUČUROVIĆ, Ana, BRODARIČ, Jakob, BAJDE, Irena, KITEK, Miha, KUTNJAK, Denis, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, RAVNIKAR, Maja, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIĆ, Olivera, FOX, Adrian, LOH Yue Lin, MEHLE, Nataša. Tomato brown rugose fruit virus in aqueous environments – survival and significance of water-mediated transmission
- Predavanje: VUČUROVIĆ, Ana, BAČNIK, Katarina, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, KUTNJAK, Denis, RAVNIKAR, Maja, CURK, Tomaž, Štravs, Rok, MEHLE, Nataša. Discovery and water-linked epidemiology of emergent tobamoviruses infecting crops

AAB, International Advances in Plant Virology (Ljubljana, 5.-7.10.2022):

- Predavanje: VUČUROVIĆ, Ana, KUTNJAK, Denis, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, RAVNIKAR, Maja, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIĆ, Olivera, FOX, Adrian, LOH Yue Lin, BRODARIČ, Jakob, BAJDE, Irena, KITEK, Miha, MEHLE, Nataša. Water-linked epidemiology of tomato brown rugose fruit virus.
- Predavanje: MAKSIMOVIC Olivera, BACNIK, Katarina, SELDA RIVAREZ Mark Paul, KUTNJAK, Denis, RAVNIKAR, Maja, GUTIERREZ-AGUIRRE, Ion, Virome analysis of selected irrigation waters in Slovenia focusing on plant viruses.
- Poster: BAČNIK, Katarina, MEHLE, Nataša, CURK, Tomaž, KUTNJAK, Denis. Discovery and genomic characterisation of novel tobamoviruses through meta-analysis of public sequence datasets
- Poster: VUČUROVIĆ, Ana, BRODARIČ, Jakob, TIBERINI, Antonio, LUIGI, Marta, FAGGIOLI, Francesco, MEHLE, Nataša. Tomato mottle mosaic virus: a newly discovered threat to tomatoes and peppers

XXXII Plant Protection Forum (Keszthely, Madžarska, 18.-20.1.2023):

- Vabljen predavanje: MEHLE, Nataša, VUČUROVIĆ, Ana, KUTNJAK, Denis, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIĆ, Olivera, BRODARIČ, Jakob, BAJDE, Irena, KITEK, Miha, RAVNIKAR, Maja. The impact of water mediated transmission of plant viruses.

Novi izzivi v agronomiji 2023 = New Challenges in Agronomy 2023 (Laško, 26.-27.1.2023):

- Predavanje: VUČUROVIĆ, Ana, BAČNIK, Katarina, BAJDE, Irena, BRODARIČ, Jakob, FOX, Adrian, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, KITEK, Miha, KUTNJAK, Denis, LOH, Yue Lin, MAKSIMOVIĆ, Olivera, RAVNIKAR, Maja, MEHLE, Nataša, et al. Preživetje virusa rjave grbančavosti plodov paradižnika in njegov prenos z vodo = Survival in and transmission by water of tomato brown rugose fruit virus.

EURL Virology Workshop - interpretation of ToBRFV results (online, 14.2.2023):

- Predavanje: MEHLE, Nataša. ToBRFV in water

12th International Congress on Plant Pathology - ICPP2023 (Lyon, France, 20.-25.8.2023):

- Poster: KUTNJAK, Denis, RIVAREZ, Mark Paul Selda, MAKSIMOVIĆ, Olivera, BAČNIK, Katarina, KOGEJ ZWITTER, Zala, PECMAN, Anja, LENGAR, Živa, MEHLE, Nataša, VUČUROVIĆ, Ana, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, RAVNIKAR, Maja. Virome analysis of multiple sample types brings extended insights into the plant virus presence in the ecosystem.
- Poster: BAČNIK, Katarina, VOGRINEC, Lana, CURK, Tomaž, BAČIČ, Martina, MEHLE, Nataša, KUTNJAK, Denis. Data mining-based discovery of novel tobamoviruses and viruses associated with macrophytes.

- Predavanje: MEHLE, Nataša, BAJDE, Irena, BRODARIČ, Jakob, MAKSIMOVIC, Olivera, FOX, Adrian, KITEK, Miha, LOH, Yue Lin, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, KUTNJAK, Denis, BAČNIK, Katarina, RAVNIKAR, Maja, VUČUROVIĆ, Ana. Water and soil contaminated with emerging tobamoviruses are the source of plant infections.

Slovenian Microbiome Network Symposium (Maribor, 30.11.-1.12.2023):

- Predavanje: BAČNIK, Katarina, VOGRINEC, Lana, Turk Dermastia, Timotej, Pajek ARAMBašič, Neža, CURK, Tomaž, BAČIČ, Martina, MEHLE, Nataša, KUTNJAK, Denis. Data mining-based discovery of (novel) viral sequences in various host organisms and environmental samples

20th Meeting of the EFSA Network on plant health risk assessment (on-line, 6.12.2023):

- Vabljen predavanje: KUTNJAK et al. Advances in high-throughput sequencing give new opportunities for virus detection towards a ONE Health approach

Varstvo vrtnin - Srečanje s kmetijskimi svetovalci JSKS (UVHVVR organizator) (on-line, 19. december 2023):

- Predavanje: MEHLE, Nataša. Kako lahko preprečimo vnos oziroma širjenje virusa rjave grbančavosti plodov paradižnika?

Usposabljanje za strokovni izpit s področja zdravstvenega varstva rastlin (KIS, 1. 2.2024):

- Predavanje: MEHLE, Nataša. Fitoplazma Grapevine Flavescence dorée, Tomato leaf curl New delhi virus, Tomato brown rugose fruit virus

9. kongres Slovenskega mikrobiološkega društva (Maribor, 14.–16. 2.2024):

- Vabljen predavanje: RAVNIKAR, Maja, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, DOBNIK, David, FILIPIČ, Arijana, BAČNIK, Katarina, MAKSIMOVIC, Olivera, PREZELJ, Nina, BOGOŽALEC KOŠIR, Alexandra, VUČUROVIĆ, Ana, MILAVEC, Mojca, ŽUPANIČ, Anže, MEHLE, Nataša, KUTNJAK, Denis. Vode - vir informacij o naravi in družbi.
- Poster: MEHLE, Nataša, BAJDE, Irena, BRODARIČ, Jakob, FOX, Adrian, KITEK, Miha, KUTNJAK, Denis, RAVNIKAR, Maja, VUČUROVIĆ, Ana. Voda in rastni substrat onesnaženi s tobamovirusi - vir okužbe rastlin

16. slovensko posvetovanje o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo (Bohinjska Bistrica, 5.-6.3.2024):

- Predavanje: MEHLE, Nataša, BAJDE, Irena, BRODARIČ, Jakob, FOX, Adrian, KITEK, Miha, KUTNJAK, Denis, RAVNIKAR, Maja, VUČUROVIĆ, Ana. Rastni substrat in voda onesnaženi s tobamovirusi so lahko vir okužbe rastlin

8th ISFEV Conference, International Society for Food and Environmental Virology (Tokyo, Japan, 9-14.6.2024):

- Predavanje: KUTNJAK, Denis, MAKSIMOVIC, Olivera, RIVAREZ, Mark Paul Selda, BAČNIK, Katarina, KOGJEJ ZWITTER, Zala, PECMAN, Anja, LENGAR, Živa, MEHLE, Nataša, VUČUROVIĆ, Ana, RAVNIKAR, Maja, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion. Exploring plant virus presence in an agroecosystem through comprehensive virome analysis of weeds, crop plants and irrigation water.

Power of viruses (Zadar, Hrvaška, 25.-28.9.2024):

- Poster: MEHLE, Nataša, BAJDE, Irena, BRODARIČ, Jakob, FOX, Adrian, KITEK, Miha, GUTIÉRREZ-AGUIRRE, Ion, KUTNJAK, Denis, BAČNIK, Katarina, RAVNIKAR, Maja, VUČUROVIĆ, Ana. Water and soil contaminated with emerging tobamoviruses are the source of plant infections.

- Poster: KRANJC, Luka, PAJEK ARAMBAŠIĆ, Neža, BAČNIK, Katarina, CURK, Tomaž, KUTNJAK, Denis. Viral Treasure Hunt: Unearthing Novel Tobamoviruses in Public Databases.
- Vabljen predavatelj: VOGRINEC; Lana, PAJEK ARAMBAŠIĆ, Neža, CURK, Tomaž, KRANJC, Luka, BAČNIK, Katarina, BAČIČ Martina, LENGAR, Živa, FERLE, Maja, VUČUROVIĆ, Ana, MEHLE, Nataša, RAVNIKAR; Maja, GUTIERREZ AGIRRE Ion, KUTNJAK, Denis. Assessing virome diversity across ecosystems: from plants to water samples

Druga poročila o rezultatih raziskav, ki so prosto dostopna širši javnosti:

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 bo v kratkem objavljeno na spletni strani Euphresco.

Podatki iz tega poročila bodo vključeni in dostopni tudi na EPPO database on diagnostic expertise: https://dc.eppo.int/validation_data/validationlist.

Vključenost mladih raziskovalcev, dodiplomskih in podiplomskih študentov:

V delo na projektu, za naloge iz DP2, je bil vključen študent Univerze v Ljubljani - diplomska in magistrska 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
- 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)

V delo na projektu, za naloge iz DP3, je bila vključena doktorska študentka Olivera Maksimović (mentor Ion GUTIÉRREZ-AGUIRRE):

- MAKSIMOVIĆ, Olivera. Development and employment of untargeted and targeted tools for virus detection in the frame of water-based epidemiology : PhD thesis. Ljubljana, 2023

Delno je bil v delo na projektu vključen tudi doktorski študentk Mark Paul Selda Rivarez (mentor Denis KUTNJAK):

- RIVAREZ, Mark Paul Selda. 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.

Drugi viri

- Abdelkareem, A. O., et al. 2018. VirNet: Deep attention model for viral reads identification. In *2018 13th International Conference on Computer Engineering and Systems (ICCES)*, IEEE, p. 623–626.
- Aguado-García, Y., et al. 2020. Tobamoviruses can be frequently present in the oropharynx and gut of infants during their first year of life. *Sci. Rep.* 10:1–11 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70684-w>.
- Ahmed, W., et al. 2020. Comparison of virus concentration methods for the RT-qPCR-based recovery of murine hepatitis virus, a surrogate for SARS-CoV-2 from untreated wastewater. *Sci. Total Environ.* 739:139960.
- Ambrós, S., et al. 2017. Molecular and biological characterization of an isolate of Tomato mottle mosaic virus (ToMMV) infecting tomato and other experimental hosts in eastern Spain. *Eur. J. Plant Pathol.* 149:261–268.
- Anderson, P. K., et al. 2004. Emerging infectious diseases of plants: Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.* 19:535–544.
- Bačnik, K., et al. 2020. Viromics and infectivity analysis reveal the release of infective plant viruses from wastewater into the environment. *Water Res.* :115628.
- Bandte, M., et al. 2009. Ecological aspects of plant viruses in tomato and pathogen risk assessment. *Acta Horticulturae* p. 161–168.
- Bankevich, A., et al. 2012. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19:455–477.
- Bawden, F. C., and Pirie, N. W. 1959. The infectivity and inactivation of nucleic acid preparations from tobacco mosaic virus. *Microbiology.* 21:438–456.
- Boben, J., et al. 2007. Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. *Eur. J. Plant Pathol.* 118:59–71.
- Bryant, D., and Moulton, V. 2004. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 21:255–65.
- Buchfink, B., et al. 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nat. Methods.* 12:59–60.
- Büttner, C., and Nienhaus, F. 1989. Virus contamination of waters in two forest districts of the Rhineland area (FRG). *Eur. J. For. Pathol.* 19:206–211.
- Bzhalava, Z., et al. 2018. Machine Learning for detection of viral sequences in human metagenomic datasets. *BMC Bioinformatics.* 19:1–11.
- Cantalupo, P. G., et al. 2011. Raw sewage harbors diverse viral populations. *MBio.* 2.
- Castello, J. D., et al. 1995. Detection of infectious tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. *Phytopathology.* 85:1409–1412.
- Chalupowicz, L., et al. 2019. Diagnosis of plant diseases using the Nanopore sequencing platform. *Plant Pathol.* 68: 229-238.
- Dombrovsky, A., and Smith, E. 2017. Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. In *Advances in Seed Biology*.
- Dovas, C.I., et al. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using DI-containing primers along with homologous DG-containing primers. *J. Virol. Methods* 117, 137–144.
- EPPO GD. 2024. EPPO Global Database (<https://gd.eppo.int>).
- EPPO. 2021. PM7/98(5) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*;51:468–498.
- Fernandez-cassi, X., et al. 2018. Metagenomics for the study of viruses in urban sewage as a tool for public health surveillance. *Sci. Total Environ.* 618:870–880.
- Fillhart, R. C., et al. 1998. Detection of infectious tobamoviruses in forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1430–1435.
- Fong, T.-T., and Lipp, E. K. 2005. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:357–371.
- Fowkes, A.R. et al. 2022. First report of Tomato mottle mosaic virus in *Solanum lycopersicum* seeds in The Netherlands and intercepted in seed imported from Asia. *New Disease Reports*, 45, e12067.
- Grubaugh, N. D., et al. 2019. Tracking virus outbreaks in the twenty-first century. *Nat. Microbiol.* 4:10–19.
- Guindon, S., et al. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59:307–321.
- Guo, J., et al. 2021. VirSorter2: a multi-classifier, expert-guided approach to detect diverse DNA and RNA viruses. *Microbiome.* 9:1–13.
- Haramoto, E., et al. 2013. Occurrence of Pepper mild mottle virus in drinking water sources in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:7413–7418.
- Hjelmsø, M. H., et al. 2017. Evaluation of methods for the concentration and extraction of viruses from sewage in the context of metagenomic sequencing. *PLoS One.* 12:e0170199.
- Huang, B., et al. 2019. Illumina sequencing of clinical samples for virus detection in a public health laboratory. *Sci. Rep.* 9:1–8.
- Jeżewska, M., et al. 2018. Detection of infectious tobamoviruses in irrigation and drainage canals in Greater Poland. *J. Plant Prot. Res.* 58:202–205.
- Kavianand, G., et al. 2016. Smart drip irrigation system for sustainable agriculture. In *2016 IEEE Technological Innovations in ICT for Agriculture and Rural Development (TIAR)*, IEEE, p. 19–22.
- Kim, D., et al. 2016. Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res.* 26:1721–1729.

- Kim, Y., et al. 2015. Metagenomic investigation of viral communities in ballast water. *Environ. Sci. Technol.* 49:8396–8407.
- Kimura, K. et al. 2023. A Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Technique to Detect Tomato Mottle Mosaic Virus, an Emerging Tobamovirus. *Viruses* 15(8):1688.
- Kiselev, V. Y., et al. 2017. SC3: consensus clustering of single-cell RNA-seq data. *Nat. Methods.* 14:483–486.
- Koenig, R., and Lesemann, D. 1985. Plant Viruses in German Rivers and Lakes: I. Tombusviruses, a Potexvirus and Carnation Mottle Virus. *J. Phytopathol.* 112:105–116.
- Kuroda, K., et al. 2015. Pepper mild mottle virus as an indicator and a tracer of fecal pollution in water environments : Comparative evaluation with wastewater-tracer pharmaceuticals in Hanoi, Vietnam. *Sci. Total Environ.* 506–507:287–298.
- Lam, T. T. Y., et al. 2020. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature.* 583:282–285.
- Letschert, B., et al. 2002. Detection and differentiation of serologically cross-reacting tobamoviruses of economical importance by RT-PCR and RT-PCR-RFLP. *J. Virol. Methods.* 106:1–10.
- Levitzy, N., et al. 2019. The bumblebee *Bombus terrestris* carries a primary inoculum of Tomato brown rugose fruit virus contributing to disease spread in tomatoes. *PLoS One.* 14:e0210871.
- Li, C. X., et al. 2015. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife.* 2015:1–26.
- Li, J. X., et al. 2016. Transmission Efficiency of Cucumber green mottle mosaic virus via Seeds, Soil, Pruning and Irrigation Water. *J. Phytopathol.* 164:300–309.
- Li, R., et al. 2013. Complete Genome Sequence of a New Tobamovirus Naturally Infecting Tomatoes in Mexico. *Genome Announc.* 1:e00794--13.
- Li, Y., et al. 2018. Detection of tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *J. Virol. Methods.* 259:122–128.
- Li, Y. Y., et al. 2014. First report of tomato mottle mosaic virus infection of pepper in China. *Plant Dis.* 98:1447.
- Luria, N., et al. 2017. A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLoS One.* 12:e0170429.
- Martin, D. P., et al. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1.
- Mehle, N., et al. 2018. Water-Mediated Transmission of Plant, Animal, and Human Viruses. *Adv. Virus Res.* 101:85–128.
- Mehle, N., et al. 2014. Survival and transmission of potato virus Y, pepino mosaic virus, and potato spindle tuber viroid in water. *Appl. Environ. Microbiol.* 80:1455–1462.
- Mehle, N., and Ravnkar, M. 2012. Plant viruses in aqueous environment - Survival, water mediated transmission and detection. *Water Res.* 46:4902–4917.
- Menzel, P., et al. 2016. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat. Commun.* 7:1–9.
- Menzel, W., et al. 2019. First report of Tomato brown rugose fruit virus infecting tomato in Germany. :5197.
- Menzel W, Winter S. 2020. Identification of novel and known tobamoviruses in tomato and other solanaceous crops using a new pair of generic primers and development of a specific RT-qPCR for ToBRFV. *Acta horticulturae*, accepted.
- Murtaza, G., et al. 2019. Use of Poor-quality Water for Agricultural Production. In *Research Developments in Saline Agriculture*, eds. Jagdish Chander Dagar, et al. Singapore: Springer Singapore, p. 769–783.
- Mutombo, K., et al. 1992. Scanning calorimetric studies of the stability of tobacco mosaic virus and aggregates of its coat protein. *Eur. Biophys. J.* 21:77–83.
- Nurk, S., et al. 2017. MetaSPAdes: A new versatile metagenomic assembler. *Genome Res.* 27:824–834.
- OEPP/EPPO. 2020. Data sheets on pests recommended for regulation: Tomato brown rugose fruit virus. *Bull. OEPP/EPPO.* 50:529–534.
- Peng, J., et al. 2015. Detection of pepper mild mottle virus in pepper sauce in China. *Arch. Virol.* 160:2079–2082.
- Pfützner, A. J. P. 2006. Resistance to tobacco mosaic virus and tomato mosaic virus in tomato. In *Natural resistance mechanisms of plants to viruses*, Springer, p. 399–413.
- Phadke, S., et al. 2019. Database and Analytical Resources for Viral Research Community. *Ref. Modul. Life Sci.*
- Piazzolla, P., et al. 1986. Presence of plant viruses in some rivers of southern Italy. *J. Phytopathol.* 116:244–246.
- Pleše, N., et al. 1996. Plant viruses in soil and water of forest ecosystems in Croatia. *PHYTON-HORN-* 36:135–144.
- EPPO PM7/98(4). 2019. PM 7/98 (4) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bull.* 49:530–563.
- Rampelli, S., et al. 2016. ViromeScan: a new tool for metagenomic viral community profiling. *BMC Genomics.* 17:1–9.
- Ren, J., et al. 2017. VirFinder: a novel k-mer based tool for identifying viral sequences from assembled metagenomic data. *Microbiome.* 5:69.
- Ren, J., et al. 2020. Identifying viruses from metagenomic data using deep learning. *Quant. Biol.* 8:64–77.
- Rosario, K., Nilsson, et al. 2009. Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water. *Environ. Microbiol.* 11:2806–2820.
- Rosario, K., Symonds, et al. 2009. Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7261–7267.
- Salem, N., et al. 2016. A new tobamovirus infecting

- tomato crops in Jordan. *Arch. Virol.* 161:503–506.
- Sambo, P., et al. 2019. Hydroponic Solutions for Soilless Production Systems: Issues and Opportunities in a Smart Agriculture Perspective. *Front. Plant Sci.* 10.
- Sarkes, A., et al. 2020. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *bioRxiv*. :2020.03.02.972885.
- Schnitzler, W. H. 2004. Pest and disease management of soilless culture. *Acta Horticulturae* p. 191–203.
- Shi, M., et al. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature*. 540:539–543.
- Skewes-Cox, P., et al. 2014. Profile hidden Markov models for the detection of viruses within metagenomic sequence data. *PLoS One*. 9.
- Stanghellini, M. E., and Rasmussen, S. L. 1994. Hydroponics: a solution for zoosporic pathogens. *Plant Dis.* 78:1129–1138.
- Steinegger, M., and Söding, J. 2017. MMseqs2 enables sensitive protein sequence searching for the analysis of massive data sets. *Nat. Biotechnol.* 35:1026–1028.
- Stewart-Wade, S. M. 2011. Plant pathogens in recycled irrigation water in commercial plant nurseries and greenhouses: their detection and management. *Irrig. Sci.* 29:267–297 Available at: <https://doi.org/10.1007/s00271-011-0285-1>.
- Steyer, A., et al. 2015. The detection rate of enteric viruses and *Clostridium difficile* in a waste water treatment plant effluent. *Food Environ. Virol.* 7:164–172.
- Stražar, M., et al. 2016. Orthogonal matrix factorization enables integrative analysis of multiple RNA binding proteins. *Bioinformatics*. 32:1527–1535.
- Strehl, A., and Ghosh, J. 2002. Cluster ensembles--- a knowledge reuse framework for combining multiple partitions. *J. Mach. Learn. Res.* 3:583–617.
- Sui, X., et al. 2017. Molecular and biological characterization of tomato mottle mosaic virus and development of RT-PCR detection. *Plant Dis.* 101:704–711.
- Tošić, M., and Tošić, D. 1984. Occurrence of tobacco mosaic virus in water of the Danube and Sava rivers. *J. Phytopathol.* 110:200–202.
- van de Vossenberg, B. T. L. H., et al. 2020. Real-time tracking of tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) outbreaks in the Netherlands using Nextstrain ed. F. Alex Feltus. *PLoS One*. 15:e0234671.
- Wood, D. E., et al. 2019. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 20:1–13.
- Xinchun, C., et al. 2017. Assessing water scarcity in agricultural production system based on the generalized water resources and water footprint framework. *Sci. Total Environ.* 609:587–597.
- Zhang, T., et al. 2006. RNA viral community in human feces: Prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 4:0108–0118.
- Zhang, Y. Z., et al. 2018. Using Metagenomics to Characterize an Expanding Virosphere. *Cell*. 172:1168–1172.