



# VIROIDI

Mojca Viršček Marn  
Kmetijski inštitut  
Slovenije



**Ime viroid je leta 1971 izbral Diener, ki je odkril povzročitelja vretenatosti krompirjevih gomoljev.**

**Vretenatost krompirjevih gomoljev je od leta 1920 povzročala težave pri pridelovanju semenskega krompirja v severnem delu ZDA in v Kanadi.**

**Do sedaj je znanih okrog 30 vrst viroidov.**



# Taksonomska razdelitev

- Predstavniki iz družine **Pospiviroidae** se razmnožujejo v celičnem jedru po asimetričnem načinu in imajo v svoji sekvenci t.i. “central conserved region”
- Razmnoževanje predstavnikov iz družine **Avsunviroidae** poteka v kloroplastih po simetrični metodi.

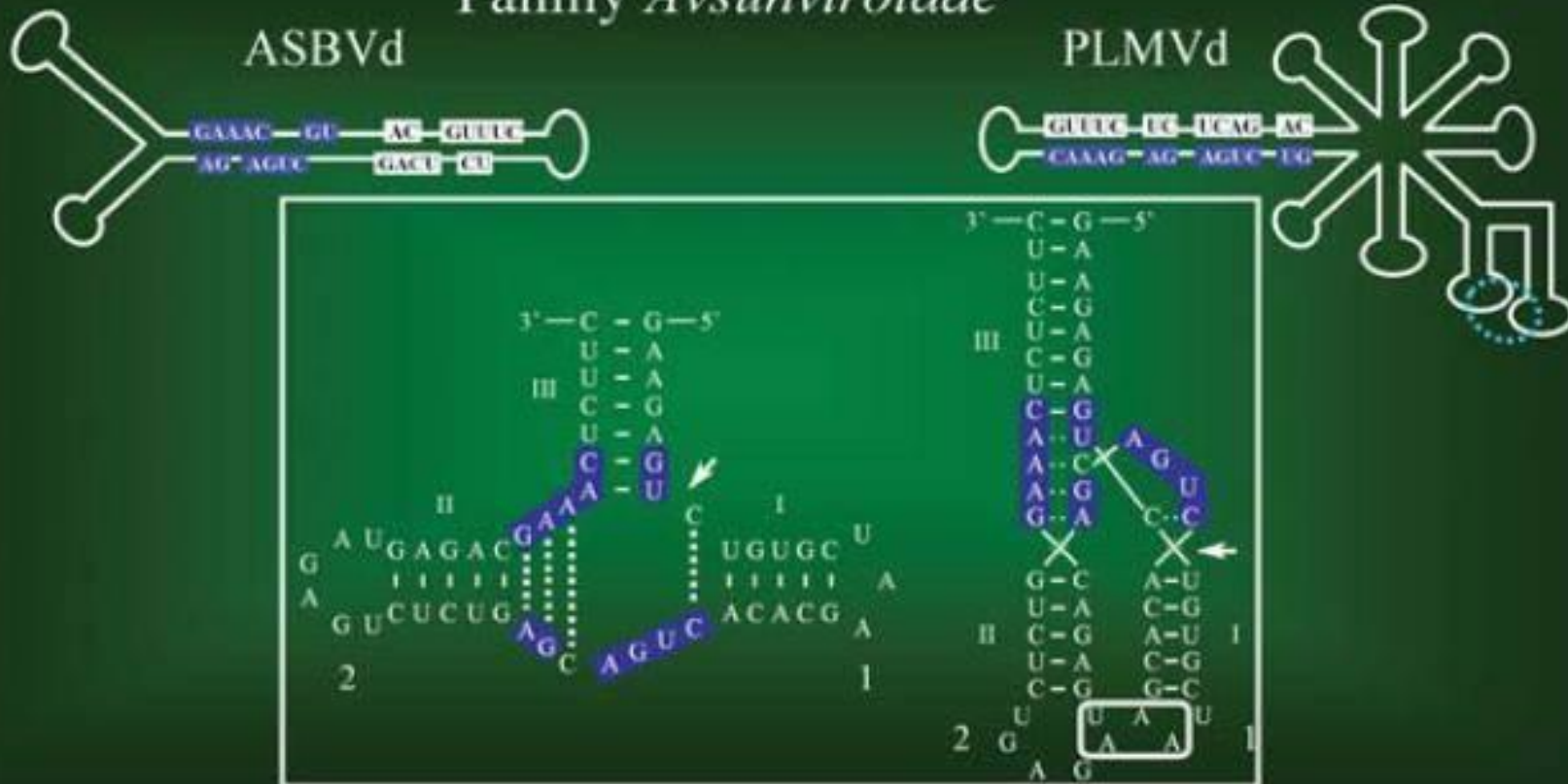
a

### Family *Pospiviroidae*



b

### Family *Avsunviroidae*



# Družina: Pospiviroidae

- Rod *Pospiviroid*;  
predstavnik: *Potato spindle tuber viroid*
- Rod *Hustoviroid*;  
predstavnik: *Hop stunt viroid*
- Rod *Cocadviroid*;  
predstavnik: *Coconut cadang-cadang viroid*
- Rod *Apscaviroid*;  
predstavnik: *Apple scar skin viroid*
- Rod *Coleviroid*;  
predstavnik: *Coleus blumei viroid 1*



# Družina: **Avsunviroidae**

- Rod ***Pelamoviroid***; predstavnik: ***Peach latent mosaic viroid***



- Rod ***Avsunviroid***; predstavnik: ***Avocado sunblotch viroid***

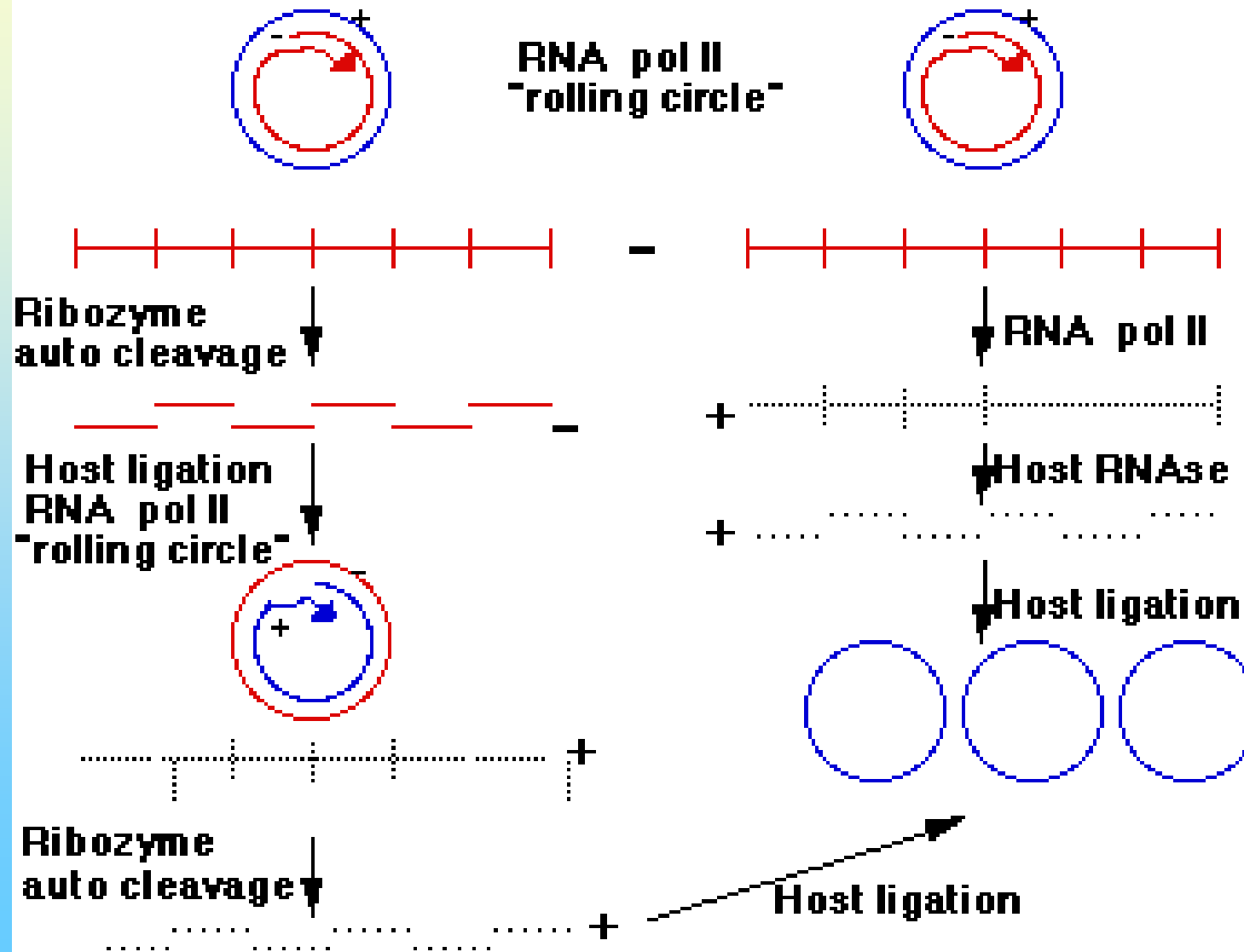


# podvojevanje na način kotalečega se kroga

Symmetric

Asymmetric

RNA pol II  
"rolling circle"





**V naravi oz. v gostitelju obstajajo kot populacije podobnih, a ne identičnih sekvenc.**

**So zelo prilagodljivi in se v razmerah modernega kmetijstva hitro razvijajo in širijo.**

**Nekateri viroidi sami povzročajo veliko gospodarsko škodo, medtem ko so drugi lahko škodljivi v kombinaciji z drugimi viroidi ali virusi.**

Aplikativni raziskovalno projekt “Razvoj metode PCR v realnem času za detekcijo viroidov sadnega drevja, vinske trte in hmelja”  
PLMVd, HLVd, HSVd in viroidi vinske trte

Strokovne naloge – Posebni nadzor za viroid vretenatosti  
krompirjevih gomoljev

ERA-NET EUPHRESCO: Detection and epidemiology of  
Pospiviroids

preverjanje prenosa PSTVd iz okuženih okrasnih gostiteljskih rastlin na neokužen paradižnik s čmrlji

preverjanje mehanskega prenosa iz okuženih okrasnih rastlin na neokužen paradižnik

uvajanje RT PCR za pospiviroide in RT-PCR v realnem času za specifično detekcijo (CEVd, CLVd, TASVd) in za detekcijo vseh pospiviroidov

določanje PSTVd v semenu paradižnika

# Avsunviroidae

## Peach latent mosaic viroid

### PLMVd

335 – 338 nukleotidov

#### Gostitelji:

- breskev in nektarina
- sliva
- marelica
- mandelj
- češnja
- jablana
- hruška

Okužb so večinoma latentne. Na občutljivih breskovih sortah povzroča številna znamenja. **Glavna značilnost je zakasnelo brstenje, cvetenje in zorenje za 4-6 dni.**

- mozaiki, packe ali zvijanje listov
- nekroze listnih robov







- rožnate črte na žilah cvetnih listov
- sploščeni ali deformirani plodovi
- spremenjena barva plodov
- krožne pigmentacije
- pokanje na šivih plodov
- sploščena koščica, ki pogosteje poka
- znižana lignifikacija
- nekroza brstov
- odmiranje
- zmanjšanje količine in kakovosti pridelka
- povečana občutljivost



**Pospoviroidae**  
**Hop stunt viroid**  
**HSVd**

294-368 nukleotidov

**Okužene rastline hmelja so manjše od zdravih za okrog 40%, teža trte in listov se zmanjša za okrog 30% in teža storžkov za okrog 50%. Vsebnost alfa kislin v storžkih se zniža, vsebnost beta kislin pa ostaja nespremenjena.**

**Hop stunt viroid razen hmelja okužuje še kumarice, citruse, vinsko trto, marelice, breskve, slive, hruške in mandelj.**

# Znamenja okužbe s HSVd na

marelici (levo zdrav list,  
desno okužen)



**slivi**



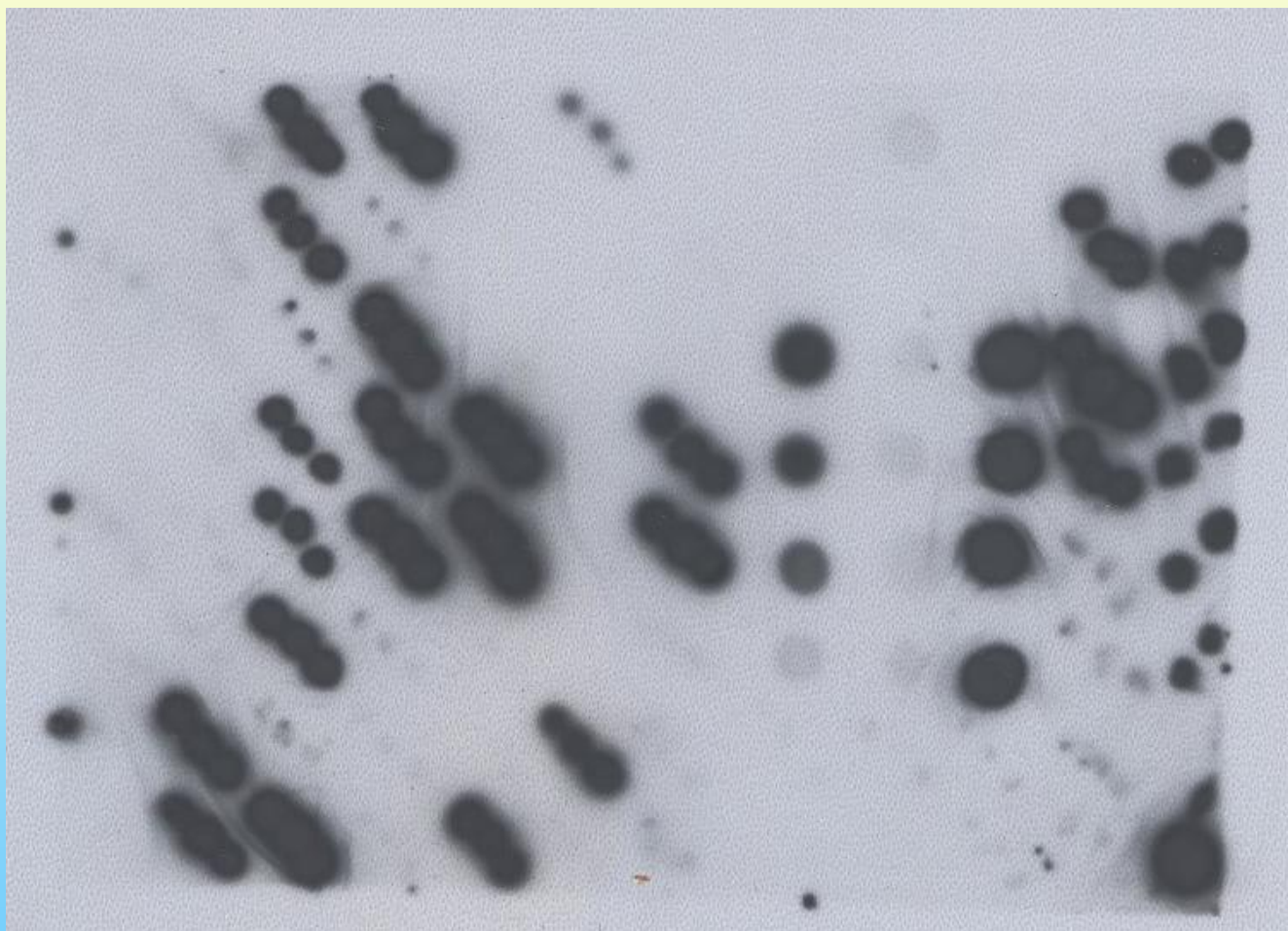
**breskvi**





# PLMVd

hibridizacija tkivnega odtisa



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8

Viršček Marn M, Mavrič Pleško I, Urek G, Myrta A, Žežlina I, 2006 **First report of Peach latent mosaic viroid and Hop stunt viroid in Prunus in Slovenia.**

Journal of Plant Pathology 88, 3 Supplement: S67

## Rezultati testiranja v Sloveniji PLMVd

Vrsta	Št. testiranih vzorcev	Št. pozitivnih vzorcev
sliva	197	3
breskev	76	48
marelica	39	0
češnja	3	0
okrasne vrste iz rodu <i>Prunus</i>	44	0
črni trn	34	0
rašeljika	14	0
čremsa	3	0

## Rezultati testiranj v Sloveniji HSVd

Vrsta	Št. testiranih vzorcev	Št. pozitivnih vzorcev
sliva	179	0
breskev	38	5
marelica	28	1
češnja		
okrasne vrste iz rodu <i>Prunus</i>	44	0
črni trn	34	0
rašeljika	14	0
čremsa	3	0

**Hmelj razen Hop stunt viroida okužuje še Hop latent viroid, ki ne povzroča na zunaj vidnih znakov okužbe, vendar imajo okužene rastline močno znižano vsebnost alfa kislin.**

# Yellow speckle disease

povzročata

**Grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd-1 367**

**nukleotidov)** in

**Grapevine yellow speckle viroid 2 (GYSVd-2, 363**

**nukleotidov**



**Mešana okužba z GYSVd in HSVd spremeni pH grozdnega soka in zmanjša vegetativno rast.**

**Mešana okužba GYSVd in Grapevine fanleaf virusa (GFLV) povzroča bolezen vein banding.**

***Potato spindle tuber viroid***  
**(PSTVd)**

***Viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev***

**Gostiteljske rastline**

**krompir**

**paradižnik**

*Solanum muricatum* = pepino (1990)

*Persea americana* = avokado (1995)

paprika (2001)

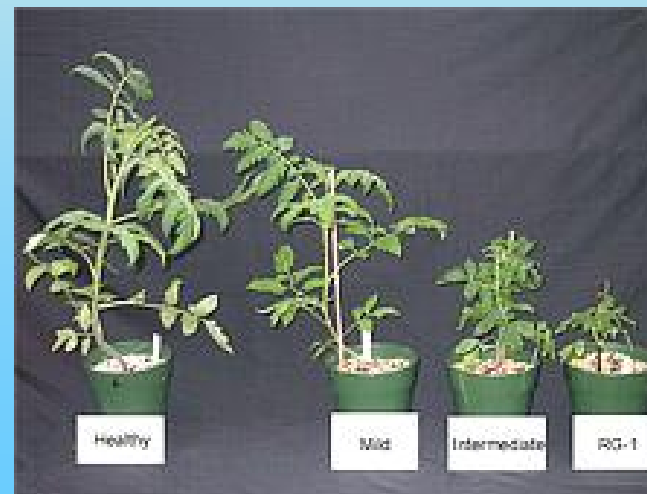


**Izgube pridelka krompirja zaradi okužbe s PSTVd lahko dosežejo do 65% in izgube pridelka paradižnika do 50%, vendar so lahko gostiteljske rastline okužene tudi brez vidnih znamenj okužbe.**

**Viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev je uvrščen na karantensko listo I.A.I**



**Vse sorte krompirja in paradižnika so občutljive za PSTVd, saj pri nobeni izmed teh dveh gostiteljskih rastlin niso našli virov odpornosti. Okužba s PSTVd lahko povzroči znatne izgube pridelka tako krompirja kot paradižnika, obseg pa je odvisen od različka viroida, kultivarja in rastnih pogojev.**



Pri krompirju znamenja pogosto niso vidna v letu, v katerem so se rastline okužile, v naslednjih letih pa se obseg znamenj stopnjuje. Okužene rastline so **zakrnele in pokončne**. Pogosto so **bolj razvejane, koti med stranskimi poganjki in stebлом so ostri**. Listi lahko spremenijo barvo in postanejo **svetlejši** ali **temnejši** od normalnih ter imajo **manjše in deformirane lističe**.



**Značilna znamenja  
okužbe s PSTVd na  
krompirju (levo in desno  
– zdrave rastline, v  
sredini – okužena  
rastlina sorte Kennebec)**  
(Fotografija: [R.P. Singh](#),  
Canada)



**Znamenja okužbe s  
PSTVd na paradižniku**  
(Fotografija: [Central  
Science Laboratory,  
Harpenden Archives](#),  
British Crown, United  
Kingdom)

Na gomoljih so znamenja bolj očitna, vendar se razvijejo šele po nekaj generacijah. Prizadeti gomolji so **majhni** in deformirani: **vretenasti, bolj podolgovati ali bolj okrogli** od neokuženih. Pogosto so tudi zašiljeni, lahko tudi grčasti. Na večjih gomoljih se lahko pojavijo razpoke. Očesa so pogosto bolj izražena in počasneje odganjajo.



**Zdrav (levo) in s PSTVd  
okužena gomolja (desno)  
krompirjeve sorte Nicola  
(Fografija: Plant Protection  
Service Netherlands)**



**Zdravi (prva vrsta od zgoraj) in  
okuženi (druga vrsta od zgoraj)  
gomolji krompirjeve sorte Saco  
ter zdravi (tretja vrsta od zgoraj)  
in okuženi (spodnja vrsta)  
gomolji krompirjeve sorte  
Kennebec**

**(Fotografija: USDA Agricultural  
Research Service, United States)**



Tudi pri paradižniku lahko preteče določen čas, preden se znamenja pojavijo. Pogosto so ta vidna šele pet tednov po okužbi. Rastline so zakrnele, njihov vrh je šopast, ker se medčlenki skrajšajo. Včasih se pojavijo tudi vretenasti poganjki. Listje porumeni ali pordeči, listi pa so deformirani in se zvijajo navzdol.



**Spodnji in srednji listi odmirajo. Odmiranje se prične na listnih žilah. Mlajši listi na vrhu rastlin ne propadejo, a ostanejo majhni. Cvetovi pogosto abortirajo. Zorenje plodov je neredno. Plodovi so majhni, trdi in pogosto temno zeleni.**

## **Širjenje preprečujemo z**

- **uporabo zdravega razmnoževalnega materiala**
- **takošnjim uničevanjem okuženih rastlin in rastlinskih ostankov**
- **razkuževanjem orodja, strojev, objektov in embalaže, npr. z 2-3% natrijev hipokloridom.**



Na daljše razdalje se PSTVd prenaša z **razmnoževalnim materialom** (gomolji, pravo seme, sadike). Pri krompirju lahko PSTVd prenašajo tudi uši (*Myzus persicae*), vendar samo ob hkratni navzočnosti virusa zvijanja krompirjevih listov (PLRV – *Potato leafroll virus*). Na manjših razdaljah se viroid prenaša z **dotiki, okuženim orodjem in stroji ter z medsebojnim kontaktom rastlin**. Prenos je možen tudi z **okuženim cvetnim prahom**.



Na Nizozemskem so leta 2006 potrdili okužbo z viroidi na več okrasnih rastlinah, ki so bile vse nove gostiteljske rastline za posamezne viroide:

- **CEVd** (*Citrus exocortis viroid*) v *Verbena* sp.
- **TASVd** (*Tomato apical stunt viroid*) v *Cestrum* sp.



- **PSTVd** in *Solanum jasminoides* in *Brugmansia* (*Datura*) *suaveolens* in *B. cordata*, *B. x candida* in *B. variegata*



*Solanum jasminoides*



*Solanum rantonnetii*



*Solanum pseudoapsicum*



***Petunia x hybrida***

***Physalis peruviana***

## ***Streptosolen jamesonii***



**Okužbe okrasnih rastlin so bile do sedaj vedno latentne.**

## **Odločba Komisije 2007/410/ES o ukrepih za preprečevanje vnosa PSTVd in njegovega širjenja v Skupnosti.**

Posebne zahteve iz Odločbe Komisije 2007/410/ES se nanašajo na rastline *Brugmansia spp.* in *Solanum jasminoides*

Z izdajo rastlinskega potnega lista je podana izjava, da so rastline *Brugmansia spp.* in *Solanum jasminoides* v celotni življenjski dobi ali od vnosa v Skupnost rasle na mestu pridelave:

- (a) v državi članici, kjer pojav PSTVd ni znan ali
- (b) na neokuženem območju, ki ga je potrdil pristojni uradni organ v državi članici ali
- (c) so bili pred premeščanjem testirani vsi loti in so bili rezultati negativni ali
- (d) so bile pred premeščanjem zadevnih rastlin testirane matične rastline teh rastlin in so bili rezultati negativni.

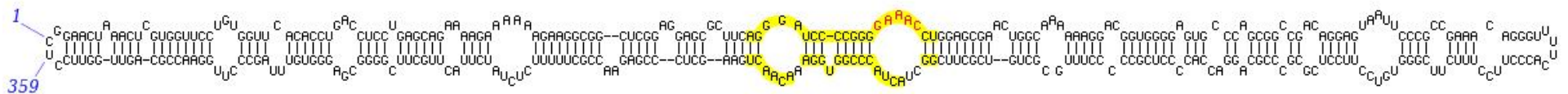
# Rezultati testiranj v Sloveniji

	Število analiziranih	vzorcev pozitivnih
<i>Brugmansia</i> sp. + <i>Datura</i> sp.	38	1
<i>Solanum jasminoides</i>	141	85
<i>Solanum rantonnetti</i>	31	4
petunija oz. surfinija	57	3
<i>Solanum pseudocapsicum</i>	2	0
<i>Solanum</i> sp.	2	0
<i>Solanum muricatum</i> = pepino	1	0
Paprika	11	0
Paradižnik	14	0
krompir	18	0
pasje zelišče = <i>S. nigrum</i>	2	0
<i>Jasminum polyanthum</i> *	2	0
<b>SKUPAJ</b>	<b>319</b>	<b>93</b>



# Detection and Epidemiology of Pospiviroids (DEP)

Detekcija in epidemiologija pospiviroidov



**8 partnerjev:**

**Danska** (Aarhus University, The Faculty of Agricultural Sciences)

**Velika Britanija** (Central Science Laboratory)

**Nizozemska** (Plant Protection Service)

**Avstrija** (AGES)

**Nemčija**

(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)

**Francija** (INRA Bordeaux

in Laboratoire National de la Protection des Végétaux)

**Slovenija** (KIS).

**V okviru projekta smo zbirali podatke o epidemiologiji in diagnostiki naslednjih viroidov:**

*Potato spindle tuber viroid (PSTVd),  
Citrus exocortis viroid (CEVd),  
Columnea latent viroid (CLVd),  
Chrysanthemum stunt viroid (CSVd),  
Tomato apical stunt viroid (TASVd) in  
Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd).*

**Le-ti lahko povzročajo hude škode na pomembnih kmetijskih rastlinah.**

## **5 delovnih sklopov:**

**delovni sklop 1 – vodenje in koordinacija projekta**  
(priprava programa, sestankov in poročil ter prenos rezultatov do uporabnikov)

**delovni sklop 2 - proučevanje gostiteljskih rastlin in interakcij med viroidi in gostiteljskimi rastlinami**

**delovni sklop 3 – proučevanje poti prenosa**

**delovni sklop 4 – metode identifikacije in diagnostični protokoli**

**delovni sklop 5 – testiranje semen.**

## **Prenos PSTVd s čmrlji (*Bombus terrestris*) iz *Petunia* sp. na paradižnik**

**poskus izveden v letu 2008 na Kmetijskem inštitutu Slovenije v okviru EUPHRESKO pilotnega projekta "Detection and Epidemiology of Pospiviroids" (financer slovenskega dela projekta je bil Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije)**



## Rastline v poskusu:

**10 x *Petunia* cv. Surfinia Burgundy,**  
inokulirana s PSTVd izolatom S1  
(okužba potrjena pred začetkom poskusa s  
pomočjo molekularnih metod)



**1 zdrava *Petunia* (Surfinia, neznana  
sorta),** potrjena kot negativna pred poskusom  
z RT PCR v realnem času

**9 zdravih rastlin paradižnika**

**različnih sort,** potrjenih kot negativne pred  
poskusom z RT PCR v realnem času

**Vse rastline so v času poskusa  
cvetele.**



**Čmrlji:** panj firme Natupol, Koppert: kolonija z matico, delavkami in zalego ter sladkorno raztopino.

Čmrlji so bili aktivni v teku celotnega poskusa in so nabirali cvetni prah tako na petunijah in na paradižniku

Poskus je bil izveden v mrežniku.



# Načrt poskusa



**okužena *Petunia***



**paradižnik**



**zdrava *Petunia***





na koncu poskusa so bile vse rastline paradižnika in (ob začetku poskusa) zdrava *Petunia* testirane s RT-PCR v realnem času in v nobeni nismo potrdili prisotnosti PSTVd



v poskusu nismo ugotovili prenosa PSTVd iz okuženih petunij na paradižnik oz. petunijo



# **Prenos izolatov PSTVd preko preko korenin paradižnika**

**poskus izveden v letu 2008 na Kmetijskem inštitutu Slovenije v  
okviru EUPHRESCO pilotnega projekta "Detection and Epidemiology  
of Pospiviroids" (financer slovenskega dela projekta je bil  
Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike  
Slovenije)**

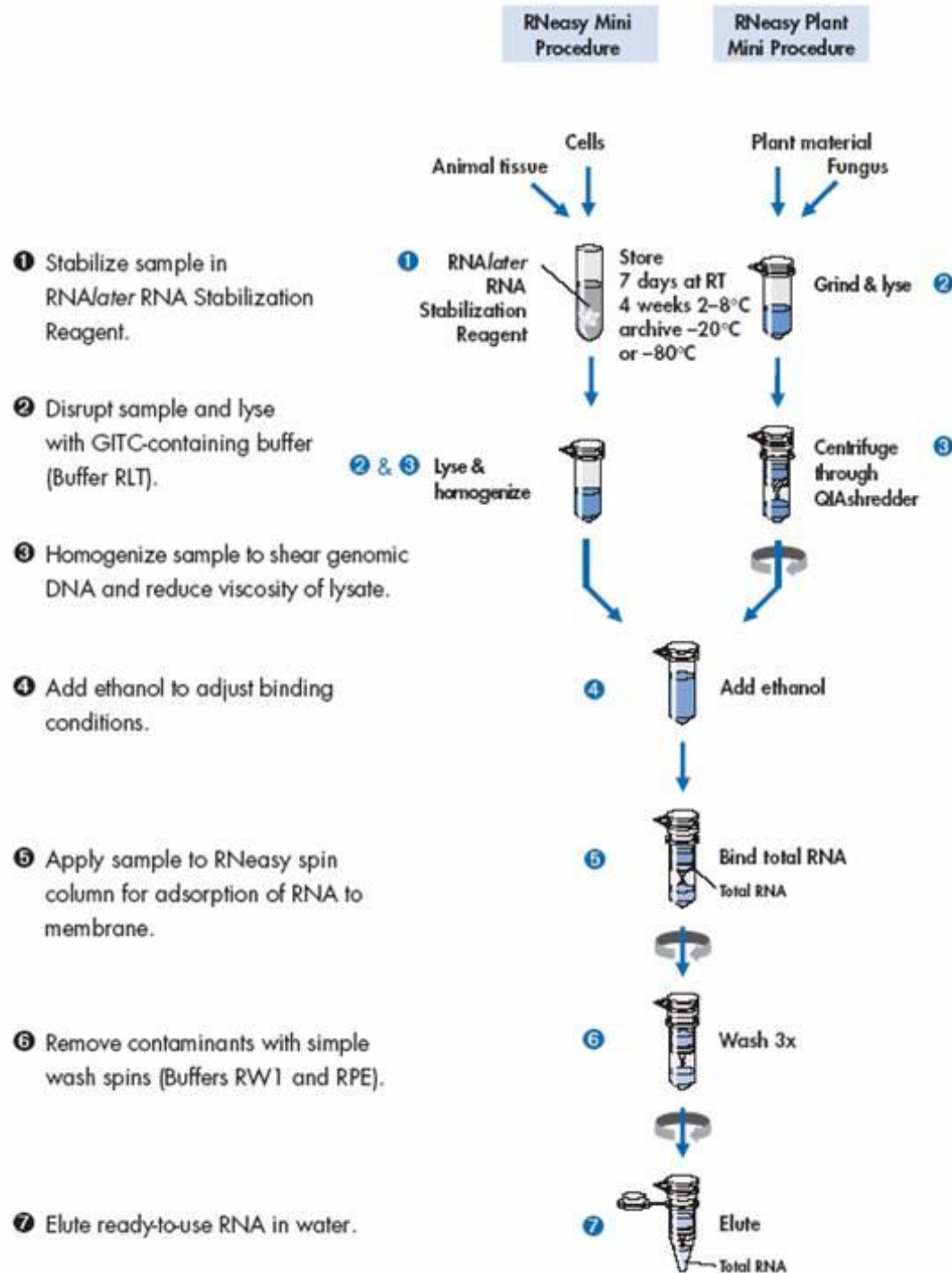


- po 4 rastline zalivane 5 dni s po 2 ml ekstrakta iz listov *B. suaveolens* okužene z izolatom B1
- po 4 rastline zalivane 10 dni s po 2 ml ekstrakta iz listov *B. suaveolens* okužene z izolatom B1
- po 4 rastline zalivane 5 dni s po 2 ml ekstrakta iz listov *S. jasminoides* okužene z izolatom S1
- po 4 rastline zalivane 10 dni s po 2 ml ekstrakta iz listov *S. jasminoides* okužene z izolatom S1

Pri odraslih rastlinah nismo potrdili okužbe s PSTVd.

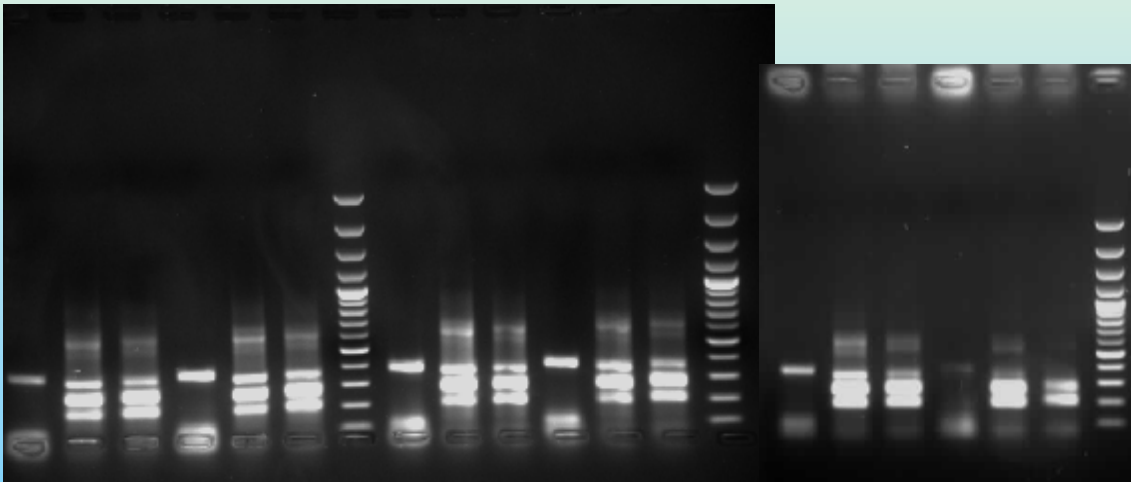
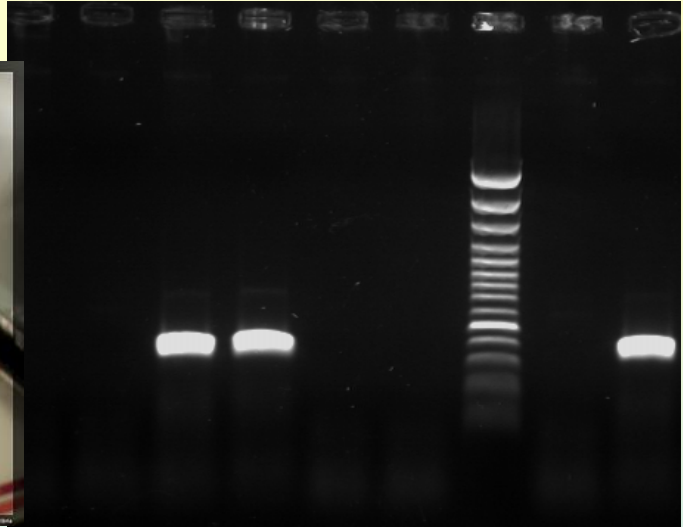
# Detekcija in identifikacija pospiviroidov

- RT PCT = **obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo**
- RT PCT = **obratna transkripcija in verižna reakcija s polimerazo v realnem času**
- R-PAGE = povratna poliakrilamidna gelska elektroforeza (R-PAGE)
- hibridizacija hibridizacija točkovnega odtisa

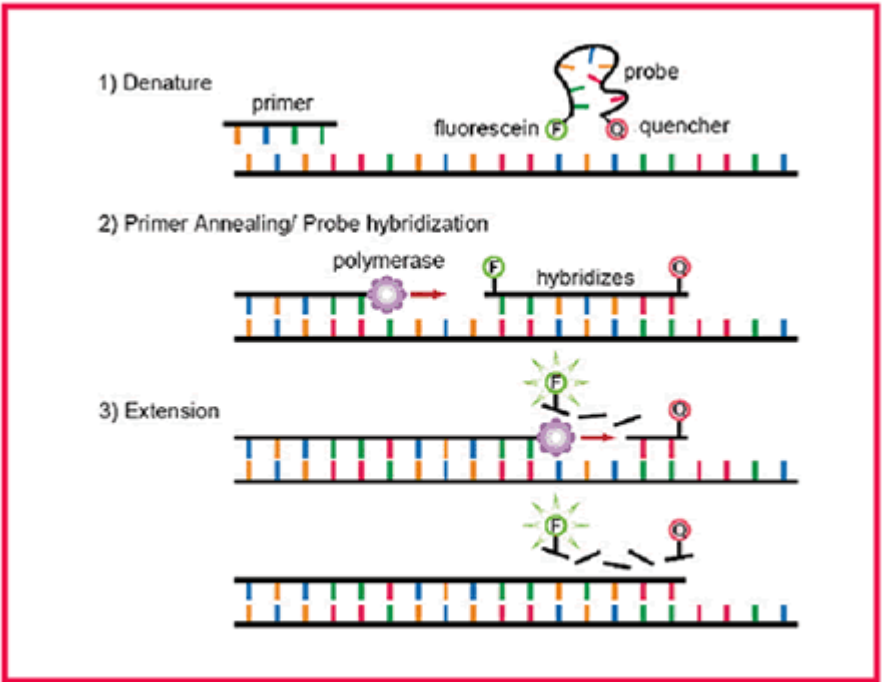


- izolacija skupne RNA iz vzorcev (z RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen))

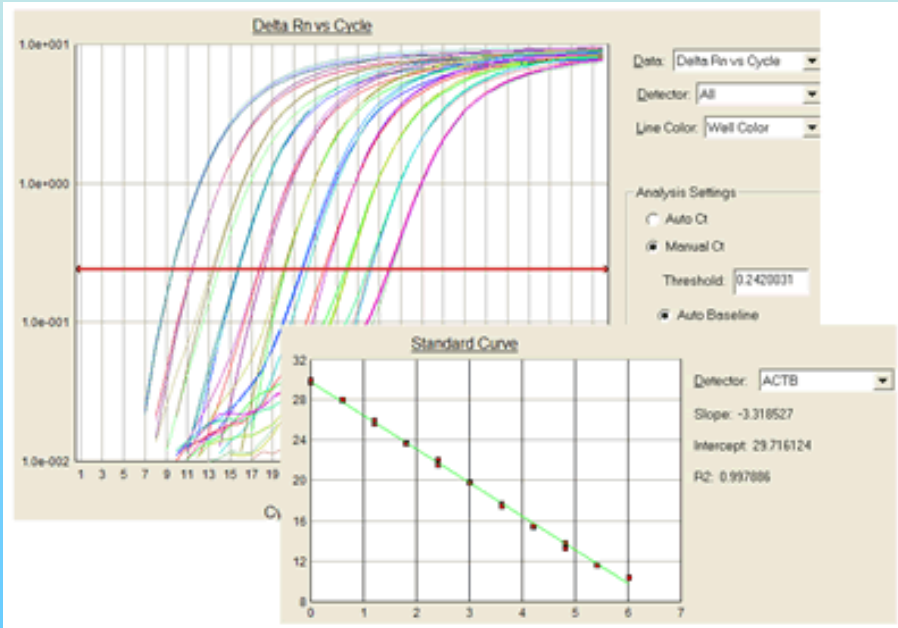




1 2 3 | 1 2 3 | M 1 2 3 | 1 2 3 | M | 1 2 3 | 1 2 3 | M  
57°C 58,4 °C 60,1 °C 60,9 °C 62,6 °C 64 °C



TaqMan® Probe Method



*Citrus exocortis viroid (CEVd),  
 Columnea latent viroid (CLVd),  
 Tomato apical stunt viroid  
 (TASVd)*

*vsi pospiviroidi*

- Hvala za potrpežljivost!

