

## INTERAKCIJE MED VIROIDI IN ŽUŽELKAMI

Maja DOBRAJC<sup>1</sup>, Stanislav TRDAN<sup>2</sup>, Jernej JAKŠE<sup>3</sup> in Sebastjan RADISEK<sup>4</sup>

Pregledni znanstveni članek / review article

Prispelo / received: 23. 10. 2020

Sprejeto / accepted: 6. 12. 2020

### Izvleček

Viroidi, najmanjši rastlinski patogeni, so enoverižne, kovalentno vezane in krožne molekule RNA, ki okužujejo številne gospodarsko pomembne kmetijske rastline. Za razmnoževanje in prenos uporabljajo celične mehanizme gostitelja. Glede na strukturo in mesto replikacije, viroide uvrščamo v dve družini: Avsunviroidae in Pospiviroidae. Avsunviroidi se replicirajo v kloroplastih in so razvejane oblike, medtem, ko se pospiviroidi replicirajo v jedru in imajo paličasto obliko. Viroidi in z njimi povezane bolezni so globalno razširjeni predvsem zaradi mednarodne trgovine. Poleg neposrednega prenašanja viroidov z vegetativnimi deli, semeni in pelodom, viroide posredno prenašajo tudi žuželke. Žuželke večinoma viroide prenašajo mehansko, z okuženim rastlinskim sokom, ki po hranjenju ali opraskanju ostane na različnih delih telesa. Posredno se v prenos viroidov z žužerkami vključujejo tudi virusi, v katere se viroidi enkapsidirajo. Po okužbi se na gostitelju razvijejo značilna bolezenska znamenja, kot so venenje, vihanje in rumenenje listov, kloroze in nekroze.

**Ključne besede:** interakcija, viroidi, žuželke

## VIROID-INSECT INTERACTIONS

### Abstract

Viroids, the smallest plant pathogenes, are single-stranded, covalently closed, circular, highly structured noncoding RNAs that cause disease in several economically important crop plants. They replicate autonomously and move systemically in host plants with the aid of the host cell machinery. Based on structure and location of replication, viroids are taxonomically divided into two

---

<sup>1</sup> Mag. biol. in ekol. z naravovar., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: maja.dobrajc@ihps.si

<sup>2</sup> Prof. dr., Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-naslov: stanislav.trdan@bf.uni-lj.si

<sup>3</sup> Prof. dr., Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

<sup>4</sup> Dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

families: Avsunviroidae and Pospiviroidae. Avsunviroidae replicate in the chloroplast, while Pospiviroidae reproduce in the nucleus. Rod-like structures are typical for the Pospiviroidae, whereas more branched structures are typical for Avsunviroidae. Viroids and viroid diseases are distributed globally. Viroids are transmitted with vegetative parts of plants, seeds, pollen and indirectly also with insects. Insects transmit viroids mostly mechanically, with infected plant sap that remains on different body parts during feeding or pollination. Indirectly viruses are also involved in viroids transmission with insects, in which viruses are encapsulated. The host symptoms of all these viroid diseases are similar, and include stunting, apical proliferation, apical leaf narrowing and yellowing, leaf crinkling, tissue brittleness and necrosis.

**Key words:** insects, transmission, viroids

## 1 UVOD

Viroidi so najmanjši znani povzročitelji bolezenskih stanj na rastlinah. So kovalentno vezane, krožne molekule RNA z dolžino 246–401 baznih parov, ki ne kodirajo peptidov ali proteinov (Flores in sod., 2005). Prvi identificiran in klasificiran viroid je bil viroid vretenatosti krompirjevih gomoljev (PSTVd, angl. potato spindle tuber viroid) (Diener, 2003). Bolezen, ki jo povzroča, so leta 1920 prvič opisali na sorti krompirja Irish Cobbler v Severni Ameriki (Martin, 1922); rastline so imele zavrto rast in podaljšane gomolje (Diener, 1971). Do leta 1967 so virusi veljali za najmanjše povzročitelje bolezni, leta 1967 pa sta Diener in Raymer dognala, da je viroid RNA molekula, brez proteinskega plašča in od 50 do 80-krat manjša od najmanjše virusne molekule. Leta 1971 je nato Diener definiral viroid kot majhno, fitopatogeno RNA molekulo z nizko molekularno maso. Večina danes znanih viroidov povzroča bolezenska stanja na gospodarsko pomembnih rastlinskih vrstah, kot so krompir (*Solanum tuberosum* L.), paradižnik (*Solanum lycopersicum* L.), hmelj (*Humulus lupulus* L.), kokosova palma (*Cocos nucifera* L.), vinska trta (*Vitis vinifera* L.), jabolana (*Malus domestica* Borkh.), avokado (*Persea americana* Mill.) in breskev (*Prunus persica* [L.] Batsch) (Kovalskaya in Hammond, 2014). Razširjeni so po vsem svetu, tveganje za širjenje pa povečujemo s transportom okuženih sadežev in semenskega materiala. Patogeneza viroidov je kompleksen fenomen, saj lahko različni viroidi na istem gostitelju izrazijo ali v latentnem stanju ali s številnimi bolezenskimi znamenji. Okužene rastline imajo zavrto rast, pojavlja se rumenenje in vihanje listov, deformacija in zaostala rast cvetov in sadežev in trohnenje koreninskega sistema (Kovalskaya in Hammond, 2014). Bolezenska znamenja so posledica interakcije med viroidom, gostiteljem in okoljem. Pri rastlini ima glavno vlogo za pojav bolezenskih znamenj njen obrambni sistem in sistem RNA utišanja genov (Flores in sod., 2015). Viroidi imajo največjo stopnjo mutacij med organizmi, kar jim omogoča širok spekter diverzitete in adaptacijo na odpornostne mehanizme gostiteljev (Ding in Itaya, 2007).

Viroide taksonomsko delimo glede na biokemijske in strukturne značilnosti molekule RNA (Hadidi in sod., 2003). Viroidno RNA gradijo posamezne domene: terminalna leva (TL), patogena (P), centralna (C), variabilna (V) in terminalna desna (TD). C domena je spodobna tvoriti dve ali več sekundarni strukturi, ki sodelujeta pri regulaciji replikacije. Prisotnost ali odsotnost C domene uvršča viroide v dve družini: Pospiviroidae in Avsunviroidae (Owens in Hammond, 2009). Družini se delita v različne rodove glede na značilnosti zgradbe RNA in filogenetske povezave med posameznimi vrstami viroidov. Viroidi iz družine Pospiviroidae so razporejeni v rodove glede na homologne sekvence v CCR domeni, terminalno ohranjene dele lasnične zanke in terminalno ohranjene regije ter vključujejo rodove *Pospiviroid*, *Hostuviroid*, *Cocaviroid*, *Apscaviroid* in *Coleviroid*. Pospiviroidi imajo širok spekter gostiteljev in okužujejo večino kritosemenk (Adkar-Purushothama in Perreault, 2019). Vrste, ki nimajo ohranjene CCR domene, pripadajo družini Avsunviroidae, in so razdeljene v tri rodove, *Avsunviroid*, *Pelamoviroid* in *Elaviroid*, glede na morfološke in strukturne značilnosti tako imenovane »hammerhead« strukture (Di Serio in sod., 2014). Avsunviroidi imajo ozek nabor gostiteljev in večinoma okužujejo vrste z njenimi bližnjimi filogenetskimi sorodniki (Singh in sod., 2003). Pospiviroidi so paličaste oblike, niso ribocimsko aktivni, njihova replikacija poteka v jedru gostitelja na način asimetričnega replikacijskega kroga, v katerega je vključen encim od DNA odvisna RNA polimeraza II. Za avsunviroide je značilna razvejana oblika, so brez posameznih domen, imajo ribocimsko aktivnost, replikacija poteka v kloroplastu na način simetričnega replikacijskega kroga z jedrno kodirajočo kloroplastno RNA polimerazo (Tsagris in sod., 2008).

## 2 PRENAŠANJE VIROIDOV - SPLOŠNO

Globalni prenos viroidov je tesno povezan z mednarodno trgovino, saj je transport vegetativnih delov rastlin glavni vzrok za njihovo širjenje na nova območja. Prenašanje viroidov pa poleg okuženih vegetativnih poganjkov poteka še mehansko, z okuženimi semeni in pelodom ter posredno z žuželkami (Verhoeven, 2010). Mehansko se viroidi prenašajo z okuženim orodjem, nerazkuženimi rokami delavcev, s kontaktom med neokuženo in okuženo rastlino (Matsushita in Tsuda, 2014). Barbosa in sod. so leta 2005 opravili poskuse v rastlinjakih in na poskusnih poljih, da bi dokazali mehanski prenos viroidov CEVd (angl. citrus exocortis viroid), CBLVd (angl. citrus bent leaf viroid), HSVd (angl. hop stunt viroid), CVd-III (angl. citrus viroid III) ali CVd-IV (angl. citrus viroid IV), ki povzročajo bolezni agrumov. V rastlinjaku je potekal preliminarni poskus, kjer so kot donorske rastline uporabili agrume, okužene z viroidi CEVd, CBLVd, HSVd, CVd-III ali CVd-IV. Receptorska rastlina je bila citróna (*Citrus medica* L., klon 861-SI) cepljena na hibrid limone (*Citrus x jambhiri* Lush.). Mehansko okuževanje je potekalo v pomladanskih mesecih, ko so s sterilnim skalpelom zarezovali rastline. Posamezno zarezo so naredili pod kotom 45° v steblo donatorske rastline, okužene s

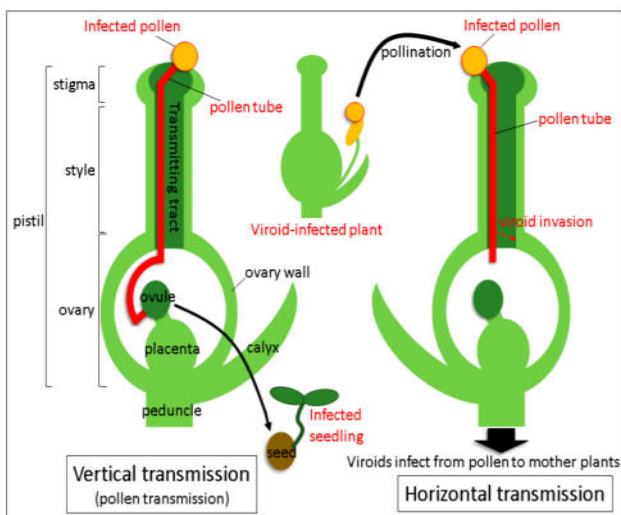
posameznim viroidom in takoj zatem zarezali še receptorsko zdravo rastlino. Steblo zdrave rastline so nato na območju reza ovili s parafilmom. Po treh mesecih so rastline porezali, da so spodbudili rast novih poganjkov, ki so jih testirali na prisotnost viroidov. Dokazali so, da se lahko rastlina mehansko okuži že z enim samim zarezom z okuženim rezilom. Prav tako so dokazali, da se mehansko lahko prenese tudi posamezen viroid, kljub temu, da je rastlina okužena z več viroidi hkrati. V poljskem poskusu so vzpostavili nasade različnih vrst agrumov (limone, klementine in pomarančevce), v katerih je bila polovica rastlin neokuženih, drugo polovico so okužili z izolati CEVd, CBLVd, HSVd in CVd-III. Neokužena drevesa so posadili nasproti okuženim drevesom. Drevesa so nato redno obrezovali, med rezjo neokuženih in okuženih dreves pa niso razkuževali orodja. Po 14 letih so z vseh rastlin cepili cepiče na klon 861-SI citrone in po šestih mesecih s hibridizacijsko tehniko preverili okuženost rastlin. Iz preglednice 1 je razvidno, da se viroidi mehansko prenašajo tudi na kmetijskih zemljiščih, kjer poleg starejših okuženih rastlin sadijo mlajše, brezviroidne rastline (Barbosa in sod., 2005).

**Preglednica 1: Poljski poskus prenosa različnih viroidov (Barbosa in sod., 2005)**

| Citrus     | Število okuženih rastlin/število rastlin v poskusu |       |      |         | Uspešnost prenosa viroidov |
|------------|----------------------------------------------------|-------|------|---------|----------------------------|
|            | CEVd                                               | CBLVd | HSVd | CVd-III |                            |
| Klementina | 1/25                                               | 0/25  | 0/25 | 0/25    | 4 %                        |
| Pomaranča  | 0/30                                               | 1/30  | 0/30 | 2/30    | 10 %                       |
| Limona     | 5/28                                               | 0/28  | 1/28 | 0/28    | 21 %                       |

Prenos z okuženimi semeni in pelodom je potrjen pri številnih pospiviroidih (PSTVd, TCDVd, TASVd, TPMVd, PCFVd, CLVd, CSVd (angl. chrysanthemum stunt viroid), CEVd) (Matsushita in sod., 2018a). Pojav bolezenskih znamenj je odvisen od gostiteljske rastline in vrste viroida (Matsushita in Tsuda, 2014). Prenos peloda in semen je lahko vertikalni ali horizontalni (slika 1). Vertikalni prenos ima pomembno vlogo pri širjenju in preživetju viroidov, saj prenos viroidov poteka z okuženimi semeni. Vertikalni prenos je odvisen od vrste viroida in vrste gostitelja; PSTVd ima 0,3 % uspešnost prenosa s semeni pri papriki sorte *Capsicum annuum* var. *grossum* [L.] Sendt., 0,5 % pri sorti *Capsicum annuum* var. *angulosum* Mill. in 1,2 % uspešnost prenosa pri kronski marjetici (*Glebionis coronaria* [L.] Cass. ex Spach). Pri paradižniku je vertikalni prenos viroida PSTVd 90,2 %. Pri okrasni rastlini navadna pisana kopriva (*Coleus blumei* Benth.) je vertikalni prenos 100 %. Pri vertikalnem prenosu okužen pelod iz brazde pestiča potuje do plodnice, jo oplodi in razvije se okuženo seme, iz katerega zraste nova okužena rastlina. Horizontalno se z okuženim pelodom prenašajo viroidi PSTVd, TPMVd in CSVd. Pri petuniji (*Petunia* sp.) so dokazali 80 % prenos viroida TPMVd z okuženim pelodom. Do okužbe na petuniji pride, ko okužen pelod pride v stik s stigmo in se

po vratu pestiča prenese do plodnice. Po kanalu pestiča se transportira na spodnji del vrata in s tem sistemsko okuži celotno rastlino (Matsushita in sod., 2018a). Pri horizontalnem prenosu pelod iz okužene rastline opraši zdravo rastlino in se po vratu pestiča transportira v rastlino. S tem okuži zdravo materno rastlino (Matsushita in Yanagisawa, 2018).

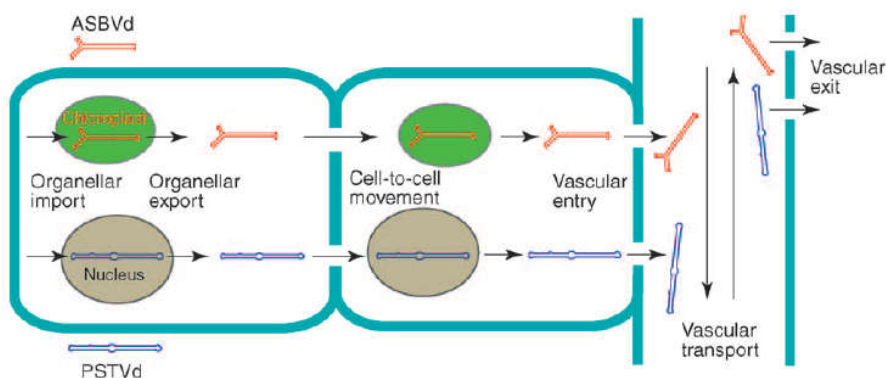


**Slika 1:** Prikaz poti vertikalnega in horizontalnega prenosa viroida TPMVd pri petuniji (Matsushita in sod., 2018b)

Povečana potreba po proizvodnji hrane je hortikulturno dejavnost vodila v vzpostavitev hidroponske vzgoje rastlin in namakalnih sistemov, ki pa potencialno predstavljajo vir patogenov. Običajno je v namakalnih sistemih koncentracija viroidov tako nizka, da je ni mogoče zaznati s standardnimi protokolarnimi diagnostičnimi metodami (Mehle in sod., 2017). Monitoring rastlinskih patogenov v vodi ni pogost, vendar je pomembno poznavanje stabilnosti patogenov v namakalnih sistemih, hidroponiki in drugih oblikah voda, ki se uporabljajo kot vir za rast in razvoj agronomsko pomembnih kultur ter s tem predstavljajo posredni vir okužbe (Gosalves in sod., 2003). Patogeni, prisotni v vodi, lahko vstopijo v rastlino skozi njen koreninski sistem ter povzročijo obolenje rastline (Boben in sod., 2007). Za viroid HSVd in ASSVd (angl. apple scar skin viroid) so proučevali možnost prenosa skozi koreninski sistem, ki je bil neuspešen (Hadidi in sod., 2003). Prenos viroidov lahko poteka direktno od okužene rastline s koreninskim prepletom z neokuženo rastlino skozi koreninske laske, korenine in po prevodnem sistemu v vegetativne dele rastline ali posredno skozi koreninski sistem iz okuženih tal (Vachev in sod., 2010). CSVd je viroid krizantem, ki se prenaša z okuženimi stroji, opremo in rastlinskim sokom, lahko pa se prenaša tudi skozi koreninski sistem

(Dijkstra in de Jager, 1998). Transport patogenov lahko iz okuženega okolja do gostitelja poteka abiotsko ali biotsko. Kjer patogen skozi korenine okuži matično podlago in vodo ter se tako transportira do neokuženih rastlin, poteka abiotski prenos. Biotski prenos patogenov je do sedaj znan pri številnih virusih, kjer so vmesni vektorji nematode ali glive (Dijkstra in de Jager, 1998). V zvezi z ohranjanjem viroidov v tleh pa je pomembna tudi nedavna objava Wei s sod. (2019), kjer poročajo o možnosti ohranjanja viroidov v nekaterih glivah, kar so dokazali z umetnim okuževanjem s pomočjo cDNA klonov. Med glivami omenjajo *Fusarium graminearum* Schwabe, ki je zelo razširjena na žitih in lahko preživi v tleh. To nakazuje na potencialno možnost ohranjanja viroidov v tleh tudi s talnimi glivami.

Prenos viroidov v gostiteljsko celico poteka z njihovim vstopom v razmnoževalni organel (slika 2). Po replikaciji viroidne RNA se le-ta transportira iz ene v drugo celico skozi plazmodezme. Sistemske se viroidi transportirajo po vaskularnem sistemu do končnih organov. Za razmnoževanje, transport in produkcijo intermedianih komponent izkoriščajo proteine gostitelja (Ding in Itaya, 2007).

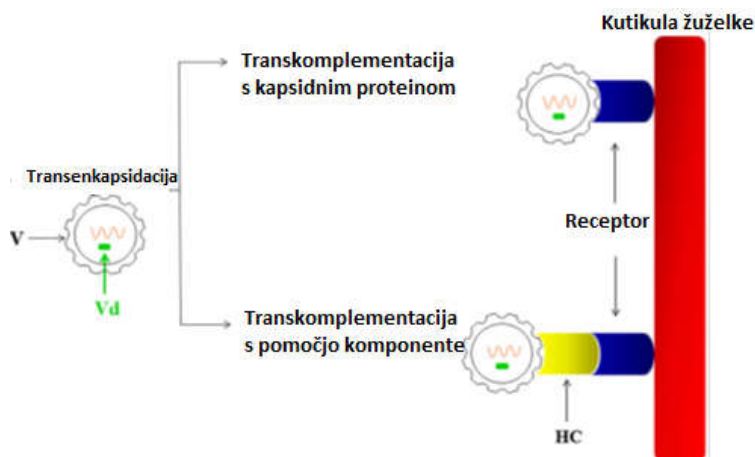


**Slika 2:** Prenos viroidov med celicami (Ding in Itaya, 2007)

### 3 PRENAŠANJE VIROIDOV Z ŽUŽELKAMI

Posredni prenos viroidov lahko nastane zaradi aktivnosti različnih vrst žuželk, poleg tega pa se v prenos viroidov z žuželkami vključujejo tudi virusi. Večinoma se viroidi prenašajo mehansko, s kontaminiranimi telesnimi deli žuželk (Van Bogaert in sod., 2014). Prvi laboratorijski poskus prenosa viroida CSVd in CPFVD (angl. cucumber pale fruits viroid) z listnimi ušmi je bil neuspešen, saj rastline niso razvile značilnih bolezenskih znamenj (Hollings in Stone, 1973). Prav tako so prvi laboratorijski poskusi z ogorčicami nakazovali, da le-te niso prenašalci viroidov, okužene rastline so bile brez bolezenskih znamenj (van Dorst in Peters, 1974). De Bokx in Piron sta 1981 preučevala prenos viroida PSTVd na paradižniku s tremi

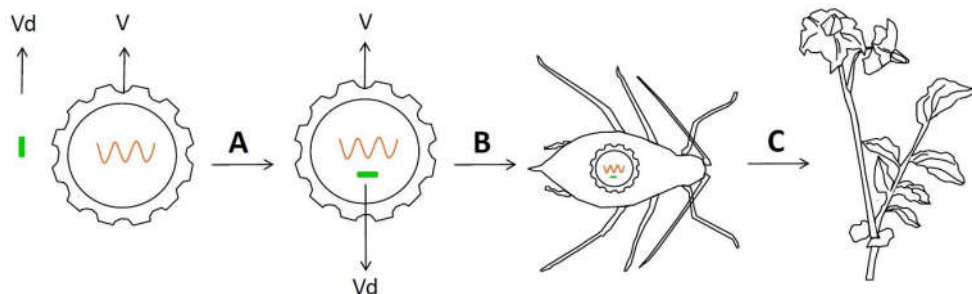
vrstami uši: *Aulacorthum solani* Kaltenbach, *Macrosiphum euphorbiae* Thomas in *Myzus persicae* Sulzer. Po štiritedenski inokulaciji viroida v receptorske zdrave rastline sta ugotovila, da vrsti *A. solani* in *M. persicae* nista prenesli viroida PSTVd iz okuženih rastlin paradižnika na zdrave neokužene rastline. Potrdila pa sta neperzistenten prenos PSTVd s krompirjevo ušjo (*M. euphorbiae*). Galindo in sod. (1986) so dokazali učinkovit prenos viroida TPMVd (angl. tomato planta macho viroid) s sivo breskovo ušjo. V študiji prenosa viroida TASVd (angl. tomato apical stunt viroid) z *Aphis craccivora* Koch niso bili učinkoviti (Walter 1987). V kasnejših poskusih, ki so jih leta 1995 izvedli Salazar in sod., je bilo ugotovljeno, da se je viroid PSTVd s 100 % uspešnostjo prenesel iz okužene rastline krompirja na neokužen krompir, vendar le ob prisotnosti virusa PLRV (angl. potato leaf roll virus). Virus PLRV sodeluje pri prenosu viroida iz okužene rastline v žuželko. To so potrdili s poskusom, kjer so okuževali zdrave rastline z virusom PLRV, z viroidom PSTVd in s kombinacijo obeh. V primerih, kjer so rastlino okužili s kombinacijo virusa PLRV in viroida PSTVd, je bil prenos z ušjo *M. persicae* najbolj učinkovit (14 %). Iz rastline, okužene le z viroidom PSTVd, siva breskova uš ni prenesla okužbe na novo zdravo rastlino. S tem so dokazali sodelovanje virusa in viroida pri prenosu iz okužene rastline na neokuženo rastlino, saj so na novo okužene rastline razvile vsa bolezenska znamenja, ki jih povzroča viroid PSTVd (Syller in sod., 1997). Proces, pri katerem virus sodeluje pri prenosu viroida imenujemo transenkapsidacija, fenomen, pri katerem se viroid vstavi v kapsido virusa. Plaščni proteini virusa omogočijo vezavo transkomplementacijske strukture na kutikulo vektorja, ki lahko viroid skupaj z virusom prenese v novo gostiteljsko rastlino (slika 3) (Froissart in sod., 2002; Querci in sod., 1997; Syller in Marczewski, 2001).



**Slika 3:** Prikaz transenkapsidacije in transkomplementacije viroida v virus (Froissart in sod., 2002)

Pred dokazano transenkapsidacijo viroidov v viruse je bilo takšno »genomsko maskiranje« dobro opisano predvsem pri skupini luteovirusov ter potyvirusov (Falk in sod., 1995; Latham in Wilson, 2008). Transenkapsidacija omogoča nastanek transkomplementacije, ki je opisana kot mehanizem, v katerem določen virusni protein omogoča okužbo drugega virusa. Ta pojav je pogosto razložen na primeru virusov rodu *Umbravirus*, ki se sami ne morejo prenašati z ušmi, v primeru prisotnosti ustreznega luteovirusa, ki tvori pomožne proteine, pa je prenos z listnimi ušmi možen (Taliensky in sod., 1996; Robinson in sod., 1999).

Querci in sod. so leta 1997 dokazali povezavo med virusom PLRV in viroidom PSTVd, ki se enkapsidira v ovojnico virusa zvijanja listov krompirja (PLRV) in se nato prenese z ušmi. Enkapsidacijo so potrdili s tretiranjem RNA vzorcev iz okuženih rastlin z mikrokokno nukleazo, ki razgradi neenkapsidirano RNA. Sledila je RT-PCR analiza, ki je še vedno pokazala prisotnost PSTVd oziroma potrdila, da je enkapsidacija preprečila popolno razgradnjo PSTVd. Transenkapsidacija lahko ima pri prenosu viroidov z žuželkami, kot so listne uši, pomembno epidemiološko vlogo. Latentno prisoten viroid v poljščinah, vrtninah ali okrasnih rastlinah se lahko vnese v kapsido virusa, ki ga nato prenese žuželka (slika 4). Takšna pot prenosa omogoča prenos viroidov s pomočjo vektorjev na nove gostitelje, kar lahko vodi v pojav novih bolezenskih stanj.



**Slika 4:** Enkapsidacija viroida (Vd) v virus (V), prenos virusa z žuželko na novo gostiteljsko rastlino (Van Bogaert, 2016)

Walia in sod. (2015) opisujejo tudi prenos viroida ASSVd (angl. apple scar skin viroid) z rastlinjakovim ščitkarjem (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) iz okuženih kumar (*Cucumis sativus* L.) in fižola na neokužene kumare, fižol, paradižnik in grah (*Pisum sativum* L.). Pri tem so dokazali možnost prenosa gole RNA viroida na rastline ter vpliv *C. sativus* floemskega proteina 2 (CsPP2) na prenos in translokacijo viroida v rastlini.

Matsuura in sod. (2010) kot posredne prenašalce viroidov opisujejo tudi čmrlje, prenos poteka predvsem med okuženimi in neokuženimi rastlinami, ki jih gojijo v

rastlinjakih. V rastlinjakih, kjer so gojili paradižnik, so potrdili prisotnost viroida TASVd in TCDVd. Okužene rastline so izolirali in jih opráševali s čmrlji ter nadaljevali z gojenjem rastlin. V posebnih rastlinjakih so gojili neokužene, brezviroidne rastline. Neokužene rastline in okužene rastline je opráševal isti roj čmrljev. Do sekundarnega prenosa viroida TASVd med čmrljem in paradižnikom pride mehanično preko rilčka s posrkanim rastlinskim sokom ali z izpostavitvijo okuženega peloda na stigmo neokužene rastline. Med opráševanjem čmrlji vibrirajo s krili, grizljajo prašnico z mandibulami in frekvenčno vibrirajo s telesom, zato je koncentracija viroida TCDVd visoka tudi na čmrljevi glavi in okončinah. Prav tako se viroid TASVd prenese z rastlinskim sokom, ki ostane na mandibulah. Po enem mesecu so rastline kazale simptomatične znake viroidne okužbe in z molekularnimi metodami so potrdili viroid TCDVd. Neokužen paradižnik je po opráševanju z okuženim pelodom, ki so ga zanesli čmrlji, razvil značilna bolezenska znamenja okužbe: ovenelost, listne kloroze, vihanje listnih konic. Zaradi čmrljevih migracij je možnost prenosa viroida tudi na daljše razdalje (Matsuura in sod., 2010).

Nielsen in sod. (2012) so zaradi zaskrbljujočih okužb okrasnih rastlin z viroidom PSTVd in možnostjo prenosa na gospodarsko pomembni rastlinski vrsti, paradižnik in krompir, raziskovali različne možne poti prenosa. Viroid PSTVd se mehansko prenaša z okuženim rastlinskim sokom, semeni, pelodom in z okuženimi vegetativnimi deli rastline. Zaradi poročanja o prenosu z enkapsidacijo PSTVd viroida z virusom PLRV s sivo breskovo ušjo pri krompirju in paradižniku (Querci in sod., 1997) ter neraziskanosti prenosa viroida PSTVd z resarji in medonosnimi čebelami (*Apis mellifera* L.), so Nielsen in sod. leta 2012 raziskovali možnost prenosa viroida PSTVd s tobakovim resarjem (*Thrips tabaci* Lindeman), cvetličnim resarjem (*Frankliniella occidentalis* Pergande), medonosno čebelo in čmrlji. Osredotočili so se na možnost prenosa viroida PSTVd z listnim sokom in pelodom, s katerim se hranita in ga prenašata polifagna tobakov resar in cvetlični resar ter prenos med opráševanjem z medonosno čebelo in čmrljem med okuženimi in neokuženimi okrasnimi rastlinami in/ali paradižnikom. Poskus je potekal pod nadzorovanimi pogoji, kjer so sprva žuželke tobakovega resarja in cvetličnega resarja gojili na rastlinah navadnega fižola in pora. Medonosno čebelo in čmrlja so sprva hranili s sladkorno vodo. Po hranjenju so žuželke stradali, nato pa jih prenesli v petrijevke z okuženim ali neokuženim pelodom, nato pa še v petrijevke z okuženimi listi rastlin z viroidom PSTVd. Pri medonosni čebeli in čmrljih so proučevali tudi možnost prenosa okuženega peloda na zdrave rastline petunije. Pri proučevanju medvrstnega prenosa viroida PSTVd niso potrdili. Med praktičnim poskusom prenosa viroida PSTVd z žužerkami, so Nielsen in sod. (2012) izvajali tudi diagnostično metodo RT-PCR, s katero so preverjali prisotnost viroida v žužerkah. Pri vrstah tobakov resar in cvetlični resar so zaznali nizko koncentracijo viroida PSTVd, kar pripisujejo možnosti ostankov rastlinskega soka na obustnih okončinah žužek.

**Preglednica 2:** Vrste žuželk, pri katerih so potrdili prenos ali transenkapsidacijo viroidov (Van Bogaert in sod., 2014)

| Družina žuželk | Vrsta                 | Slovensko ime    | Prenos viroida | Transenkapsidacija viroida |
|----------------|-----------------------|------------------|----------------|----------------------------|
| Aphididae      | <i>Macrosiphum</i>    | Velika           | PSTVd          |                            |
|                | <i>euphorbiae</i>     | krompirjeva uš   |                |                            |
|                | <i>Myzus persicae</i> | Siva breskova uš | TPMVd          | PSTVd                      |
| Apidae         | <i>Bombus</i>         | Temni zemeljski  | TASVd,         |                            |
|                | <i>terrestris</i>     | čmrlj            | TCDVd          |                            |

#### 4 ZAKLJUČKI

V prispevku smo se osredotočili na pregled študij interakcij in mehanizmov prenosa viroidov z žuželkami. Dosedanje študije so pokazale možnosti prenosa različnih viroidov z ušmi, čmrlji in ščitkarji. Študij, v katerih proučujejo prenos viroidov z žuželkami je malo, predvsem zaradi kompleksnosti načrtovanih poskusov in nadaljnjih metod za dokazovanje pristnosti viroidov v žuželkah. Prav tako še ostaja neproučen proces transenkapsidacije, ki pa ima velik potencial pri širjenju patogenov na nova območja in nove gostiteljske rastline. V nadaljnje raziskave bi tako bilo potrebno vključiti širi spekter žuželk, ki predstavljajo grožnjo pri prenosu viroidov, večje število različnih viroidov in občutljivejše diagnostične metode za zaznavo viroidov, kot je npr. PCR v realnem času. Poleg žuželk so možni vektorji prenosa tudi nematode in glive, zato bi bilo v prihodnje smiselno raziskave usmeriti tudi v možnost prenosa viroidov s talnimi organizmi. Poznavanje različnih poti prenosa patogenov in mehanizmov replikacij pomembno pripomore k poznavanju procesov okužbe in možnost njene omejitve. Zaradi neraziskanosti možnosti prenosa viroidov z žuželkami, nematodami, glivami in nepoznavanja procesov transkomplementacije in transenkapsidacije, bi bili poskusi in raziskave prenosa viroidov z žuželkami pomemben prispevek znanosti in reševanju okužb z viroidi.

#### 5 VIRI

- Adkar-Purushothama C. R., Perreault J. P. Current overview on viroid–host interactions. *Wiley, Wires RNA*. 2019.
- Barbosa C. J., Pina J. A., Perez-Panades J., Bernad L., Serra P., Navarro L., Duran-Villa N. Mechanical transmission of Citrus Viroids. *Plant Disease*. 2005.
- Boben J., Kramberger P., Petrovič N., Cankar K. Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. *European Journal of Plant Pathology*. 2007; 118(1): 59–71.

- De Bokx J. A., Piron P. G. M. Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1981; 87: 31–34.
- Diener T. O. *Potato spindle tuber virus* 4. Replicating, low molecular weight RNA. *Virology*. 1971; 45(2): 411.
- Diener T. O. Discovering viroids – a personal perspective. *Nature Reviews Microbiology*. 2003; 1(1):75–80.
- Diener T. O., Raymer W. B. Potato spindle tuber virus: a plant virus properties of a free nucleic acid. *Science*. 1967; 158(3799): 378–381.
- Dijkstra J., de Jager C. P. Virus Transmission Through Soil. *Practical Plant Virology*. 1998; 125–127.
- Ding B., Itaya A. Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *The American Phytopathological Society*. 2007; 20(1): 7–20.
- Di Serio F., Flores R., Verhoeven J. T. J., Li S.-F., Pallás V., Randles J. W. Owens R. A. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*. 2014; 159(12): 3467–3478.
- Falk B. W., Passmore B. K., Watson M. T., Chin L. S. The specificity and significance of heterologous encapsidation of virus and virus-like RNA's. In *Biotechnology and Plant Protection: Viral Pathogenesis and Disease Resistance. Proceedings of the Fifth International Symposium*. 1995; 391–415.
- Flores R., Hernandez C., de Alba A. E. M., Daros J. A., Di Serio F. Viroids and viroid–host interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 2005; 43: 117–139.
- Flores R., Minoia S., Carbonell A., Gisel A., Delgado S., López-Carrasco A., Di Serio F. Viroids, the simplest RNA replicons: how they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Res*. 2015; 209: 136–145.
- Froissart R., Michalakakis Y., Blanc S. Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Pythopathology*. 2002; 92(6): 576–579.
- Galindo A. F., Lopez R. M. C., Aguilar T. *Interacciones entre el viroide planta macho del jitomate, sus hospedantes y su transmisor el áfido Myzus persicae, Resúmenes*, In: *Viroids* (eds. Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S.), Iedn, Csiro Publishing, Collingwood, U.K. 2003; 30–48.
- Gosalves B., Navarro J. A., Lorca A., Botella F., Sanchez Pina M. A., Pallas V. Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*. 2003; 113: 87–93.
- Hadidi A., Flores R., Randles J. W., Semancik J. S. *Viroids*. CSIRO, Collingwood, Victoria, Australia. 2003; 370.
- Hollings M., Stone O. M. Some properties of chrysanthemum stunt, a virus with the characteristics of an uncoated ribonucleic acid. *Annals of Applied Biology*. 1973; 74: 333–348.
- Kovalskaya N., Hammond R. W. Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Science*. 2014; 228: 48–60.
- Latham J. R. Wilson A. K. Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes? *Molecular Plant Pathology*. 2008; 9(1): 85–103.
- Martin W. H. »Spindle tuber,« a new potato trouble. Hints to Potato Growers. *New Jersey State Potato Association*. 1922; 3: 8.
- Matsushita Y., Tsuda S. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in reproductive organs of petunia during its developmental stages. *Phytopathology*. 2014; 104(9): 964–969.

- Matsushita Y., Yanagisawa H. Distribution of *Tomato planta macho viroid* in germinating pollen and transmitting tract. *Virus Genes*. 2018a; 54(1): 124–129.
- Matsushita Y., Yanagisawa H., Sano T. Vertical and Horizontal Transmission of Pospiviroids. *Viruses*. 2018b; 10(12): 706.
- Matsuura S., Matsushita Y., Kozuka R., Shimizu S., Tsuda S. Transmission of Tomato chlorotic dwarf viroid by bumblebees (*Bombus ignitus*) in tomato plants. *European Journal of Plant Pathology*. 2010; 126(1): 111–115.
- Mehle N., Kogovšek P., Rački N., Jakomin T., Gutiérrez Aguirre I., Kramberger P., Ravnikar M. Filling the gaps in diagnostics of *Pepino mosaic virus* and *Potato spindle tuber viroid* in water and tomato seeds and leaves. *Plant Pathology*. 2017; 66: 1191–1201.
- Nielsen S L., Enkegaard A., Nicolaisen M., Kryger P., Viršček Marn M., Mavrič Pleško I., Kahrer A., Gottsberger R. A. No transmission of *Potato spindle tuber viroid* shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *Eur. J. Plant Pathol.* 2012; 133: 505–509.
- Owens R. A., Hammond R. W. Viroid pathogenicity: One process, many faces. *Viruses*. 2009; 1(2): 298–316.
- Querci M., Owens R. A., Bartolini I., Lazarte V., Salazar L. F. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*. 1997; 78: 1207–1211.
- Robinson D. J., Ryabov E. V., Raj S. K., Roberts I. M., Taliansky M. E. Satellite RNA is essential for encapsidation of groundnut rosette umbravirus RNA by groundnut rosette assistant luteovirus coat protein. *Virology*. 1999; 254(1), 105–114.
- Salazar L. F., Querci M., Bartolini I., Lazarte V. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatología*. 1995; 30: 56–58.
- Singh R.P., Ready K.F.M., Nie X. Chapter 3: Biology. In: *Viroids* (eds. Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S.), 1edn, Csiro Publishing, Collingwood, U.K. 2003; 30–48.
- Syller J., Marczewski W. Potato leafroll virus-assisted aphid transmission of potato spindle tuber viroid to potato leafroll virus-resistant potato. *Phytopathology*. 2001; 149: 195–201.
- Syller J., Marczewski W., Pawłowicz J. Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. *European Journal of Plant Pathology*. 1997; 103(3): 285–289.
- Taliansky M. E., Robinson D. J., Murrant A. F. Complete Nucleotide Sequence and Organization of the RNA Genome of Groundnut Rosette Umbravirus. *Journal of general virology*. 1996.
- Tsagris E. M., Martínez de Alba A. E., Gozmanova M., Kalantidis K. Viroids. *Cellular Microbiology*. 2008; 10(11): 2168–2179.
- Vachev T., Ivanova D., Minkov I., Tsagris M., Gozmanova M. *Trafficking of the potato spindle tuber viroid between tomato and Orobanche ramosa*. V: Hadidi a., Flores R., Randles J. W., Palukaitis P. *Virology*. 2010; 399: 187–193.
- Van Bogaert N. *Viroid-insect-plant interactions in view of transmission routes*. PhD Thesis. Ghent University, Belgium. 2016; 1–171.
- Van Bogaert N., Smagghe G., De Jonghe K. Viroid-insects-plant interactions. *Elsevier Inc*. 2014; 15: 277–290.

- van Dorst H. J. M., Peters D. Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1974; 80: 85–96.
- Verhoeven J. T. J. *Identification and epidemiology of pospiviroids*. Thesis. Wageningen UR. 2010.
- Walia Y., Dhir S., Zaidi A. A., Hallan V. *Apple scar skin viroid* naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. *RNA Biol*. 2015; 12(10): 1131–1138.
- Walter B. *Tomato apical stunt*. V: Diener. The Viroids. Plenum Press. 1987.
- Wei S., Bian R., Bagus Andika I., Niu E., Liu Q., Kondo H., Yang L., Zhou H., Pang T., Lian Z., Liu X., Wu Y., Sun L. Symptomatic plant viroid infections in phytopathogenic fungi. *PNAS*. 2019; 116: 13042–13050.