



7. KONFERENCA UČITELJEV/-IC NARAVOSLOVNIH PREDMETOV – NAK 2023:
**Z ZNANJEM IN RAVNANJEM NASLAVLJAJMO
PODNEBNE SPREMEMBE IN TRAJNOSTNOST**
17. DO 18. APRIL 2023, LAŠKO

Pomen odkrivanja in preučevanja virusov za biotehnološke aplikacije

Katarina Bačnik, Maja Ravnikar: Nacionalni inštitut za biologijo (NIB)



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



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA OKOLJE,
PODNEBJE IN ENERGIJO



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA VZGOJO IN IZOBRAŽEVANJE



Zavod
Republike
Slovenije
za šolstvo

Dogodek delno financira Ministrstvo za okolje, podnebje in energijo s sredstvi Sklada za podnebne spremembe, v okviru projekta Podnebni cilji in vsebine v vzgoji in izobraževanju.



Virusi kot sovražniki in prijatelji

- Uvod - virusi in metode za zaznavanje virusov
- Virusi kot povzročitelji bolezni (rastlin)
 - *Primer: Virusi paradižnika
- Virusi in okolje
 - *Primer: Virusi v odpadnih vodah
- Virusi in biotehnološke aplikacije
 - *Primer: Bakteriofagi za zdravljenje bakterijskih okužb
 - *Primer: Virusi za gensko zdravljenje

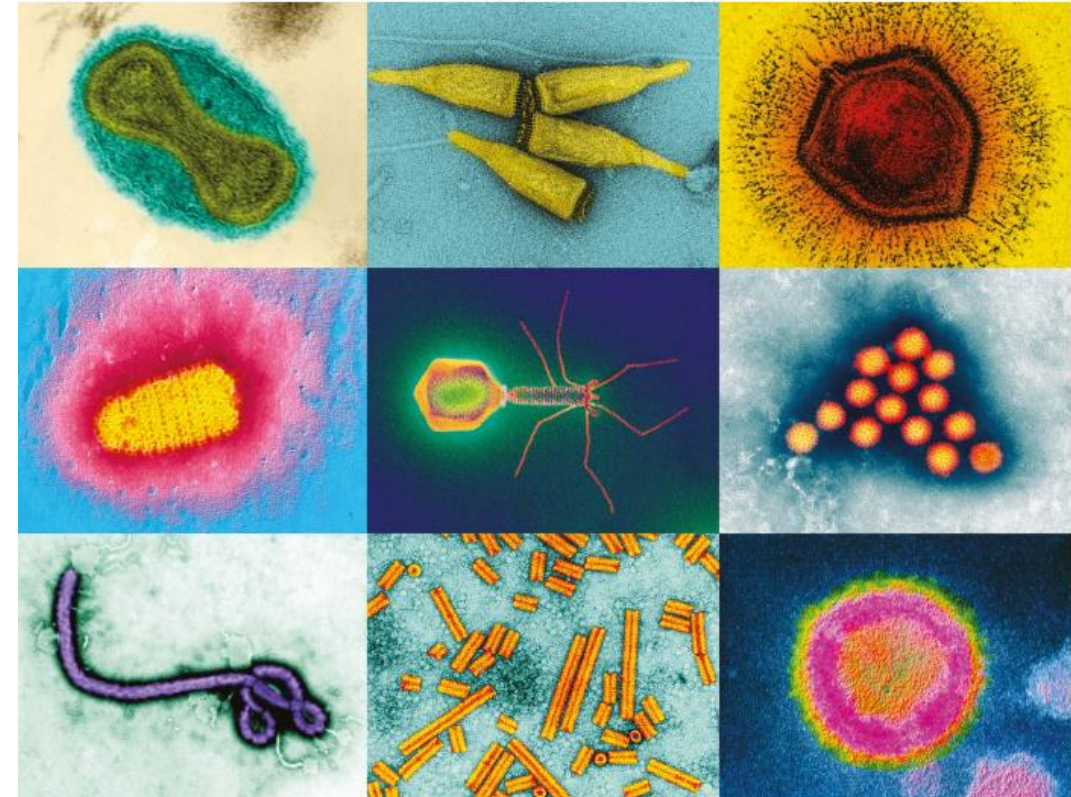


Virusi

- Najbolj raznolika in najštevilčnejša biološka entiteta
- V interakcijah z vsemi organizmi; okužujejo rastline, živali, človeka, bakterije
- Najdemo jih v najrazličnejših okoljskih vzorcih (oceani, arktični led, oblaki)
- Poznamo samo majhen del virusne raznolikosti

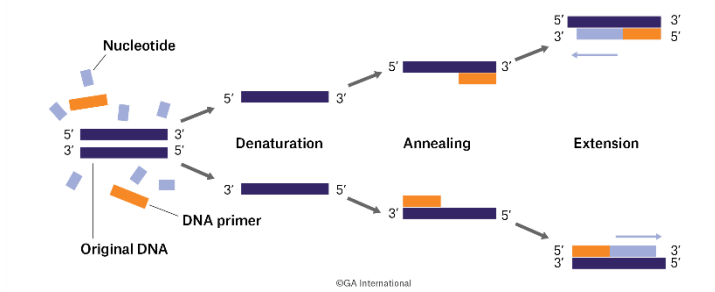
-dober čas za njihovo odkrivanje - tehnologija

The incredible diversity of viruses, *Nature* 2021



Metode za zaznavanje virusov – molekularne metode

- Metode za zaznavanje virusnih nukleinskih kislin (DNA, RNA)
PCR (verižna reakcija s polimerazo), qPCR, ddPCR, LAMP



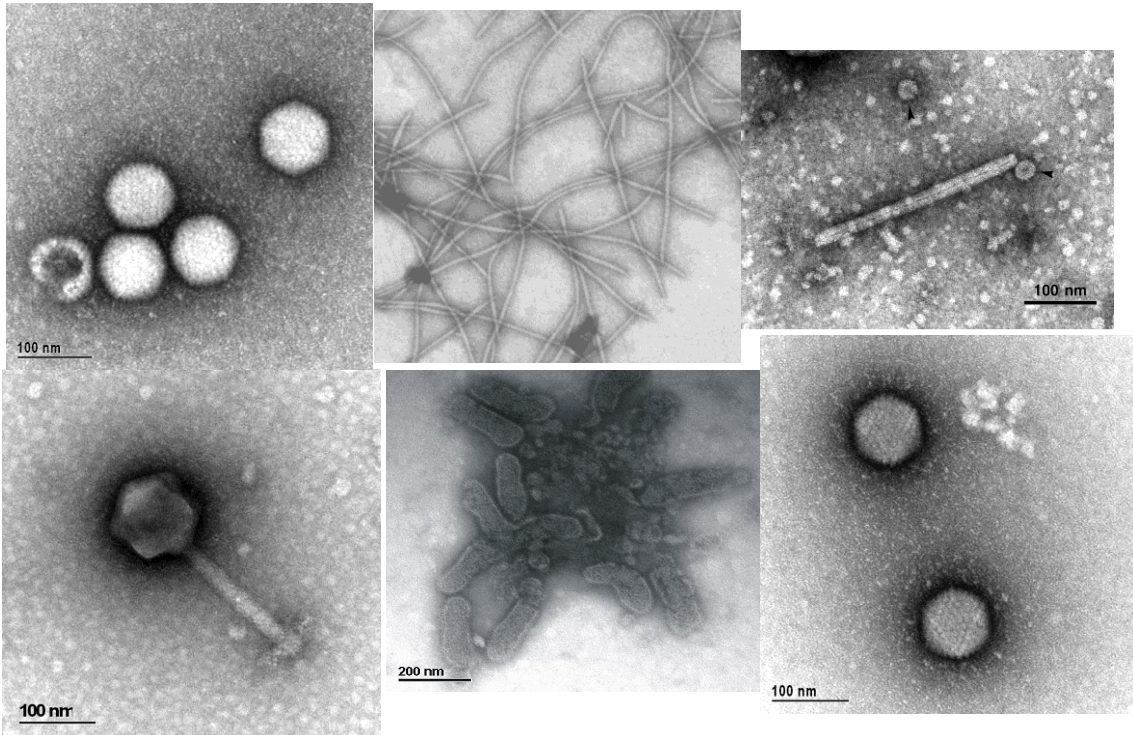
- Metode za zaznavanje virusnih beljakovin (serološki testi)
ELISA, hitri antigeni testi



TARČNO ZAZNAVANJE
VIRUSOV

Metode za zaznavanje virusov – NETARČNE METODE

- Biološki testi (okuževanje nabora gostiteljev)
- Elektronska mikroskopija



Presevni elektronski mikroskop

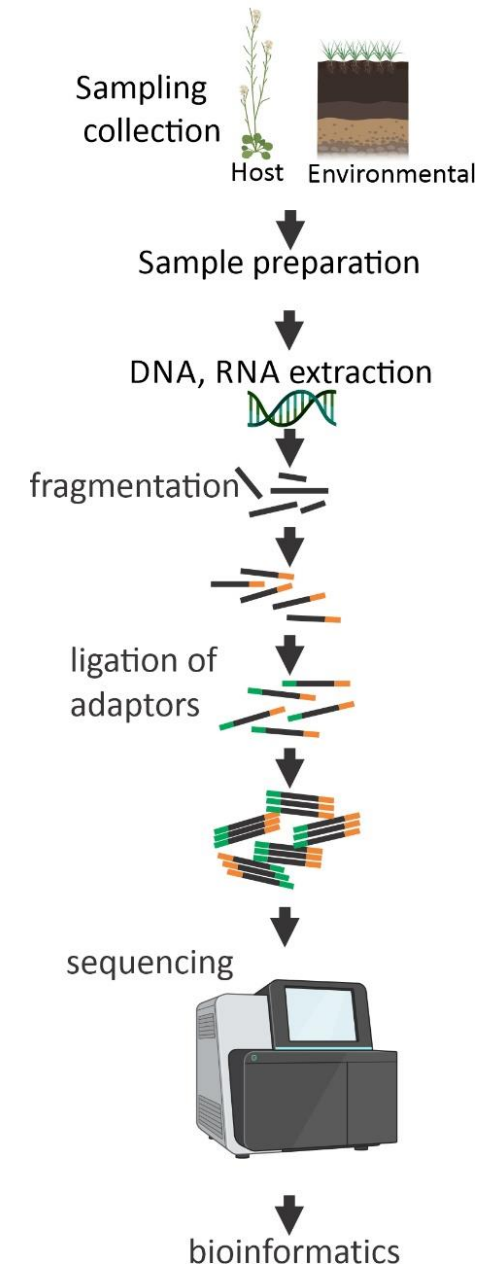
Metode za zaznavanje virusov – NETARČNE METODE

Visokozmogljivo sekvenciranje

- Nam omogoča da zaznamo zaporedje vseh nukleinskih kisline v vzorcu (s tem tudi vseh virusov prisotnih v vzorcu - **virom**).
- Virusi nimajo podobnih markerskih genov – potreben je povsem netarčni prostop. Predhodno znanje o zaporedju genomov, ki jih določamo ni potrebno - izjemno močno orodje za odkrivanje novih virusov.

Potek dela:

1. Vzorčenje gostiteljskega organizma oziroma okoljskega vzorca
2. Priprava vzorcev in izolacija nukleinskih kislin
3. Sekvenciranje (uporabimo lahko različne tehnologije)
4. Bioinformatška analiza



- Virusi kot povzročitelji bolezni (rastlin)



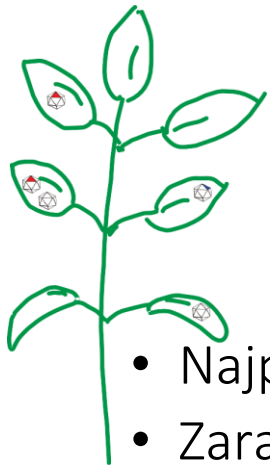
© Copyright APS

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/pages/tobacomosaic.aspx>



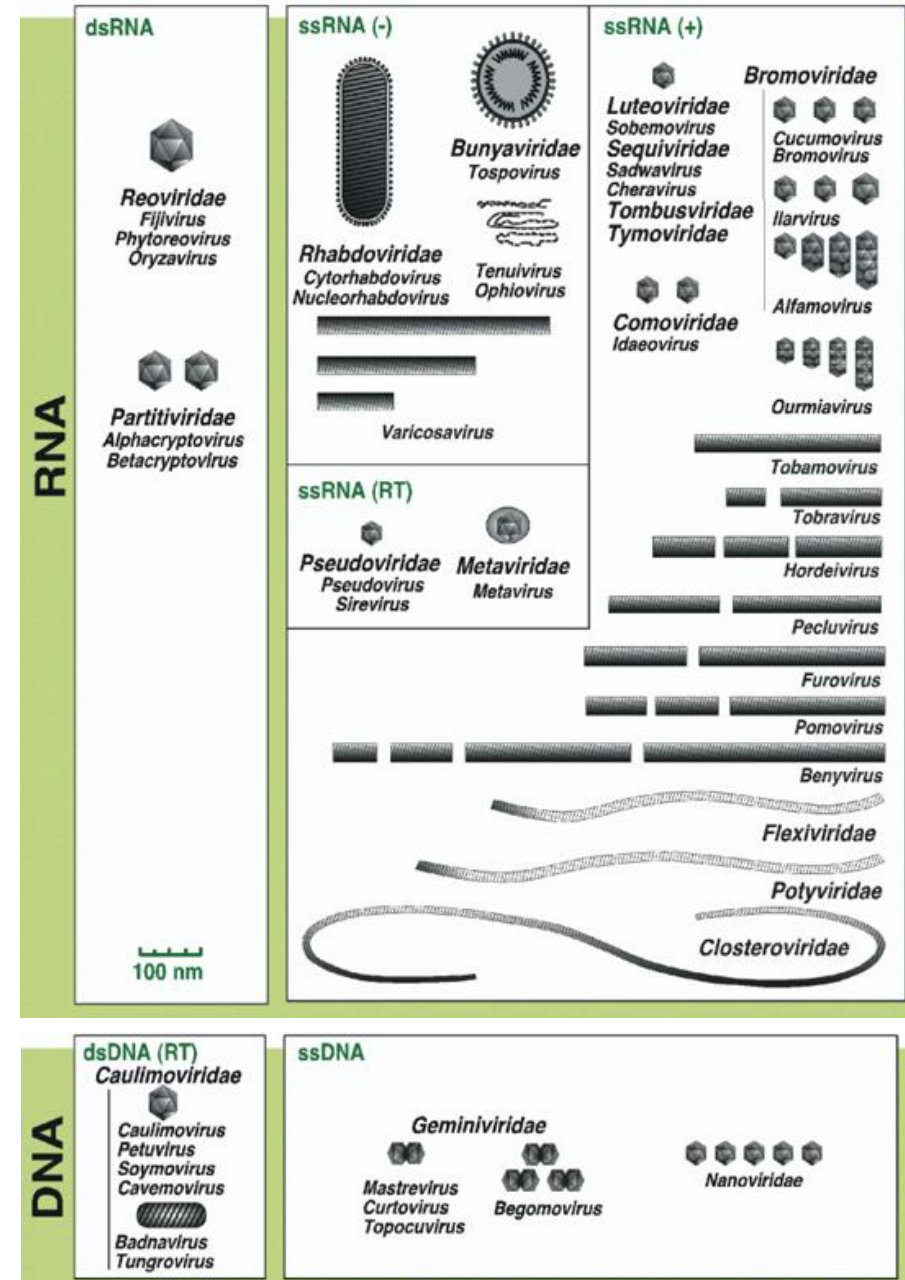
Zavod
Republike
Slovenije
za šolstvo



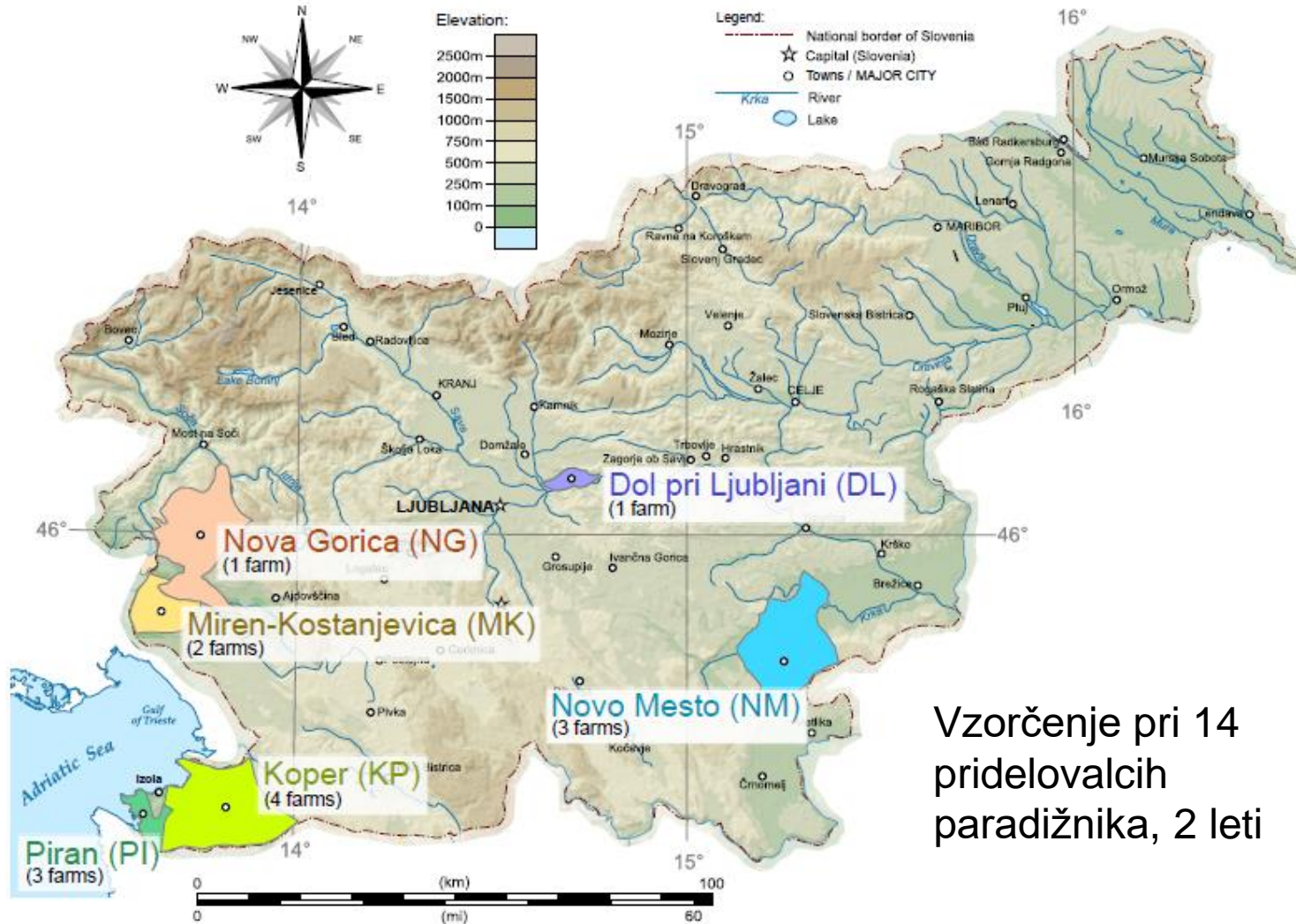


Virusi kot povzročitelji bolezni (rastlin)

- Najpogosteje RNA virusi, najrazličnejših oblik
- Zaradi različne strukture rastlinske celice, je vstop virusov v celice pri rastlinah drugačen kot npr. pri človeku. Potrebna je ranitev kutikule, celične stene.
- Mehanski prenos (stik okuženih rastlin, orodja, rok, oblačil, opraševalcev...).
- Prenos preko okužene vode, zemlje, celo vetra.
- Vertikalno (semena, pelod) ali z vegetativnim razmnoževanjem (gomolji, cepljenje).
- S prenašalci (žuželke, pršice, ogorčice, glive).
- Ekonomska škoda - ocena: 15-45 milijard \$ letno, ogrožajo prehransko varnost.
- Ukrepi za omejevanje so omejeni: karantene, razvoj in uporaba odpornih kultivarjev, navzkrižna zaščita, higienski ukrepi (zmanjševanje vira okužbe), zatiranje in izogibanje prenašalcem.



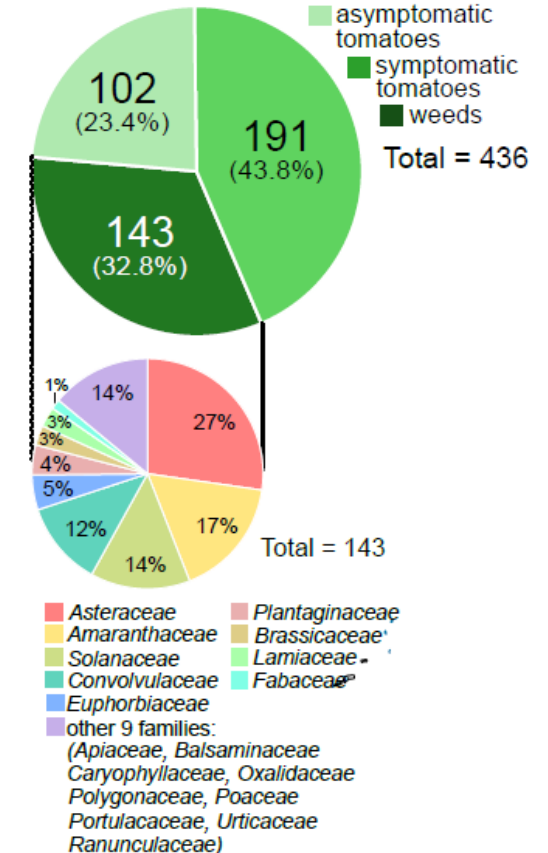
Primer: Virom paradižnika in plevelnih rastlin



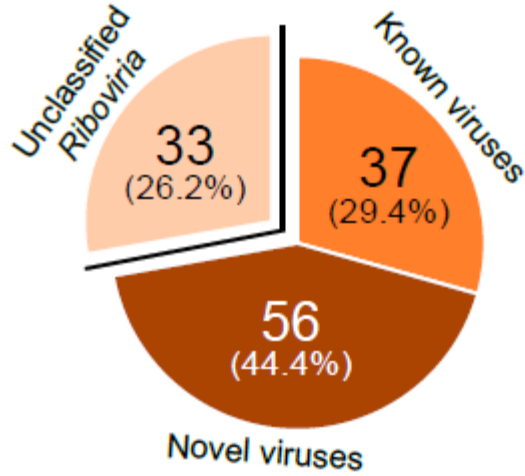
Vzorčenje pri 14 pridelovalcih paradižnika, 2 leti

Vzorčenje in iskanje virusov v:

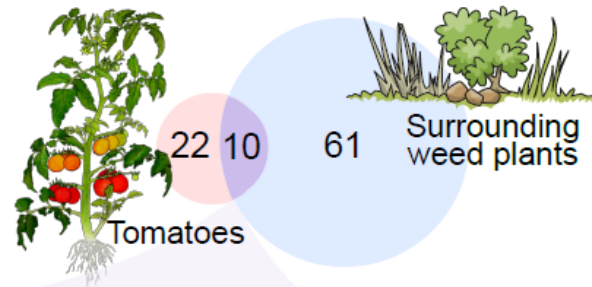
- Rastlinah paradižnika z bolezenskimi znamenji
- Na videz zdravih rastlinah paradižnika
- Plevelnih rastlinah v bližini paradižnika



Primer: Virom paradižnika in plevelnih rastlin



> 10 virusov smo našli tako v vzorcih paradižnika kot plevelnih rastlin



tomato spotted wilt orthotospovirus (TSWV), cucumber mosaic virus (CMV), tomato mosaic virus (ToMV), potato virus y (PVY), Solanum nigrum ilarvirus 1 (SnIV1), Ranunculus white mottle ophiovirus (RWMV), Leveillula taurica associated rhabdo-like virus 1 (LtaRLV1), tomato matilda virus (TMaV), Aphis glycines virus 1 (AGV1), plant associated tobamo-like virus 1 (PaToLV1)

Virus family / Known hosts (icons)	Genome composition	No. of viruses detected			No. of unique species
		Weeds	Symptomatic tomatoes	Asymptomatic tomatoes	
Albetovirus*	(+)ssRNA	-	1	1	1
Alphaflexiviridae	(+)ssRNA	1	1	-	2
Amalgaviridae	dsRNA	-	1	1	1
Aspiviridae	(-)ssRNA	1	1	1	1
Betaflexiviridae	(+)ssRNA	-	2	2	3
Bromoviridae	(+)ssRNA	4	2	1	6
Caulimoviridae	circular dsDNA-RT	-	2	-	2
Closteroviridae	(+)ssRNA	-	4	-	4
Dicistroviridae	(+)ssRNA	-	3	-	3
Endomoviridae	(+)ssRNA	-	1	1	2
Fimoviridae	(-)ssRNA	-	1	-	1
Iflaviridae	(+)ssRNA	2	1	1	3
Kitaviridae	(+)ssRNA	-	1	-	1
Lispiviridae	(-)ssRNA	-	1	-	1
Partitiviridae	dsRNA	1	6	-	7
Picomoviridae	(+)ssRNA	1	2	-	2
Potyviridae	(+)ssRNA	5	4	1	10
Rhabdoviridae	(-)ssRNA	-	6	3	11
Secoviridae	(+)ssRNA	1	5	-	6
Solemoviridae	(+)ssRNA	2	3	-	5
Tombusviridae	(+)ssRNA	1	5	4	10
Tospoviridae	(-)ssRNA	1	1	1	3
Totiviridae	dsRNA	-	3	1	4
Virgaviridae	(+)ssRNA	1	2	1	3
Geminiviridae	circular ssDNA	-	1	-	1
Total no. of classified viruses in each sample type (overlaps are counted)					
					21 / 49 22 / 7 11 / 4
satellite RNAs, tilar RNAs	(+)ssRNA	-	3	3	7
viroid-like circular RNAs	circular ssRNA	-	5	-	5
putative Riboviria	(varies)	3	11	3	21
Total no. of unique viruses					126

> Zaznani virusi pripadajo 25 različnim virusnim družinam + predstavjajo nove neklasificirane RNA viruses

> Večina (novih) virusov odkrita v plevelnih rastlinah

Virusi in bolezni rastlin (virus rjave grbančavosti plodov paradižnika)

- Tobamovirus, zelo stabilen v okolju.
- Trenutno porajajoči virus, ki povzroča zelo velike probleme v pridelavi paradižnika.
- Prenos z dotikom.
- Globalna epidemija – prvič zaznan 2014 v Izraelu, danes ga najdemo skoraj povsod po svetu.



Photo: Heike Scholz-Döbelin (LWK NRW)



Photo: Prof. Salvatore Davino



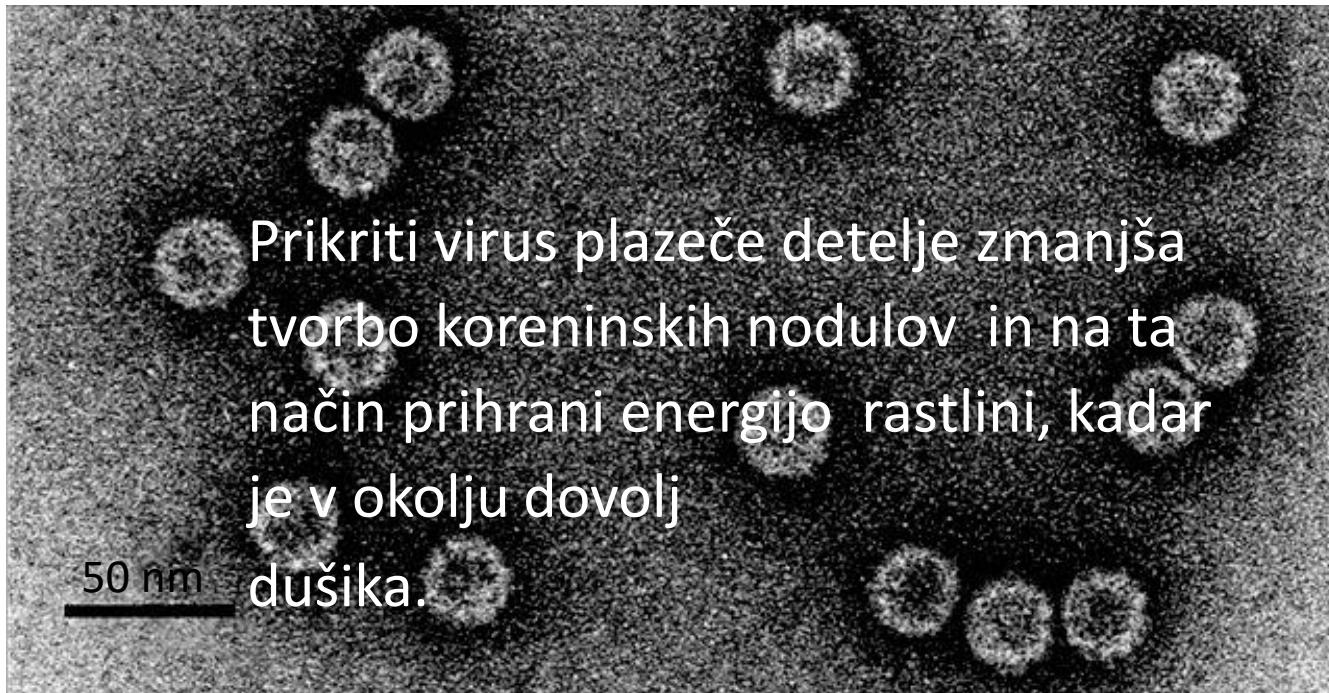
Zavod
Republike
Slovenije
za šolstvo



Raznolike vloge virusov za delovanje njihovih gostiteljev in ekosistemov

Viruse smo pričeli odkrivati zaradi bolezni, ki jih povročajo.

Poznamo pa tudi viruse, ki imajo pozitiven učinek na gostitelje ali pa na prvi pogled nimajo škodljivih učinkov.



Prikriti virus plazeče detelje zmanjša tvorbo koreninskih nodulov in na ta način prihrani energijo rastlini, kadar je v okolju dovolj dušika.

Norovirus miši lahko nadomesti vlogo črevesne mikrobiote (bakterij) in omogoči homoestazo delovanja črevesja pri miših.

Kernbauer et al., *Nature*, 2014

Ghabrial et al., *Seventh Report of ICTV*, 2000





- Virusi in okolje

Vloga virusov za delovanje ekosistemov

- Virusi pomembno prispevajo h kroženju snovi v okolju (*kroženje ogljika v oceanih).
- Premikajo fragmente DNA med gostiteljskimi vrstami kar pripomore k evoluciji
- Viruse najdemo v vseh okoljih, tudi npr. v ekstremnih okoljih (*virusi arhej v termalnih vrelicih).
- Raznolikost virusov iz okoljskih vzorcev je zelo velika - virusna temna snov.
- Največje število raziskav je opravljenih na viromih oceanov, s poudarkom na preučevanju bakteriofagov v takih vzorcih.
- Redkejša študije so osredotočajo na sladkovodna telesa, zemljo ipd. in zelo redke študije podrobno raziskujejo prisotnost rastlinskih virusov v takih vzorcih



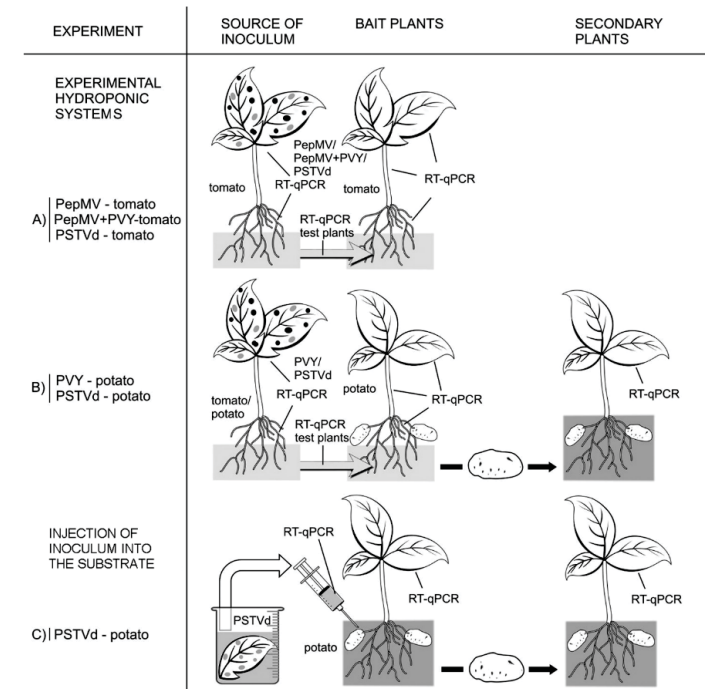
Viromi okoljskih vzorcev

Rastlinski virusi v vodi



- Nekateri virusi so v okolju zelo stabilni (izven gostitelja)
- Patogeni rastlinski virusi se lahko prenašajo z vodo
- Prenos na dolge razdalje (epidemiološki pomen)
- Virusi so pogosto odporni na standardne procese čiščenja voda
- Vpliv ponovno uporabljene odpadne vode na kmetijstvo in ekosisteme

Mehle et al, 2015, *Applied and Environmental Microbiology*



Z metodami visokozmogljivega sekvenciranja lahko dobimo najbolj širok vpogled v virome vzorcev vode.

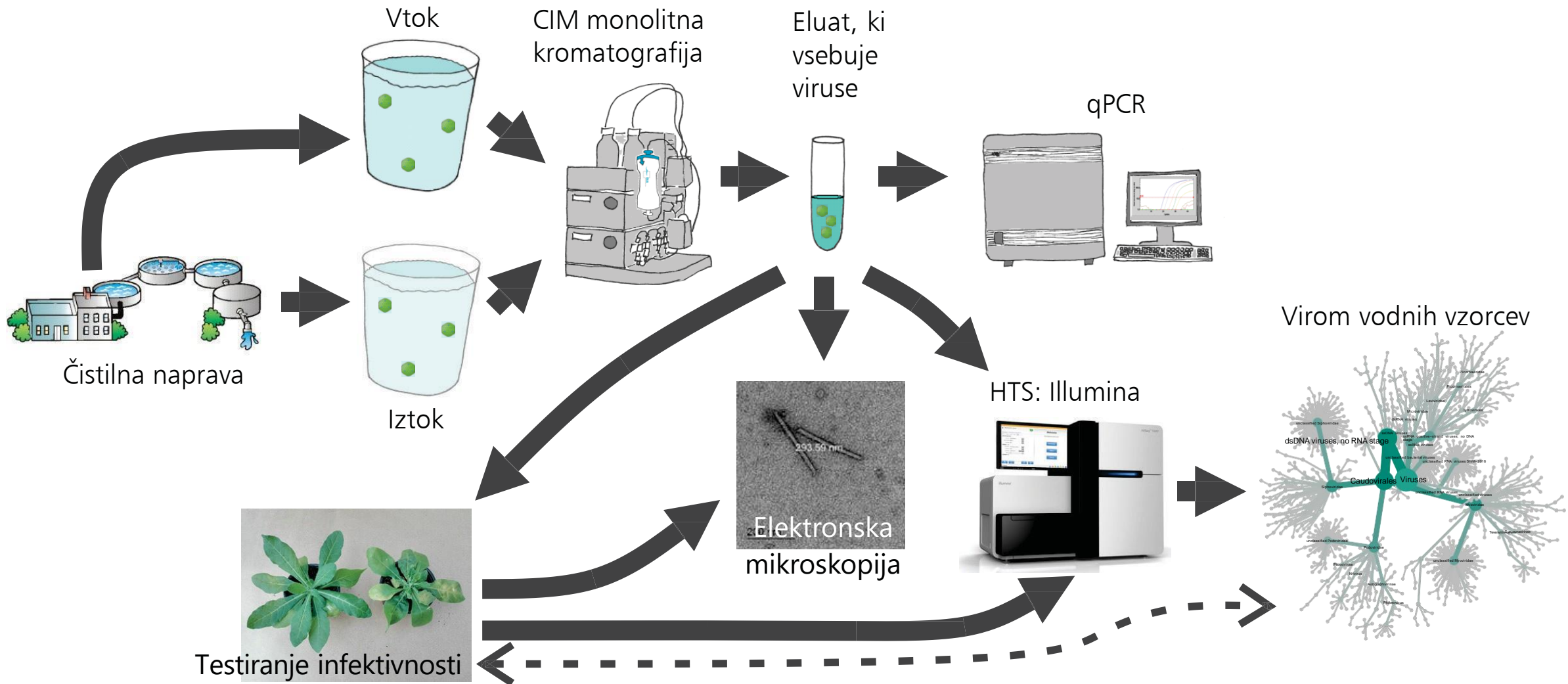


Zavod
Republike
Slovenije
za šolstvo



Primer: Viromi okoljskih vzorcev – odpadne vode

Bačnik et al., *Water Research*, 2020



Viromi okoljskih vzorcev

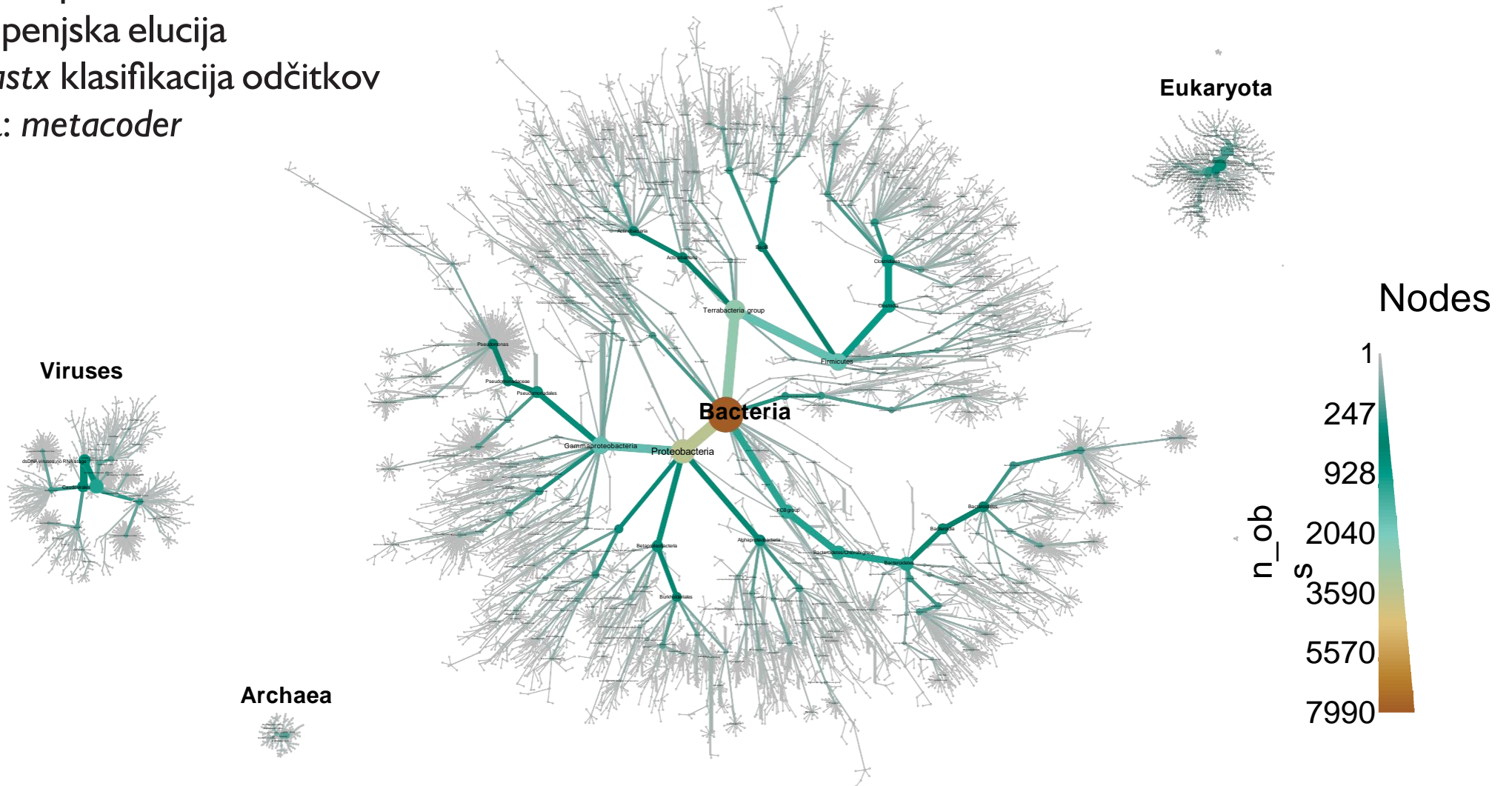
Iztok čistilne naprave

CIM enostopenjska elucija

Diamond blastx klasifikacija odčitkov

Vizualizacija: *metacoder*

Bačnik et al., *Water Research*, 2020



Viromi okoljskih vzorcev

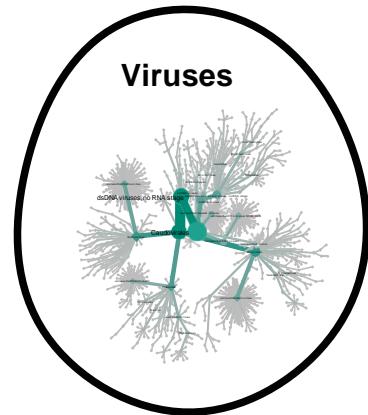
Iztok čistilne naprave

CIM enostopenjska elucija

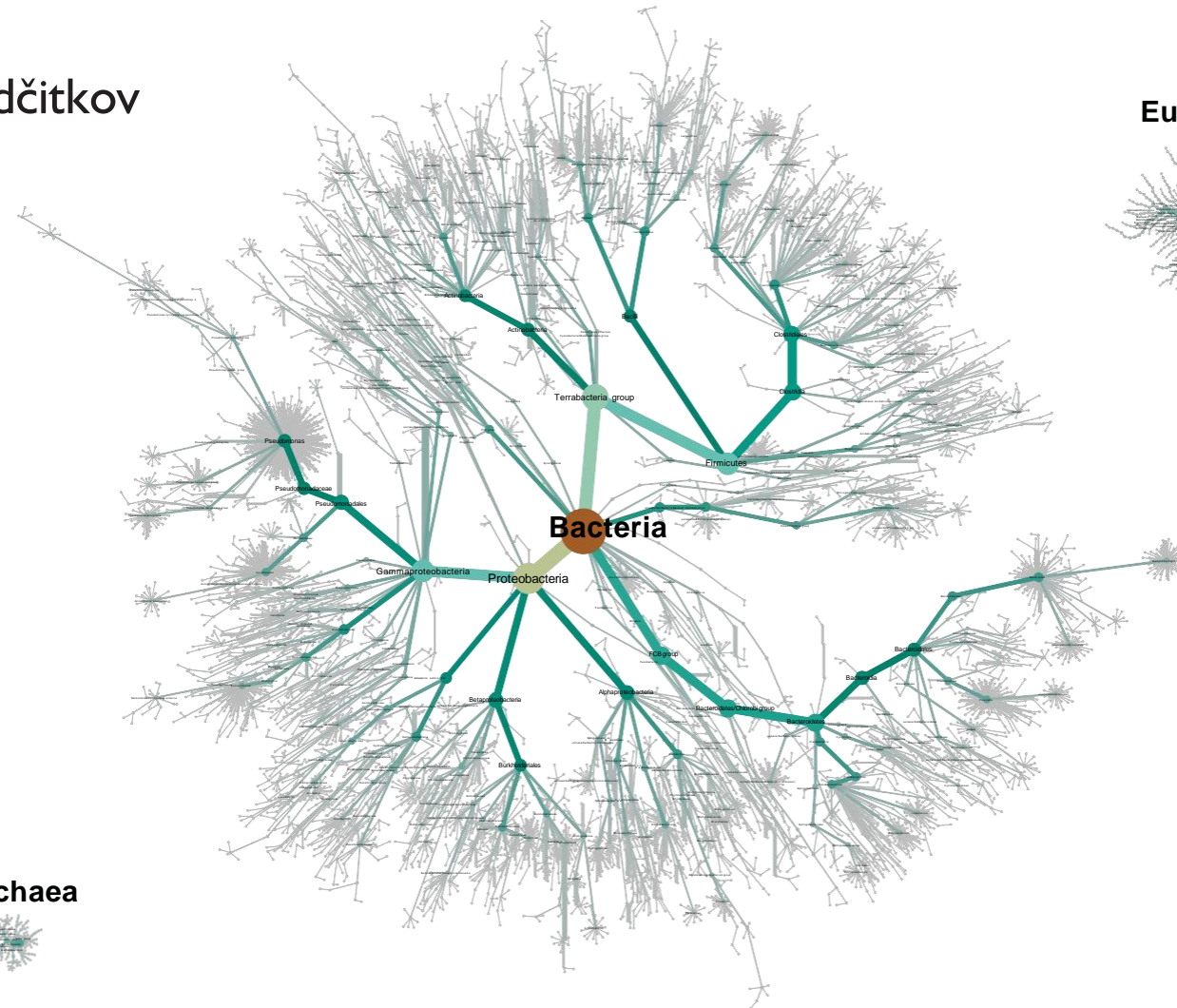
Diamond blastx klasifikacija odčitkov

Vizualizacija: *metacoder*

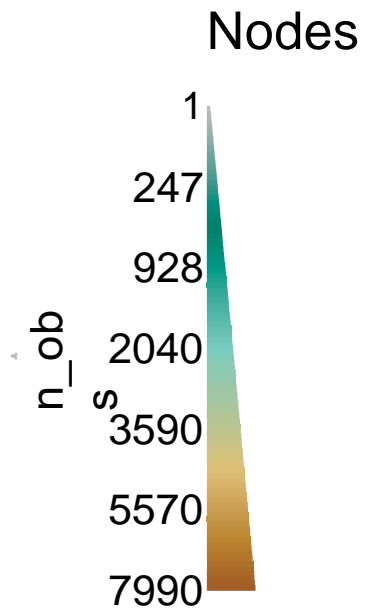
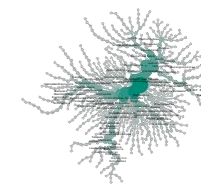
Bačnik et al., *Water Research*, 2020



Archaea



Eukaryota



Viromi okoljskih vzorcev

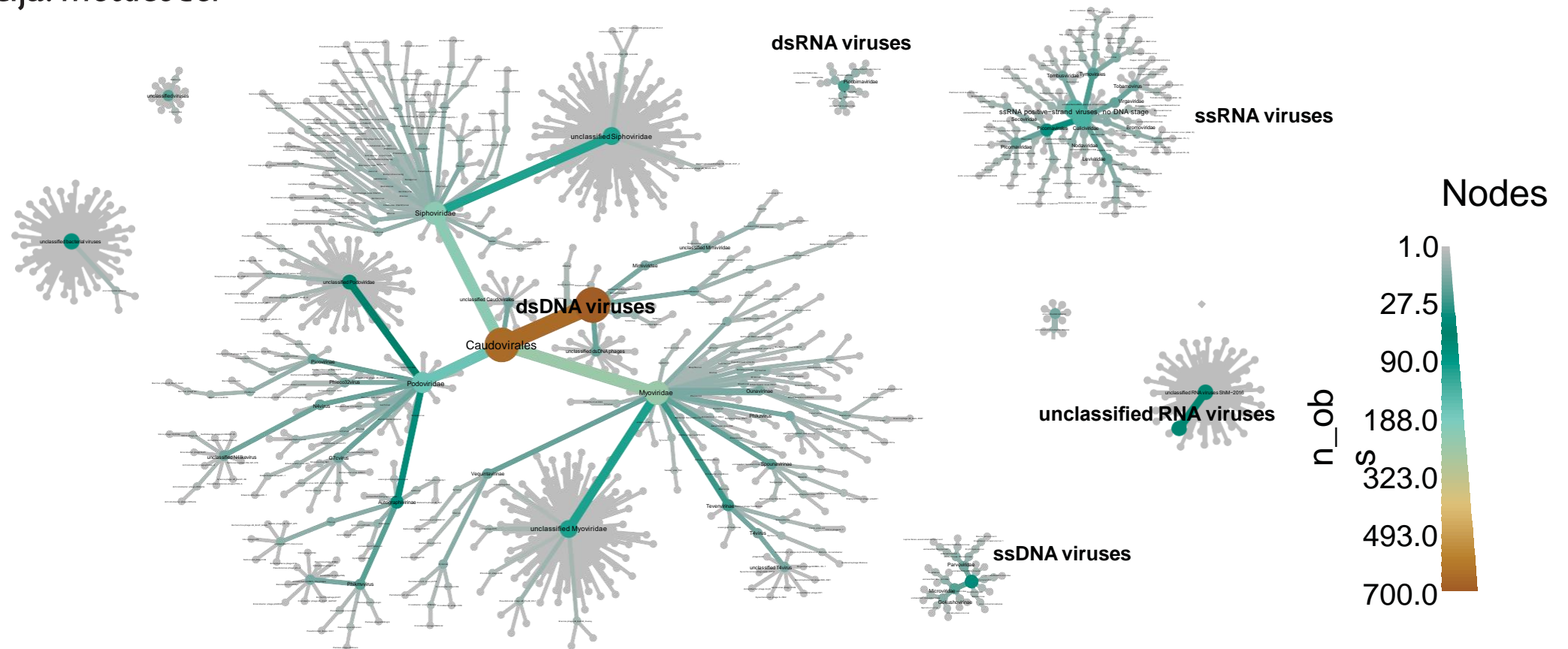
Iztok čistilne naprave

CIM enostopenjska elucija

Diamond blastx klasifikacija odčitkov

Vizualizacija: *metacoder*

Bačnik et al., *Water Research*, 2020



Viromi okoljskih vzorcev

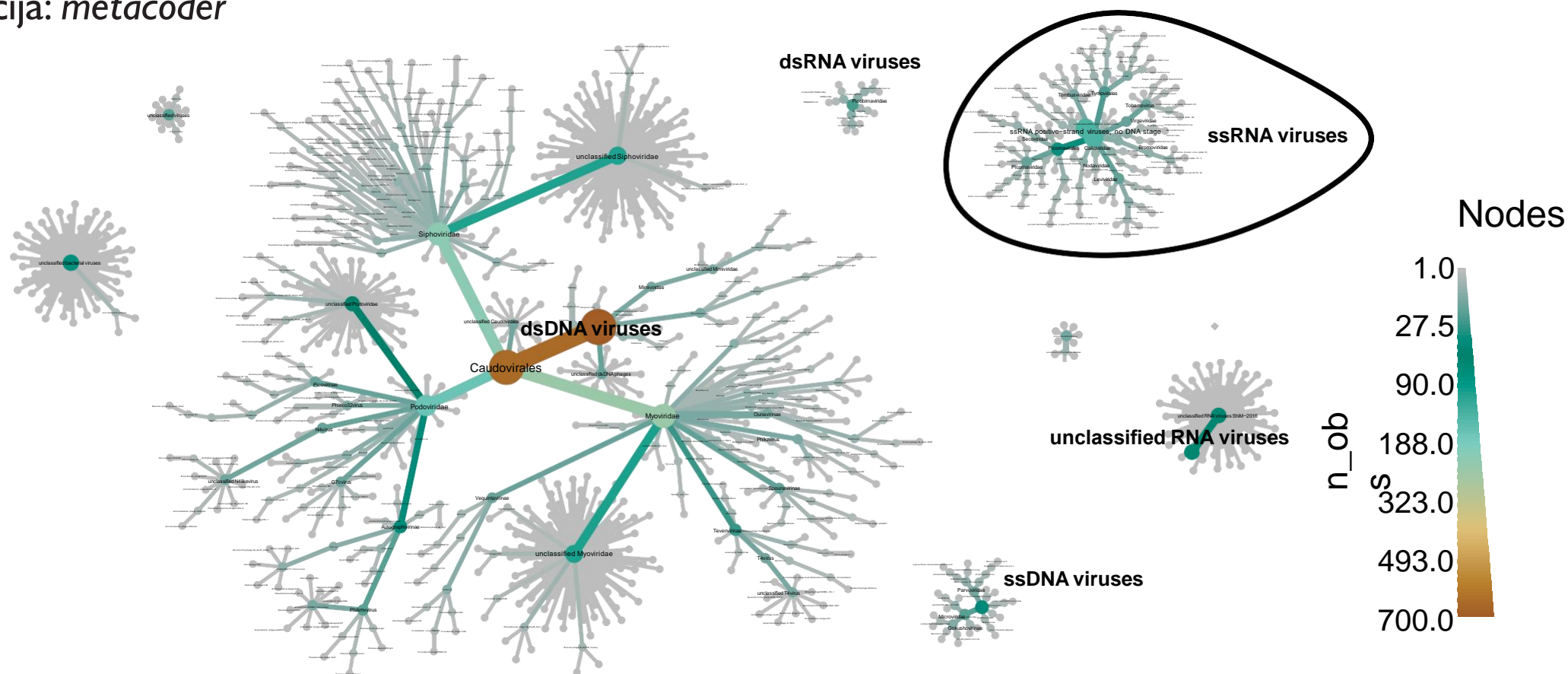
Iztok čistilne naprave

CIM enostopenjska elucija

Diamond blastx klasifikacija odčitkov

Vizualizacija: *metacoder*

Bačnik et al., *Water Research*, 2020



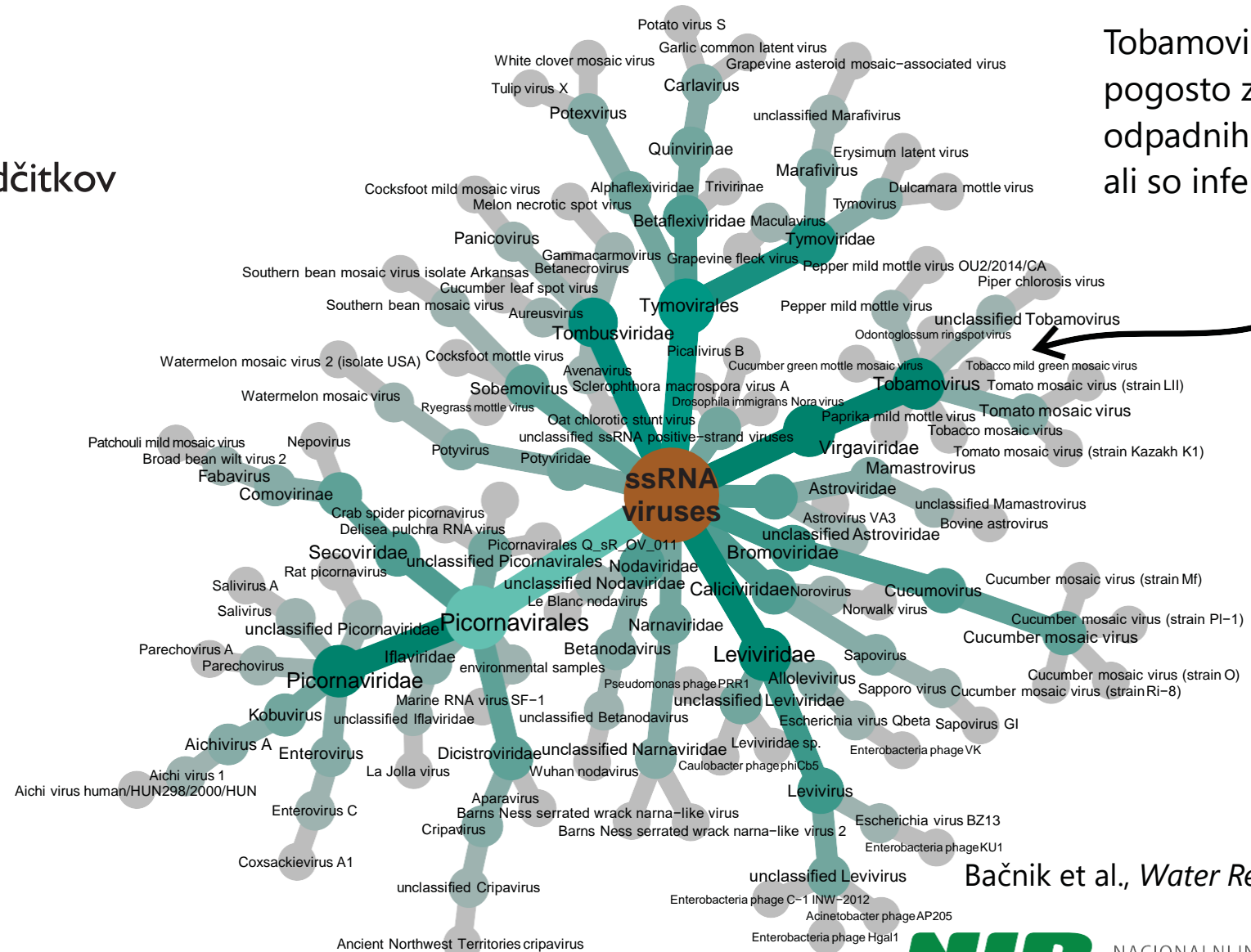
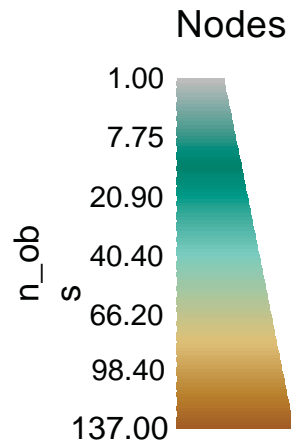
Viromi okoljskih vzorcev

Iztok čistilne naprave

CIM enostopenjska elucija

Diamond blastx klasifikacija odčitkov

Vizualizacija: *metacoder*



Tobamoviruse
pogosto zaznamo v
odpadnih vodah -
ali so infektivni?

Bačnik et al., *Water Research*, 2020



NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY

Viromi okoljskih vzorcev

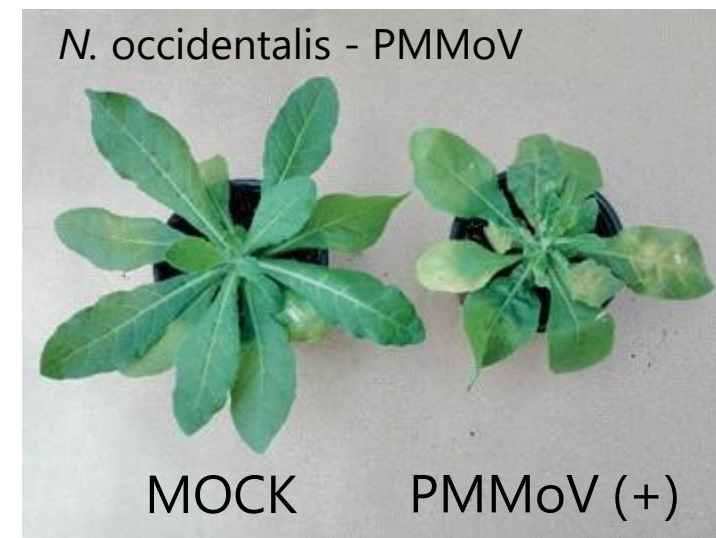
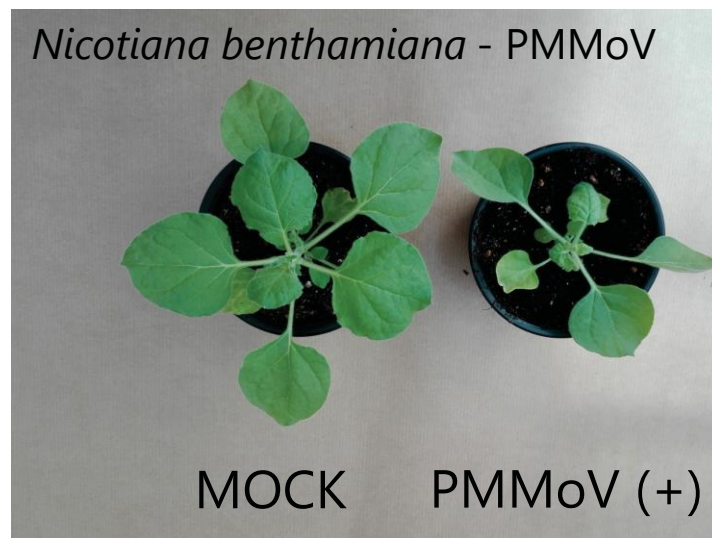
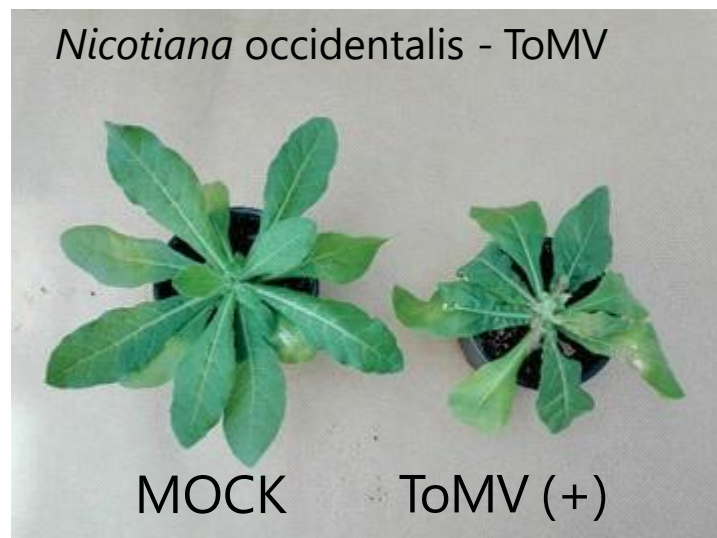
Bačnik et al., *Water Research*, 2020

Testne rastline po mehanski inokulaciji z vtokom v čistilno napravo

Bolezniški znaki na nekaterih inokuliranih rastlinah.

Sekvenciranje malih RNA je pokazalo prisotnost dveh različnih infektivnih tobamovirusov.

Virus blage lisavosti paprike (PMMoV)
in ***virus mozaika paradižnika*** (ToMV)



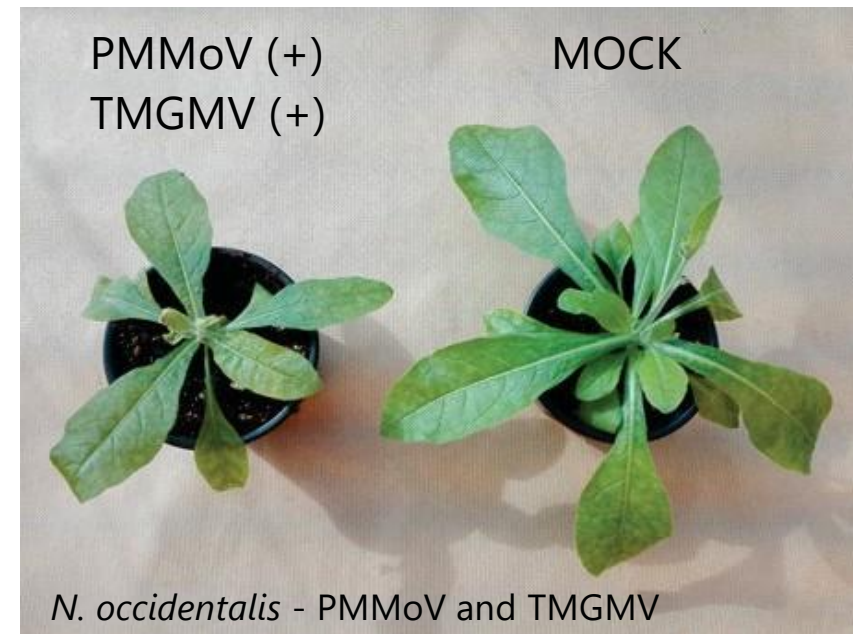
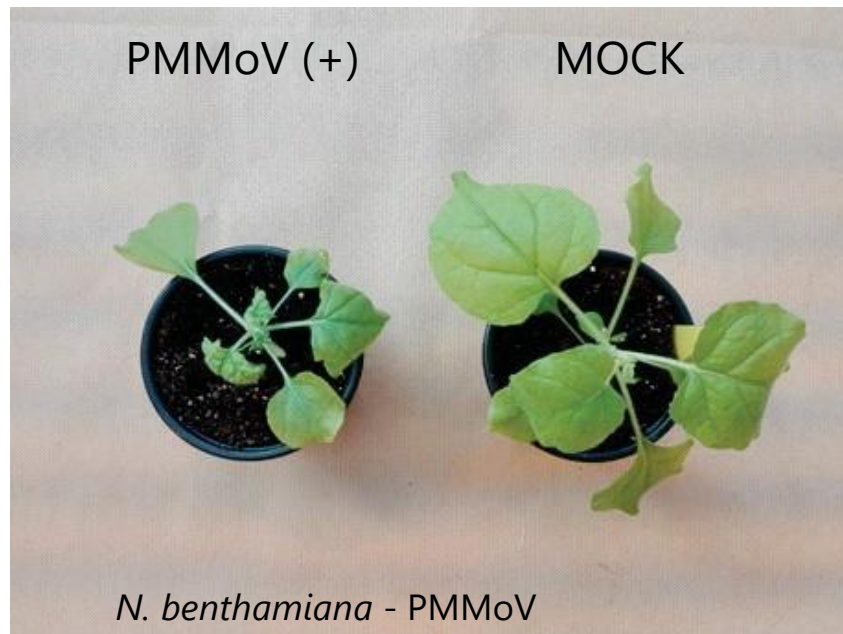
Viromi okoljskih vzorcev

Bačnik et al., *Water Research*, 2020

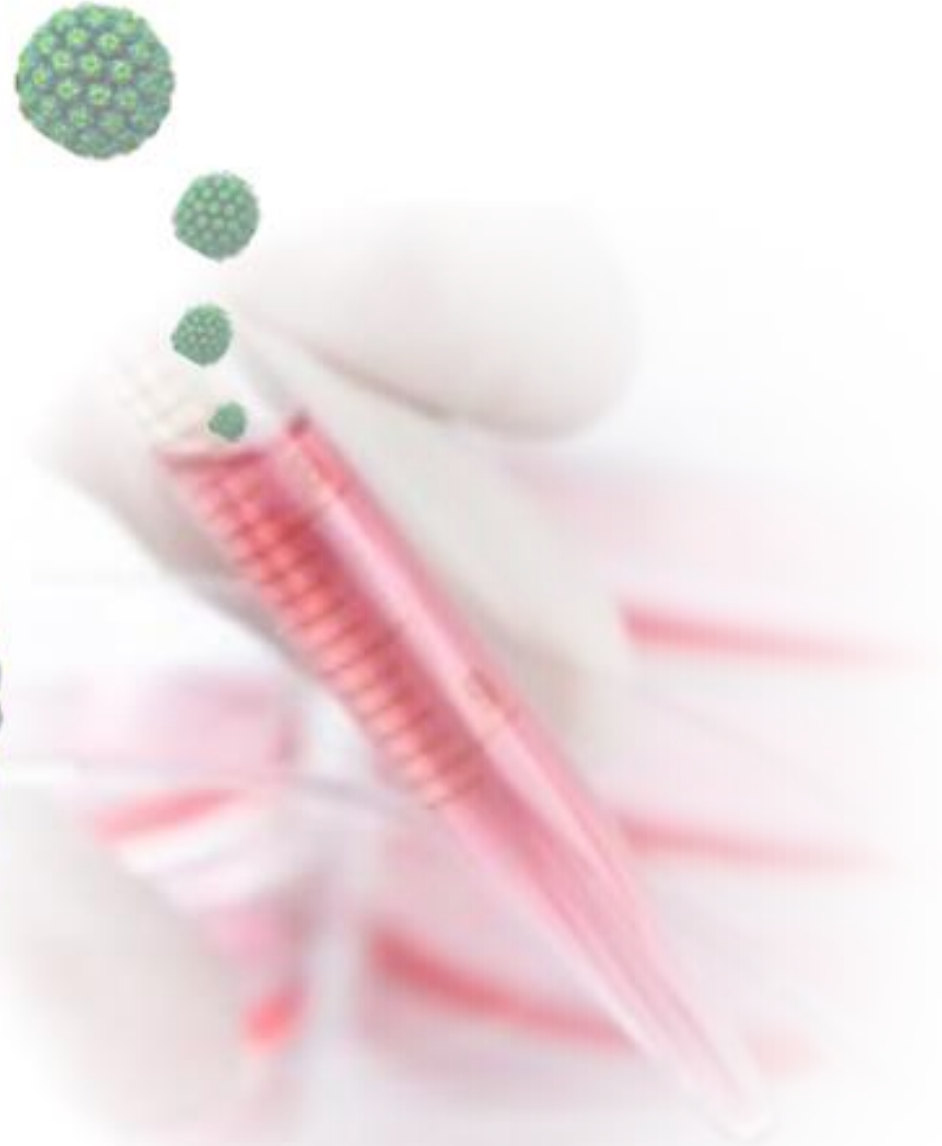
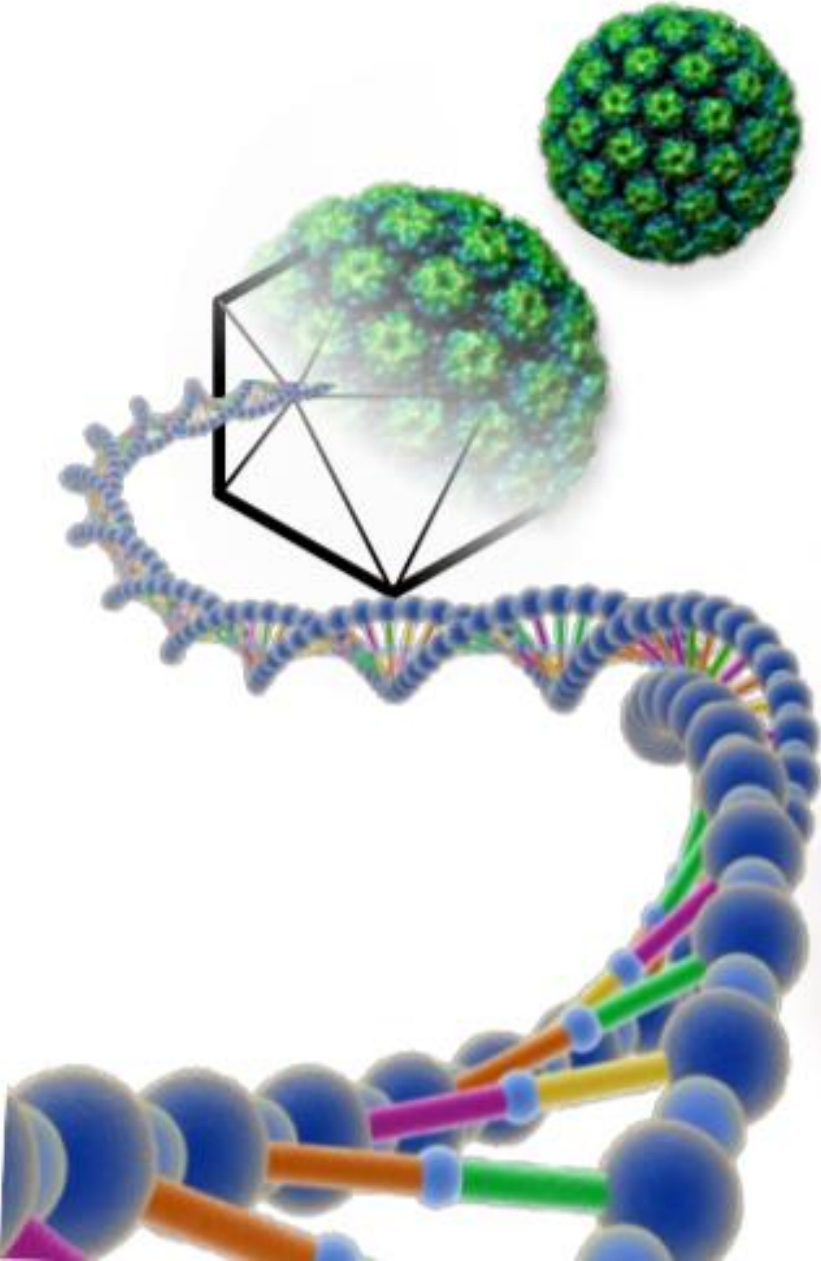
Testne rastline po mehanski inokulaciji z iztokom iz čistilne naprave

Bolezniški znaki na nekaterih inokuliranih rastlinah.
Sekvenciranje malih RNA je pokazalo prisotnost dveh različnih infektivnih tobamovirusov.

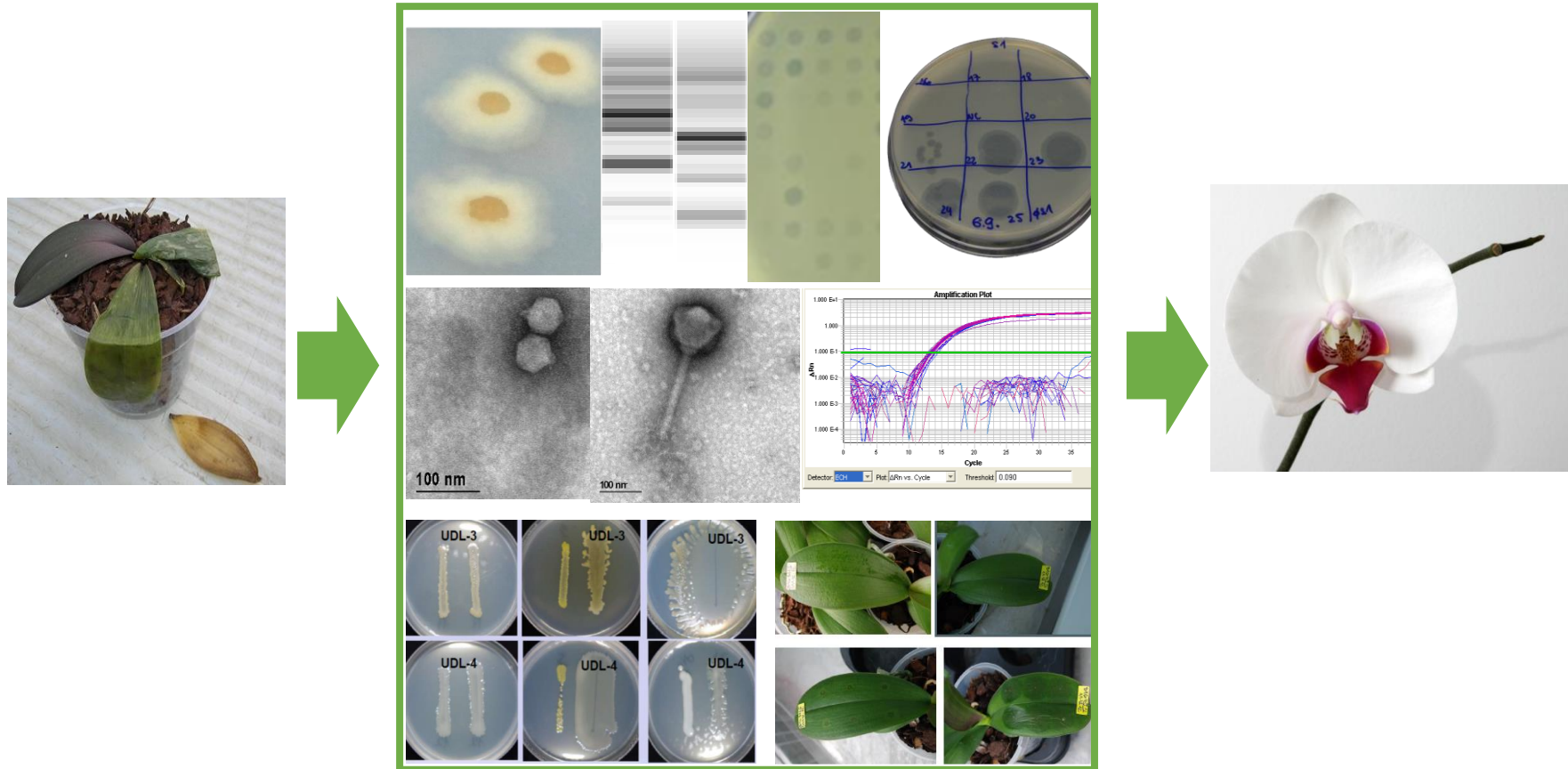
Virus blage lisavosti paprike (PMMoV)
in ***virus blagega zelenega mozaika tobaka*** (TMGMV)



- Virusi in biotehnološke aplikacije



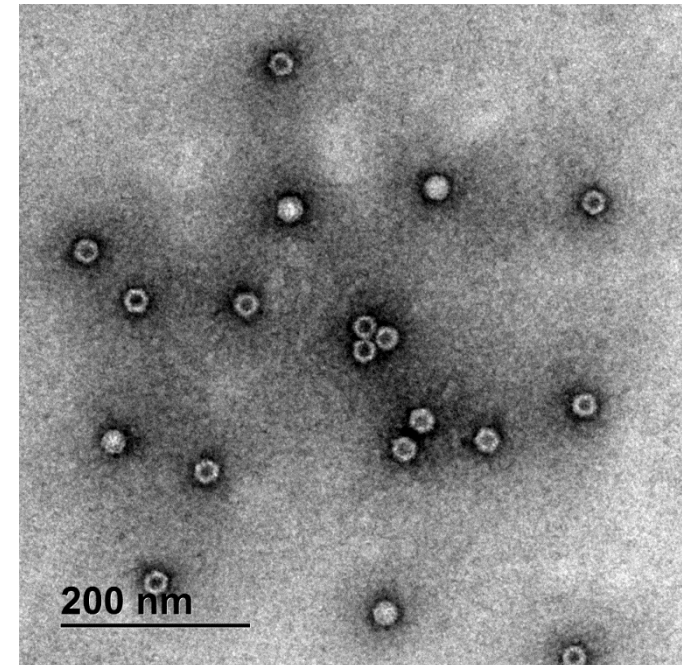
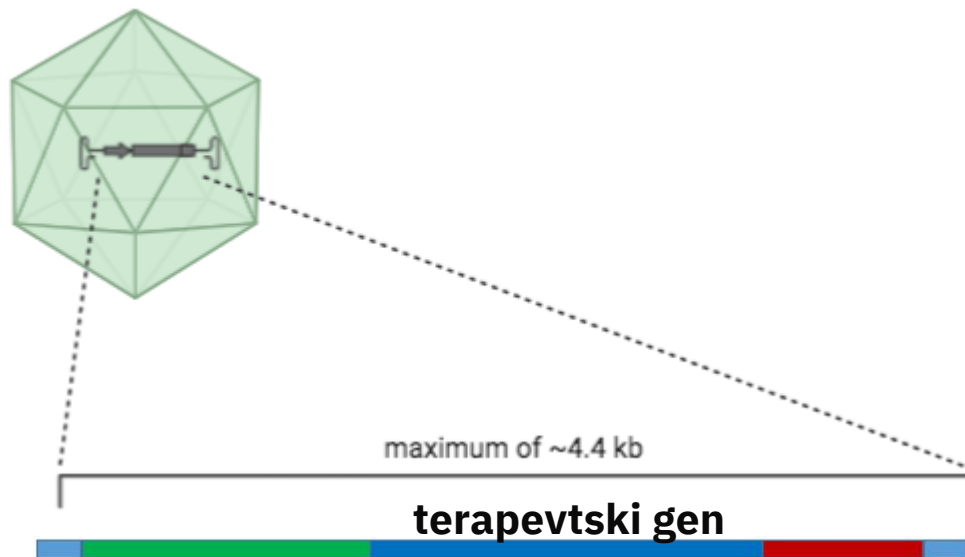
Primer: Bakteriofagi za zdravljenje bakterijskih okužb rastlin



- izolacija in identifikacija povročiteljev mehkih gnilob orhidej (bakterije iz rodu *Dickeya*).
- Izolacija bakteriofagov, ki povročajo okužbo pri bakterijskih izolatih.
- Preučevanje možnosti biokontrole identificiranih povročiteljev bolezni s pomočjo bakteriofagov.

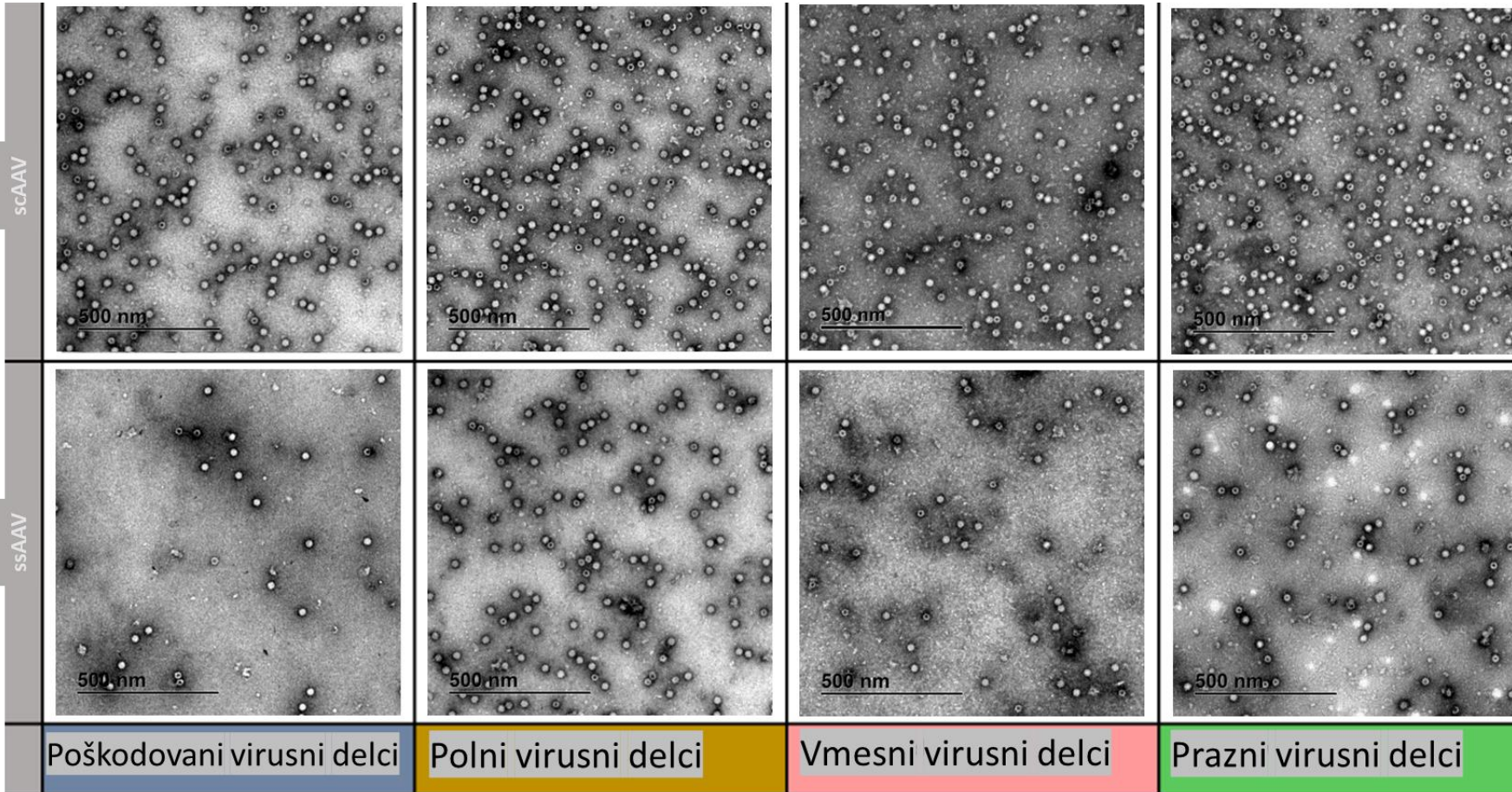
Primer: Virusi za gensko zdravljenje

- Gensko zdravljenje je metoda, pri kateri z vnosom dednega materiala v celico uravnavamo ali modificiramo ekspresijo genov z namenom zdravljenja različnih bolzeni (rakava obolenja, bolezni, ki so posledica genskih okvar)
- **adeno-povezani virusi** (adeno-associated viruses, AAV) – najpogosteje uporabljeni za gensko terapijo



AAV virusni delci pod elektronskim mikroskopom

Z elektronsko mikroskopijo ovrednotimo količino različnih populacij virusnih delcev (polni, prazni, poškodovani)



- Določimo koncentracije virusnih delcev (molekularne metode)
- Določamo prisotnost nečistoč (fragmenti DNA) v vzorcih s sekvenciranjem

Namesto zaključka - povabilo

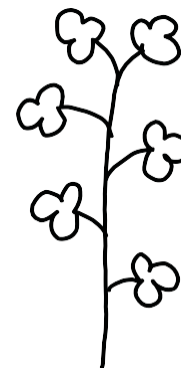
- 26. maj Dan očarljivih rastlin
- 3., 4., 5. junij - Znanstival
- 9. junij Dan odprtih vrat Morske biološke postaje Piran
- 29. september Noč raziskovalcev - Dan odprtih vrat NIB



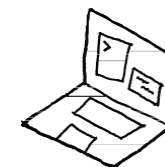
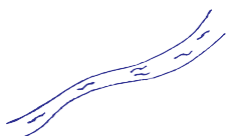
Gradnja Biotehniškega stičišča Nacionalnega inštituta za biologijo



Zahvala



Hvala za pozornost!



arrs
SLOVENIAN RESEARCH AGENCY



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,
ZNANOST IN ŠPORT



EVROPSKA UNIJA
EVROPSKI SKLAD ZA
REGIONALNI RAZVOJ
NALOŽBA V VAŠO PRIHODNOST



NACIONALNI INŠTITUT ZA BIOLOGIJO
NATIONAL INSTITUTE OF BIOLOGY



Zavod
Republike
Slovenije
za šolstvo

