

RASTLINSKI VIRUSI IN VIROIDI V VODI

Maja DOBRAJC¹, Jernej JAKŠE² in Sebastjan RADIŠEK³

Pregledni članek / review paper

Prispelo / received: 21. 10. 2021

Sprejeto / accepted: 22. 12. 2021

Izvleček

Neoporečnost vode za uporabo v kmetijstvu v zadnjih desetletjih ogrožajo negativni okoljski vplivi, med katere uvrščamo tudi kontaminiranost z rastlinskimi patogeni. Vse težji dostop in pomanjkanje vode sta vodila v spremembe načinov pridelave rastlin za namen prehrane. Uveljavljajo se namakalni sistemi, hidroponska vzgoja, vzgoja rastlin brez substratov ter številne druge, pri čemer se uporabljajo vodni viri kot so potoki, reke, jezera ali pa sistemi kroženja hranilne raztopine za namen pridelave rastlin. Takšni vodni viri so pogosto pot prenosa rastlinskih patogenov, kot so rastlinski virusi in viroidi, ki lahko povzročajo izpad pridelka. Rastlinski virusi in viroidi so v vodnih sistemih pogosto prisotni v nizkih koncentracijah, kar otežuje njihovo zaznavanje z običajnimi tehnikami. Tako so se tekom tehnološkega in znanstvenega napredka razvile občutljivejše in specifične diagnostične metode detekcije virusov in viroidov v vodi, ki omogočajo kontrolo in s tem tudi preprečevanje širjenja z vodnimi sistemi.

Ključne besede: detekcija, prenos z vodo, rastlinski virusi, viroidi

PLANT VIRUSES AND VIROIDS IN WATER

Abstract

In recent decades water quality is threatened by different environmental impacts, like contamination with plant pathogens. Because of harder water access and water scarcity, crop production in soilless cultures, using closed or open hydroponic systems, has been increasing worldwide. Those types of crop production can be sourced from surface water supplies such as ponds, lakes, rivers, and reservoirs and, as such, can harbour diseasecausing microorganisms, including several plant viruses and viroids, which causes many symptoms on plants and leads to production loss. Water contamination with plant pathogens is difficult to detect and

¹ 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

² prof. dr., Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, e-naslov: jernej.jakse@bf.uni-lj.si

³ dr., Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Oddelek za varstvo rastlin, Cesta Žalskega tabora 2, SI-3310 Žalec, e-naslov: sebastjan.radisek@ihps.si

confirm without efficient diagnostic methods, so with technological and scientific diagnostic methods would plant production be more controlled and efficient.

Key words: detection, plant viruses, transmission with water, viroids

1 UVOD

Kvaliteta vode je vse bolj podvržena vplivom globalnega segrevanja, suše in onesnaževanja. Proučevanje prisotnosti in prenosa virusov v vodi je aktivno prisotno že 50 let, vendar je bilo v preteklosti posvečeno predvsem patogenom, ki negativno vplivajo na zdravje ljudi. Zavedanje, da je pri prisotnosti in prenosu rastlinskih virusov posredno ogroženo tudi zdravje in kvaliteta življenja ljudi, je pri raziskovalcih in širši množici prisotno le krajši čas (Gosalves in sod., 2003). Rastlinski virusi in viroidi so prisotni v morju, jezerih, rekah, potokih, namakalnih in drenažnih vodah, izvirih in podtalnih vodah (Panayotou in sod., 1997). Prisotnost rastlinskih patogenov v vodah je pomemben dejavnik onesnaženja in povzročja njihovo razširjanje med kmetijskimi površinami, kar lahko privede do večjih ekonomskih izgub in pojava novih gostiteljev (Erdiller in sod., 1994). Kontrola nadzora nad patogeni v vodah bi tako morala obsegati predvsem vodne vire, namakalne sisteme, vode pri pridelavi rastlin brez tal in hranilne raztopine za hidroponsko vzgojo rastlin, kjer lahko voda predstavlja glavni vir kontaminacije (Sevik, 2011). Z vodotoki se lahko rastlinski virusi razširjajo na daljše razdalje in okužijo večje število pridelovalnih površin. Prisotnost virusov *Tobacco mosaic virus* (TMV) in *Cucumber mosaic virus* (CMV) so dokazali v vodnih vzorcih Donave in Save, ki so bile vir namakanja za okoliške pridelovalne površine (Tosic in Tosic, 1984). V vodnih vzorcih na območju Ankare so dokazali prisotnost virusov *Alfalfa mosaic virus* (AMV), *Tomato black ring virus* (TBRV), *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Erdiller, 1994). V Sloveniji so med letoma 2004 in 2006 vzorčili gramoznice iz rastlinjakov, v katerih so bile okužene rastline ter zaznali prisotnost virusa ToMV (*Tomato mosaic virus*) (Boben in sod., 2007). Koncentracija virusov v vodah je lahko zelo nizka, kljub temu pa je njihova infektivnost za okužbo rastlin visoka, zato jih je brez prehodnega koncentriranja težko zaznati (Mehle in Ravnikar, 2012), kar velja tudi za viroide (Ruščič in sod., 2013). Kontaminacija vode z virusi in viroidi je problematična, v kolikor le-ti okužijo rastline, na katerih se pojavijo bolezenska znamenja in zaradi katerih se zmanjša kvaliteta in količina pridelka. V celotnem procesu od kontaminacije vira do pojava bolezenskih znamenj je najpomembnejša sposobnost infektivnosti patogena, ki jo dokazujemo z mehansko okužbo gostiteljskih rastlin in tudi potencialnih novih gostiteljev. Biološki testi so bili v preteklosti ključni za detekcijo in determinacijo rastlinskih patogenov, danes pa se glede na vrsto patogenov uporabljajo številne serološke in molekularne metode (Legrand, 2015). Najpogosteje uporabljena serološka metoda v diagnostiki rastlinskih virusov je *ELISA* (angl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay) test (Clark in Adams, 1977).

Med občutljive in specifične molekularne metode za diagnostiko rastlinskih virusov in viroidov pa uvrščamo kot najpogosteje uporabljene metode na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR) za DNA viruse ter reverzno transkripcijo s PCR za RNA viruse in viroide (RT-PCR) (Candresse in sod., 1998).

2 ZNAČILNOSTI RASTLINSKIH VIRUSOV IN VIROIDOV

2.1 Rastlinski virusi

Rastlinski virusi sodijo v skupino najmanjših patogenov, ki povzročajo bolezenska stanja na rastlinah. Viruse sestavljajo nukleinske kisline v obliki DNA ali RNA, obdane s kapsido, redkeje tudi z lipidno ovojnico. Najpogosteje so nitaste, paličaste, izometrične ali bacilaste oblike, velikosti od 18–1000 nm (ICTV, 2012). Virusi imajo različne spektre gostiteljev, saj nekatere vrste okužujejo le posamezno rastlinsko vrsto, spet drugi imajo številne vrste gostiteljev. V gostitelja vstopijo skozi rane ali preko vektorjev. Prenos najpogosteje poteka z vegetativnim razmnoževanjem, cvetnim prahom, s semeni, mehansko in z vektorji. Na rastlinah povzročajo ekonomsko škodo v obliki zmanjšanja kvalitete in kvantitete pridelka, manjše kaljivosti semen, rasti sejancev in mladih rastlin, slabšega klitja. Bolezenska znamenja, rast in razvoj rastlin so odvisni od seva in vrste virusa, sorte, starosti in kondicijskega stanja samega gostitelja ter časa izpostavljenosti okužbi (Hull, 2009). Bolezenska znamenja se lahko pojavijo lokalno ali sistemsko in so izražena kot mozaični vzorci na listih, klorotične in nekrotične lezije, rumenenje, razbarvanost v obliki črt in prog, vihanje listov, zaostanek v rasti, spremenjena zgradba plodov, tumorji (Gergerich in Dolja, 2006). Za zatiranje bolezní, ki jih povzročajo rastlinski virusi, na tržišču ni pripravkov, zato njihovo zatiranje temelji na uporabi zdravega sadilnega materiala, zatiranju vektorjev, sajenju odpornih sort in uničevanju okuženih rastlin (Viršček Marn, 2016).

2.2 Viroidi

Viroidi so najmanjši znani povzročitelji bolezní na rastlinah. So krožne molekule RNA z izrazito sekundarno strukturo z dolžino 246–401 baznih parov, ki ne kodirajo peptidov ali proteinov (Flores in sod., 2005). Izvor viroidov je še vedno nepojasnen, zanimivo pa je, da so agresivni bolezenski izbruhi, za katere so kasneje kot povzročitelje potrdili viroide, opisani šele v 20. stoletju. Kljub temu obstajajo posredni dokazi, da so bile nekatere viroidne bolezní prisotne že pred tisočletji, in da viroidi predstavljajo celo žive fosile prvih RNA molekul (Bar Joseph, 2003; Di Serio in sod., 2017). Večina danes poznanih viroidov povzroča bolezní na ekonomsko pomembnih kmetijskih in okrasnih rastlinah, ki jim je skupno predvsem vegetativno razmnoževanje (Kovalskaya in Hammond, 2014). Patogeneza viroidov je kompleksen fenomen, saj se lahko različni viroidi na istem gostitelju izrazijo latentno ali s številnimi bolezenskimi znamenji. Okužene rastline

imajo pogosto zavrto rast, pojavlja se rumenenje in vihanje listov, deformacija in zaostala rast cvetov in sadežev ter trohnenje koreninskega sistema (Kovalskaya in Hammond, 2014). Bolezenska znamenja so posledica interakcije med viroidom, gostiteljem in okoljem (Ding in Itaya, 2007). Hitro širjenje viroidne okužbe preprečuje popolno uničenje nadzemnih in podzemnih delov okuženih rastlin, razkruževanje delovnih strojev in opreme, redno pregledovanje nasadov in nadzirano gojenje zdravega matičnega rastlinskega materiala (Hammond in Owens, 2006; Radišek in sod., 2017).

3 VIRUSI IN VIROIDI V VODAH

3.1 Izvor in prisotnost v okoljskih vodah

Za rastlinske patogene, kot so virusi in viroidi, je znano, da se v okoljske vode sproščajo iz poškodovanih ali razpadajočih korenin okuženih rastlin, posledično lahko tudi iz komposta (Yarwood, 1960; Mehle in sod., 2017). Za številne rastlinske viruse, ki okužujejo gojene rastline v hidroponskih sistemih, je znano njihovo sproščanje v hranilno raztopino iz živega koreninskega sistema (Koenig, 1986). Končni cilj kanalizacijskih in drenažnih vod so pogosto potoki, reke, jezera in morja, kamor se skupaj z odpadno vodo stekajo tudi številni rastlinski patogeni, s tem pa se širi pot prenosa (Koenig in sod., 1988). Med prvimi je viruse v okoljskih vodah proučeval Yarwood in leta 1960 dokazal prisotnost virusov Tobacco necrosis virus (TNV) in Tobacco mosaic virus (TMV) v drenažnih vodah. Virus sta se v drenažne vode izločala iz korenin okuženih rastlin trnate kleome (*Cleome spinosa*) in tobaka (*Nicotiana tabacum*) (Yarwood, 1960). V zadnjih dvajsetih letih pa se število raziskav na področju prenosa rastlinskih virusov z vodo povečuje, v kanalih, rekah, jezerih, vodotokih, ribnikih in oceanih so zasledili rastlinske viruse iz vsaj sedem različnih rodov, med drugimi rodove (Carmoviruses, Cucumoviruses, Diathoviruses, Tobamoviruses, Necroviruses, Potexviruses in Tombusviruses) (Mehle in Ravnikar, 2012). Kljub temu, da so virusi in viroidi v vodah prisotni v nizkih koncentracijah, so stabilni, kar jim omogoča uspešno okužbo rastlin. Mehle in sod. (2014) so dokazali kontaminacijo vode z virusom Potato virus Y (PVY) in viroidom Potato spindle tuber viroid (PSTVd), pri čemer imata patogena večji vpliv v hidroponskih sistemih, kjer kontaminirana hranilna raztopina kroži v sistemu in so s tem gojene rastline kontinuirano podvržene prisotnosti patogena, zato je možnost okužbe povečana.

3.2 Preživetje virusov in viroidov v vodi

Za večino rastlinskih virusov, ki so jih zaznali v okoljskih vodah kot so ToMV, TMV, Tomato bushy stunt virus (TBSV), Carnation mottle virus (CaRMV), velja visoka stabilnost. In vitro so virusi stabilni kar 50–3000 ur (Burt in sod., 1996). Za virus TNV je znano, da je stabilnejši v vlažnem kot v suhem okolju (Yarwood,

1960). Poleg stabilnosti virusov in viroidov je pomembna tudi njihova infektivnost. Pares in sod. (1992) so zaznali, da virusa ToMV in Pepper mild mottle virus (PMMoV) v hranilni raztopini ohranita infektivnost do šest mesecev. Za virus Pepino mosaic virus (PepMV) so Prezelj in sod. (2009) dokazali stabilnost do treh tednov pri temperaturi 20°C. Mehle in sod. (2014) so dokazali preživetje virusa PVYNTN kar deset tednov. Za viroide je značilna izrazita sekundarna struktura RNA krožne molekule, zato se zanje predvideva visoka stabilnost v vodnih okoljih (Ruščić in sod., 2013).

3.3 Prenos z vodo v kmetijstvu

Rastlinski virusi in viroidi, ki se sproščajo v okoljske vode, se lahko razširjajo na daljše razdalje (Castello in sod., 1995), k temu pa doprinesejo tudi nekatere kmetijske dejavnosti, kot so namakalni sistemi in hranilne raztopine (Park in sod., 1999). Prisotnost teh patogenov ima velik pomen, v kolikor kontaminiranost vode povzroči tudi okužbo samih rastlin. Semena fižola pred sejanjem namakajo v vodi, pri čemer sta Teakle in Morris (1981) ugotovila, da iz semen, namočenih v vodi, kontaminirani z virusom *Southern bean mosaic virus* (SBMV), zrastejo okužene rastline. Virusi pa lahko iz kontaminiranih vodnih matriksov v rastline vstopijo skozi njihov koreninski sistem. Prenos virusov iz vode v rastline je učinkovitejši, v kolikor imajo rastline poškodovane koreninske laske ali koreninski sistem zaradi same rasti (Koenig, 1986). Okužba poganjkov pa je odvisna od koncentracije patogenov v vodi in uspešnosti okužbe, kar so potrdili pri virusu ToMV (Pares in sod., 1992). Prenos z namakalno vodo je opisala Koenig (1988) na primeru virusa nekroze in rumenih žil pese (*Beet necrotic yellow vein virus*; BNYVV). Širjenje rastlinskih virusov v hidroponskih sistemih so dokazali Büttner in sod. (2008) kot so virus pegavosti in uvelosti paradižnika (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV), virus mozaika repnjaka (*Arabidopsis mosaic virus*; ArMV), virus kodravosti listov pelargonije (*Pelargonium leaf curl virus*; PLCV) in virus linijskega vzorca pelargonije (*Pelargonium line pattern virus*; PLPV). Zaradi kroženja hranilne raztopine v hidroponskem sistemu je s tem lahko ogrožena celotna pridelava.

4 DOLOČANJE VIRUSOV IN VIROIDOV V VODI

4.1 Metode koncentriranja in izolacije

Izolacija nukleinskih kislin je prva stopnja determinacije prisotnega patogena v vzorcu. Pri vodi je izolacija odvisna od tipa vodnega vzorca. Pri virusih, ki so prisotni v nizkih koncentracijah, kot so na primer enterični virusi, tipična izolacija poteka z uporabo adsorpcijsko-elucijskih metod z elektronegativnimi membranskimi filtri, ki jih pogosto spremlja tudi koncentriranje eluata s PEG precipitacijo ali s centrifugiranjem. Alternativna metoda je tudi čiščenje nukleinskih kislin direktno z metodo elektronegativnih membranskih filtrov,

uporabljenih v adsorpcijsko-elucijskih metodah. Koncentriranje s centrifugalnimi filtri se prav tako uporablja kot direktna metoda pri koncentriranju manjših volumnov (manj kot 20 ml) pri vodnih vzorcih, ki imajo visoke koncentracije patogenov. Za viruse, ki so prisotni v večjih volumnih (več kot 30 l), kot je testiranje podtalnice in pitne vode, so v uporabi postopki koncentriranja z Nanoceram filtri, filtri iz steklene volne, celulozno-estrski filtri in ultrafiltri z votlimi vlakni (Symonds in sod., 2018). Opisane metode koncentracije rastlinskih patogenov iz vodnih vzorcev so dolgotrajne, z visokimi finančnimi vložki, zato je v zadnjem času najpogosteje v uporabi učinkovitejša metoda monolitnih kromatografskim nosilcev (CIM). Metoda CIM temelji na vezavi virusa na monolitski kromatografski nosilec, ki se eluira s pufrom, le-ta pa vsebuje visoko koncentracijo soli (Branović in sod., 2003). S CIM metodo so uspešno koncentrirali virus ToMV (Boben in sod., 2007), PVY (Rupar in sod., 2013) in viroid PSTVd (Rušić in sod., 2013) iz različnih tipov vodnih vzorcev. Po koncentriranju rastlinskih patogenov je nato možna določitev le-teh z različnimi metodami. Za izolacijo RNA virusov in viroidov iz vodnih matriksov so v uporabi različni komercialni kompleti. Rutjes in sod. (2005) so primerjali dve izolacijski metodi pri izolaciji RNA iz velikih volumnov vodnih vzorcev. Ugotovili so, da je konvencionalna metoda, ki vsebuje korake ultrafiltracije, dvofazne separacije in gelsko kromatografijo, manj občutljiva in zanesljiva kot metoda izolacije s komercialnim kitom, pri kateri je izplen RNA večji, prav tako pa med postopkom odstrani možne inhibitorje. S komercialno metodo izolacije so uspeli detektirati le dva od petih pozitivnih vzorcev, pri čemer so z metodo s komercialnim kitom detektirali štiri od petih pozitivnih vzorcev.

4.2 Metode detekcije

Biološki testi temeljijo na sposobnosti indikatorskih rastlin, da se po umetni mehanski inokulaciji ali cepljenju z določenim patogenom, razvijejo značilna bolezenska znamenja. Uporabljajo se za namen detekcije rastlinskih patogenov, predvsem virusov in viroidov. V preteklosti so bili biološki testi ključnega pomena za detekcijo rastlinskih patogenov, zaradi nespecifičnosti pa jih izpodrivajo drugi laboratorijski testi in metode (Legrand, 2015). Kljub temu pa imajo dandanes biološki testi še vedno velik pomen pri detekciji novih sevov patogenov in odzivu indikatorskih rastlin, ki jih z modernimi metodami ni mogoče potrditi (EPPO, 2006). Uspešnost inokulacije in razvoja okužbe gostitelja je odvisna od stabilnosti in koncentracije patogena, občutljivosti gostiteljske rastline in okoljskih razmer (Legrand, 2015). Rastlinske viruse so v vodah po koncentriranju dokazovali z mehansko okužbo testnih rastlin (Pleše in sod., 1996), ki so pogosto pripomogle tudi namnoževanju virusa za poznejšo analizo z drugimi specifičnimi testi (Koenig in sod., 2004). Medtem, ko je bila pred časom najbolj razširjena metoda za detekcijo DNA virusov metoda ELISA, jo danes že izpodrivajo molekularne metode, ki omogočajo določevanje prisotnosti nukleinskih kislin, kar pa je

skupnega zgradbi virusov in viroidov. Med temi se za zaznavanje virusov v vodi uporabljajo predvsem metode na osnovi PCR tehnik. Tako so Gosalves in sod. (2003) za namen detekcije virusa Melon necrotic spot virus (MNSV) v rastlinah, namakalnih vodah in hidroponski hranilni raztopini razvili metodo reverzne transkripcije verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR), ki je virus zaznal pri nižjih koncentracijah kot serološka metoda ELISA. Podobno so Castello in sod. (1999) z RT-PCR in z določanjem nukleotidnega zaporedja produktov PCR dokazali prisotnost virusa ToMV v oblakih, megli in ledu. Zelo pomembno raziskavo so izvedli tudi slovenski raziskovalci, ki so na osnovi koncentriranja vodnih vzorcev s pomočjo monolitnih kromatografskih kolon in RT-qPCR razvili metodo za zaznavanje Pepino mosaic virusa (PepMV) and Potato spindle tuber viroida (PSTVd) (Mehle in sod., 2017).

5 SKLEPI

V različnih okoljskih vodah, kot so drenažne vode, reke, potoki, jezera in oceani so identificirali številne stabilne rastlinske viruse, ki so se ohranjali zunaj živih celic dlje časa in okužujejo širši spekter gostiteljev. V okoljske vode se sproščajo skozi poškodovan koreninski sistem ali iz razpadajočih organskih ostankov rastlin, prav te vode pa so pogost vir namakalnih sistemov. Kontaminacija vode z rastlinskimi patogeni predstavlja pomembno pot prenosa na večje razdalje, povečuje možnost razširjanja okužbe na širšem področju pridelovalnih površin, kar lahko privede do novih, do sedaj neznanih gostiteljev za posamezni rastlinski patogen. Širjenje okužbe z vodo je mogoče tudi v primeru zaprtih vodnih sistemov, kot je hidroponika, kjer lahko vir okužbe predstavlja vnos okuženih sadik, s katerimi se lahko virusi in viroidi sproščajo v hranilno raztopino. Velik izziv predstavlja tudi detekcija, saj so koncentracije virusov in viroidov v vodnih sistemih izredno nizke. Pri tem ovire premagujemo z metodami koncentriranja, novimi metodami izolacije, predvsem pa s tehnikami molekularnih metod (PCR tehnike), ki jih odlikuje visoka stopnja občutljivosti.

6 VIRI

- Bar Joseph, M. (2003). Natural history of viroids – horticultural aspects. V: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., Semancik, J. S. (ur.). Viroids (str. 246–251). CSIRO Publishing, Australia.
- Boben, J., Kramberger, P., Petrovic, N., Cankar, K., Peterka, M., Trancar, A.S., Ravnikar, M. (2007). Detection and quantification of Tomato mosaic virus in irrigation waters. Eur. J. Plant Pathology, 118:59–71.
- Branovič, K., Forcic, D., Ivancic, J., Strancar, A., Barut, M., Kosutic-Gulija, T., Zgorelec, R., Mazuran, R. (2003). Application of short monolithic columns for improved detection of viruses. Journal of Virological Methods, 110:163–171.

- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L., Zurcher, E.J. (1996). 'Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996.'
- Büttner, C., Bandte, M., Echevarria Laza, H.J., Paschek, C., Ulrichs, D., Schwarz, D., Pestemer, W. (2008). Transmission of viruses in soilless cultivation systems. V: 9th International Congress of Plant Pathology, Turin 24-28th August: 1 str.
- Candresse, T., Hammond, R.W., Hadidi, A. (1998). Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reactions (PCR). V: Hadidi, A., Khetrpl, R.K., Koganezawa, H. (ur.). Plant virus disease control (str. 409–410). St. Paul, APS Press.
- Castello, J.D., Lakshman, D.K., Tavantzis, S.M., Rogers, S.O., Bachand, G.D., Jagels, R., Charlisle, J., Liu, Y. (1995). Detection of infectious Tomato mosaic tobamovirus in fog and clouds. *Phytopathology*, 85:1409–1412.
- Clark, M.F. in Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34:475–483.
- Di Serio, F., Navarro, B., Flores, R. (2017). Origin and Evolution of Viroids. V: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J. W., Palukaitis, P. (ur.). *Viroids and Satellites* (str. 125–134). Academic Press, UK.
- Ding, B., Itaya, A. (2007). Viroid: A Useful Model for Studying the Basic Principles of Infection and RNA Biology. *The American Phytopathological Society*, 20 (1):7–20.
- EPPO (2006). Post-entry quarantine for potato. *Phytosanitary procedures PM 3/21(2)*, pp. 19. EPPO, Paris (FR).
- Erdiller, G. in Akbas, B. (1994). Plant viruses in Ankara rivers and lakes. *Journal of Turkish Phytopathology*, 23:119–126.
- Flores, R., Hernandez, C., de Alba, A. E. M., Daros, J. A., Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid–host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 43:117–139.
- Gergerich, R.C. in Dolja, V.V. (2006). Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. *The Plant Health Instructor*, APS.
- Gosalves, B., Navarro, J.A., Lorca, A., Botella, F., Sanchez-Pina, M.A., Pallas, V. (2003). Detection of Melon necrotic spot virus in water samples and melon plants by molecular methods. *Journal of Virological Methods*, 113:87–93.
- Hammond, R. W. in Owens, R. A. (2006). Viroids: New and Continuing Risks for Horticultural and Agricultural Crops. *The American Phytopathological Society*.
- Hull, R. (2009). *Comperative plant virology*, second edition. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA, San Diego, California, USA, London, UK.
- ICTV (2012). *Virus taxonomy*. Elsevier Academic Press, 1–1327.
- Koenig, R. (1986). Plant viruses in rivers and lakes. *Advances in Virus Research*, 31:321–333.
- Koenig, R., Lesemann, D.E., Burgermeister, W. (1988). Isolation of Carnation ringspot virus from a canal near a sewage plant cDNA Hybridization analysis, serology and cytopathology. *Journal of Phytopathology*, 121:346–356.
- Koenig, R., Pfeilstetter, E., Kegler, H., Lesemann, D.E. (2004). Isolation of two strains of a new Tombusvirus (Havel river virus, HaRV) from surface waters in Germany. *European Journal of Plant Pathology*, 110:429–433.
- Kovalskaya, N. in Hammond, R. W. (2014). Molecular biology of viroid–host interactions and disease control strategies. *Plant Science*, 228:48–60.

- Legrand, P. (2015). Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: a review. *Bulletin*, 45 (2):240–251.
- Mehle, N. in Ravnikar, M. (2012). Plant viruses in aqueous environment: survival, water mediated transmission and detection. *Water Research*, 46, 16:4902–4917.
- Mehle, N., Gutierrez-Aguirre, I., Prezelj, N., Delić, D., Vidic, U., Ravnikar, M. (2014). Survival and Transmission of Potato Virus Y, Pepino Mosaic Virus, and Potato Spindle Tuber Viroid in Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 80:1455–1462.
- Mehle, N., Kogovšek, P., Rački, N., Jakomin, T., Gutierrez-Aguirre, I., Kramberger, P., Ravnikar, M. (2017). Filling the gaps in diagnostics of Pepino mosaic virus and Potato spindle tuber viroid in water and tomato seeds and leaves. *Plant Pathology*, 66:1191–1201.
- Panayotou, P.C. (1997). Water-borne plant viruses: National Agricultural Research Foundation, Heraklion, Crete. *Hellenic Virology*, 2:18–30.
- Pares, R.D., Gunn, L.V., Cresswell, G.C. (1992). Tomato mosaic virus infection in a recirculating nutrient solution. *Journal of Phytopathology*, 135, 3:192–198.
- Park, W.M., Lee, G.P., Ryu, K.H., Park, K.W. (1999). Transmission of Tobacco mosaic virus in recirculating hydroponic system. *Scientia Horticulturae*, 79:217–226.
- Pleše, N., Juretić, N., Mamula, D., Polak, Z., Krajačić, M. (1996). Plant viruses in soil and water of forest ecosystems in Croatia. *Horn, Austria, Phytion*, 36, 1:135–143.
- Prezelj, N., Delić, D., Gutierrez-Aguirre, I., Tušek-Žnidarič, M., Mehle, N., Ravnikar, M. (2009). Preživetje in infektivnost virusa mozaika pepina (PepMV) v vodnem okolju. V: Maček, J. Zbornik predavanj in referatov 9. slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin. (ur.) (457-460). Nova Gorica, 4.-5. marec 2009. Ljubljana, Društvo za varstvo rastlin Slovenije.
- Radišek, S., Guček, T., Leskošek, G., Benko Beloglavec, A., Jakše, J., Javornik, B. (2017). Huda viroidna zakrnelost hmelja. Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije, Žalec.
- Riley, M.R., Gerba, C.P., Elimelech, M. (2011). Biological approaches for addressing the grand challenge of providing access to clean drinking water. *Journal of Biological Engineering*, 5 (2):1–10.
- Rupar, M., Ravnikar, M., Tušek-Žnidarič, M., Kramberger, P., Glais, L., Gutierrez-Aguirre, I. (2013). Fast purification of the filamentous Potato virus Y using monolithic chromatographic supports. *Journal of Chromatography, A*, 1272:33–40.
- Ruščić, J., Gutierrez-Aguirre, I., Urbas, L., Kramberger, P., Mehle, N., Škorić, D., Barut, M., Ravnikar, M., Krajačić, M. (2013). A novel application of methacrylate based short monolithic columns: concentrating Potato spindle tuber viroid from water samples. *Journal of Chromatography, A*, 1274:129–136.
- Rutjes, S.A., Italiaander, R., van den Berg, H.H.J.L., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M. (2005). Isolation and Detection of Enterovirus RNA from Large-Volume Water Samples by Using the NucliSens miniMAG System and Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Applied Environmental Microbiology*, 71(7):3734–3740.
- Sevik, M.A. (2011). Water Pollution: Water-Borne Plant Viruses. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 27(1):40–47.
- Symonds, E.M., Karena, H., Nguyen, H., Harwood, V.J., Breitbart, M. (2018). Pepper mild mottle virus: A plant pathogen with a greater purpose in (waste)water treatment development and public health management. *Water research*, 144:1–12.

- Teakle, D.S., Morris, T.J. (1981). Transmission of Southern bean mosaic virus from soil to bean seeds. *Plant Diseases*, 65:599–600.
- Tosic, M. in Tosic, D. (1984). Occurrence of Tobacco Mosaic virus in water of the Danube and Sava Rivers. *Journal of Phytopathology*, 110:200–202.
- Viršček Marn, M. (2016). Predstavitev rastlinskih virusov. V: Mavrič Pleško, I. (ur.) *Rastlinski virusi in njihovo poimenovanje* (str. 13–18.). Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana.
- Yarwood, C.E. (1960). Release and preservation of virus by roots. *Phytopathology*, 50:111–114.