Prenosivost virusa sjemenom u mahunarki

Justić, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:376991

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Helena Justić

Prenosivost virusa sjemenom u mahunarki

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

ZAHVALA

Veliko, veliko hvala profesorici Dijani Škorić na predivnom mentorstvu i svoj pomoći, srdačnosti, razumijevanju i strpljenju bez kojih bi izrada ovog rada bila mnogo teža.

Hvala kolegici Anamariji Butković na pomoći u laboratorijskom radu pruženoj tijekom osjetljivog razdoblja.

Hvala djelatnicima i osoblju Zavoda za mikrobiologiju i Botaničkog zavoda koji su mi osigurali ugodnu i podržavajuću okolinu. Hvala gospođi Darinki Kajić na predivnom društvu i dragom poznanstvu.

Hvala obitelji i prijateljima bez čijeg bi sudjelovanja i pomoći moj put do diplome bio duži i trnovitiji.

Hvala mojoj malenoj Paulini što je čitavo vrijeme i na svakom koraku bila uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

PRENOSIVOST VIRUSA SJEMENOM U MAHUNARKI

Helena Justić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus mozaika krastavca, virus običnog mozaika graha i virus mozaika repe značajni su i poznati biljni patogeni sa širokim krugom domaćina koji često uzrokuju štetu na kultiviranim biljkama. Uz visoku infektivnost i patogenost, pojavi i širenju virusnih infekcija doprinose različite mogućnosti horizontalnog prijenosa virusa. Postotak prijenosa navedenih virusa vertikalnim putem tj. sjemenom je malen, ali od izuzetnog značaja u uvjetima monokulturnog uzgoja. Članovi nedavno otkrivene porodice *Endornaviridae* se prenose isključivo vertikalno; perzistiraju u domaćinskoj biljci i ne uzrokuju bolesti, a njihova prisutnost je fenotipski neprimjetna. Prenosivost sjemenom je zajednička biološka značajka ovih virusa koji djelomično dijele i krug domaćina. Cilj rada je istražiti prisutnost navedenih virusa u biljkama dobivenima iz komercijalno dostupnog sjemena različitih vrsta mahunarki, kao i popratnu simptomatologiju, te potvrditi njihovu vertikalnu prenosivost i krug domaćina. Ovo je također prvo istraživanje endornavirusa u Hrvatskoj. Rast i razvoj biljaka praćen je makroskopski. Iz listova razvijenih biljaka ekstrahirana je dvolančana RNA (dsRNA) te analizirana elektroforetski i spektrofotometrijski. Ekstrakti su podvrgnuti reverznoj transkripciji i lančanoj reakciji polimeraze (RT-PCR) s početnicama različite specifičnosti za detekciju četiri virusa. Potencijalno virusni amplikoni su sekvencirani i analizirani. Na temelju rezultata još se ne može potvrditi prenosivost očekivanih virusa sjemenom odnosno prisutnost u obrađenoj skupini uzoraka.

59 stranica, 8 slika, 17 tablica, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: BCMV, CMV, dsRNA, *Endornavirus*, RT-PCR, TuMV

Voditelj: prof. dr. sc. Dijana Škorić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dijana Škorić

prof. dr. sc. Božena Mitić

izv. prof. dr. sc. Ivana Maguire

Rad prihvaćen 16. veljače 2017. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

SEED TRANSMISSION OF VIRUSES IN LEGUMES

Helena Justić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Cucumber mosaic virus, *Bean common mosaic virus* and *Turnip mosaic virus* are well-known and globally distributed plant pathogens that represent a threat to the crop production. The efficient horizontal transmission contributes to their high infectivity and virulence. Although vertical transmission via seed occurs rarely, it can adversely influence the plants grown in monoculture and increase the virus distribution. Members of a recently discovered family *Endornaviridae* are transmitted exclusively vertically and have a persistent lifestyle without causing apparent disease symptoms. Seed transmission is a biological feature shared among above mentioned viruses which also have partially overlapping host ranges. The purpose of this thesis is to test the presence of these viruses in the leguminous plants grown from commercially available seeds, as well as to investigate symptoms, host range and confirm seed-transmissibility. This was also the first attempt to detect endornaviruses in Croatia. Growth and development of the seedlings were monitored. Double-stranded RNA (dsRNA) was extracted from fully developed leaves and analyzed electrophoretically and spectrophotometrically. DsRNA samples were reverse-transcribed and amplified using primers targeting the above mentioned viruses. Amplicons were sequenced and analyzed. As yet, the research failed to confirm the presence of these viruses in the analyzed group of legume seedlings.

59 pages, 8 figures, 17 tables, 40 references, original in: Croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: BCMV, CMV, dsRNA, *Endornavirus*, RT-PCR, TuMV

Supervisor: Prof. Dijana Škorić, Ph. D.

Reviewers: Prof. Dijana Škorić, Ph. D.

Prof. Božena Mitić, Ph. D.

Assoc. Prof. Ivana Maguire, Ph. D.

Thesis accepted on February 16th, 2017

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. VIRUSI UZROČNICI AKUTNIH BILJNIH BOLESTI 2
1.1.1. PRENOSIVOST BILJNIH VIRUSA 3
1.1.1.1. Horizontalni prijenos 3
1.1.1.2. Vertikalni prijenos – prijenos sjemenom 4
1.1.2. RODOVI *Potyvirus* i *Cucumovirus* 5
1.1.2.1. Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 5
1.1.2.2. Virus mozaika repe (*Turnip mosaic virus*, TuMV) 6
1.1.2.3. Virus običnog mozaika graha (*Bean common mosaic virus*, BCMV) 7
1.2. VIRUSI KOJI UZROKUJU PERZISTENTNE ZARAZE 8
1.2.1. ROD *Endornavirus* 9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 11
3. MATERIJALI I METODE 12
3.1. MATERIJALI 12
3.1.1. PUFERI I OTOPINE 12
3.1.1.1. Puferi i otopine za izolaciju dsRNA 12
3.1.1.2. Puferi i otopine za elektroforezu u agaroznom gelu 13
3.1.1.3. Puferi i otopine za poliakrilamidnu gel-elektroforezu 13
3.1.2. ENZIM I PUFER ZA TRETMAN DNazom 14
3.1.3. STANDARDI ZA ODREĐIVANJE MOLEKULARNE MASE dsRNA 14
3.1.4. POČETNICE, ENZIMI I OTOPINE ZA RT-PCR 15
3.1.4.1. Početnice za detekciju virusa 15
3.1.4.2. Enzimi i otopine za RT-PCR 15
3.1.5. BILJNI MATERIJALI 16
3.2. METODE 17
3.2.1. UZGOJ BILJAKA I PRAĆENJE FENOTIPSKIH PROMJENA TIJEKOM RASTA 17
3.2.2. IZOLACIJA VIRUSNIH dsRNA 17
3.2.2.1. Priprema kromatografskih kolona 18
3.2.2.2. Ekstrakcija 18
3.2.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA ČISTOĆE UZORAKA 19

3.2.4. TRETMAN DNazom 20
3.2.5. ELEKTROFORETSKA ANALIZA DVOLANČANE dsRNA i RT-PCR-PRODUKATA 20
3.2.5.1. Elektroforeza na agaroznom gelu 20
3.2.5.2. Poliakrilamidna gel-elektroforeza (PAGE) 22
3.2.6. UMNAŽANJE VIRUSNIH SEKVENCI REVERZNOM TRANSKRIPCIJOM I LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE 23
3.2.6.1. Reverzna transkripcija 24
3.2.6.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR) 26
3.2.7. SEKVENCIRANJE I ANALIZA PRODUKATA RT-PCR REAKCIJE 27
4. REZULTATI 28
4.1. FENOTIPSKE PROMJENE NA BILJKAMA 28
4.2. ELEKTROFORETSKA ANALIZA EKSTRAKATA dsRNA 31
4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA 43
4.4. ELEKTROFORETSKA ANALIZA PRODUKATA RT-PCR REAKCIJE 45
4.5. REZULTATI SEKVENCIRANJA 46
5. RASPRAVA 47
6. ZAKLJUČAK 51
7. LITERATURA 52
8. PRILOZI 57
9. ŽIVOTOPIS 59

1. UVOD

Temelji biljne virologije postavljeni su krajem 19. st. nakon godina ulaganja napora da se pronađe uzrok patoloških mozaičnih promjena na biljkama. Istraživački rad usmjeren prvenstveno na patološke promjene duhana i publikacije Bijerincka dale su ključan doprinos konceptualnim promjenama i razvoju spoznaje o postojanju infektivnih faktora za koje se kasnije ispostavilo da su virusi (Bos 1999). Tim velikim korakom za fitopatologiju se ušlo u razdoblje fitovirologije i procvata spoznaje o biološkim karakteristikama i učincima pripadnika tog zanimljivog dijela biosfere. Proučavanje patogenih virusa obilježilo je čitavu disciplinu iz praktičnih, ekonomskih i metodoloških razloga, a odredilo je i općenitu predodžbu o biljnim virusima kao parazitima (Roossinck 2010). Iako je opisano preko 3704 virusne vrste iz najmanje 112 porodica (Simmonds i sur. 2017) od kojih su samo dio biljni virusi (oko 900 vrsta), danas je jasno da je znanost samo „zagrebla ispod površine“ virosfere. Pronalazak mnoštva kriptičkih (danas zvanih „perzistentni“) virusa u posljednjim desetljećima i razvoj metagenomike nagovijestili su postojanje potpuno drukčijeg svijeta biljnih virusa: sveprisutnih, a pritajenih simbionata koji mogu biti komenzali, ali i mutualisti (Márquez i sur. 2007, Nakatsukasa-Akune i sur. 2005, Roossinck 2010). Neparazitska simbioza između virusa i domaćina za oba člana stvara drukčiji biološki kontekst u kojem se evolucija može odvijati na drukčiji način, na što i upućuju zanimljive osobitosti perzistentnih virusa (Liu i sur. 2010, Roossinck 2015, Roossinck 2010, Song i sur. 2013). Različitost takozvanih „životnih stilova“ virusa (Roossinck 2010) u spletu s velikom raznolikošću strukture i funkcije genoma temelj je za razvoj osebujnih adaptivnih mehanizama (Holland i sur. 1982, Roosinck 2005). Kratki ciklusi, maleni genomi i ogroman broj replika viruse čini prikladnim modelom za proučavanje evolucije nukleinskih kiselina i molekularnih interakcija u kontekstu složenih simbiotskih odnosa (Roossinck 2005, Roossinck 2001).

1.1. VIRUSI UZROČNICI AKUTNIH BILJNIH BOLESTI

„Akutni biljni virusi“, kako ih naziva Roosinck (2010) imaju važnu zajedničku značajku – uzrokuju patološke promjene u biljaka. Kao takvi su od ključnog značaja za ljudsku egzistenciju i djelatnosti pa su i znanstveni napori kroz povijest bili usmjereni na njih. Opseg patološkog utjecaja na biljku ovisi o brojnim faktorima vezanima i za tip virusa i za domaćinsku biljku. Oboljenje općenito može završiti oporavkom, smrću biljke ili prelaskom u kroničnu infekciju (Roossinck 2010). Virusi se biološki razlikuju u sposobnosti da uzrokuju infekciju, pokrenu patološki proces te dosegnu i održe visok stupanj patogenosti. S druge strane, *fitness* biljke-domaćina (zdravlje, dob, genom) modulira utjecaj virusne prisutnosti te u konačnici ishod može varirati za različite skupine domaćina (http://www.dpvweb.net/). Razvoj patološkog procesa u pravilu je očit i lako se može pratiti makroskopskim pregledom fenotipskih promjena na biljci. Simptomi virusne replikacije i rasprostranjivanja kroz biljna tkiva su brojni i varijabilni, često nespecifični, ali uvijek odražavaju neku vrstu poremećaja fiziologije. Uobičajene su mozaične pojave na listovima, klorotična i nekrotična područja, usporeni rast i kržljavost, kovrčanje te usporavanje ili izostajanje razvoja generativnih ili vegetativnih biljnih dijelova (http://www.dpvweb.net/). Sve od navedenog dovodi do smanjenja konačnog prinosa u poljoprivredi pa je od iznimne važnosti saznati što više o putovima i mehanizmima prijenosa virusa, patogenezi te faktorima rezistencije i razviti metode kontrole i suzbijanja epidemija (Ingwell i sur. 2012, Wilson 2014). Upravo epidemijski razmjeri često obilježavaju pojavu virusnih oboljenja, a razloga je više. Za početak, virusi visoke virulencije sa širokim krugom domaćina lakše i brže pronalaze kompatibilnog domaćina te uspješnije pokreću i održavaju patološki proces. Nadalje, monokulturni uzgoj biljaka smanjene genetičke raznolikosti i ujednačenog genetičkog profila prostorno i fiziološki osigurava osjetljivu domaćinsku populaciju (Roossinck 2010). Globalna razmjena sadnog materijala i prehrambenih proizvoda nekontrolirano u biljne zajednice uvodi strane vrste te povećava rizik za introdukciju virusa na koji nativne biljke nisu adaptirane i koji u tim uvjetima može prouzročiti štete velikih razmjera (Roossinck 2013). Također, prilagođenost različitim načinima prijenosa (horizontalno vektorima, mehaničkom inokulacijom; vertikalno sjemenom) potencira širenje infekcije te osigurava rezervoare i kontinuitet pojavnosti virusa (http://www.dpvweb.net/).

1.1.1. PRENOSIVOST BILJNIH VIRUSA

1.1.1.1. Horizontalni prijenos

Većina virusa koji uzrokuju biljne bolesti se uspješno horizontalno prenose (Roossinck 2010). Unutar biljke kreću se kroz razna tkiva i često uzrokuju sistemsku infekciju dok je prijenos između biljaka posredovan različitim vektorima (Safari i Roossinck 2014, Wilson 2014). Za najveći postotak prijenosa virusa u prirodnim uvjetima odgovorne su fitofagne skupine člankonožaca, u prvom redu kukci (lisne uši, štitasti moljci, skakavci, resokrilci, kornjaši), a među njima su najvažnije lisne uši (Ng i Perry 2004, http://www.dpvweb.net/). Virioni se tijekom oštećivanja biljnog tkiva prihvaćaju za usne organe životinja te s istih otpuštaju prilikom hranjenja na drugoj biljci. Lisne uši su česti i djelotvorni vektori zbog intenzivne hranidbene aktivnosti – ispituju kvalitetu i prikladnost svake biljke na kojoj se zateknu te njihovi usni organi za bodenje lako dolaze u kontakt s biljnim sokom (Gray i Banerjee 1999). Iako je za prijenos viriona dovoljan kratak kontakt infektivnog soka i usnih organa, mora postojati molekularna kompatibilnost između komponenti kapside viriona i površine usnih organa te zato za svaku vrstu virusa postoji (veći ili manji) krug odgovarajućih vektora (Ng i Perry 2004, Palukaitis i García-Arenal 2003).

Mehanička manipulacija zaraženim biljnim materijalom tijekom raznih agrotehničkih postupaka često uzrokuje prijenos infekcije; alati, ruke i ostali predmeti također djeluju kao vektori te se u skladu s tim rizikom moraju tretirati (Wilson 2014). Kontakt biljnih tkiva mogu prouzročiti i parazitske biljke (primjerice *Cuscuta* sp.) čija vaskulatura čini koridor za transport virusa između dvije biljke; u nekim slučajevima može omogućiti i replikaciju virusa te tako postati (sekundarni) domaćin i rezervoar (http://www.dpvweb.net/). Osim navedenim horizontalnim putevima, „akutni virusi“ se mogu prenositi i vertikalno gametama odnosno sjemenom (Roossinck 2010, http://www.dpvweb.net/).

1.1.1.2. Vertikalni prijenos – prijenos sjemenom

Prilagođenost na vertikalni prijenos često je od ključnog pozitivnog značenja za virus i negativnog za zdravlje biljaka. Iako je prenosivost virusa koji uzrokuju akutne bolesti sjemenom općenito malena (http://www.dpvweb.net/), na nekoliko načina podržava širenje viroza. Sjeme je fizička poveznica između generacija; virioni sposobni doseći sjeme i zadržati infektivnost mogu osigurati kontinuitet zaraze između generacija, pod uvjetom da roditeljska biljka završi generativni ciklus. Sjeme kao transportni sustav također sprječava izlaganje viriona okolišnim uvjetima te smanjuje vjerojatnost narušavanja integriteta i funkcije virusne čestice. Posljedično djeluje i kao spremište koje osigurava opstanak i prisutnost virusa, ali i transport na velike udaljenosti, vrlo intenzivan u globalnoj trgovini (http://www.dpvweb.net/).

Iako adaptivan, za viruse uzročnike akutnih biljnih infekcija prijenos sjemenom nije primaran ni pouzdan način prijenosa. Stope prenosivnosti uvelike se razlikuju u ovisnosti o vrsti virusa i domaćinskoj biljci te upućuju na složenosti procesa koji u konačnici dovode do potentne infekcije sjemena (de Assis i Sherwood 2000, http://www.dpvweb.net/). Da bi virus mogao doseći sjeme, osnovni preduvjet je prilagođenost na transport kroz biljna tkiva. Virioni uneseni u, primjerice, tkivo lista ubodom lisne uši moraju aktivirati molekularne mehanizme koji će im omogućiti kretanje iz stanice u stanicu do vaskularnih tkiva te potom u generativne dijelove sve do gametofita. Na tom dugačkom i kompliciranom putu mogu se ispriječiti razne barijere domaćinske obrane ili molekularne nedostatnosti virusa (Palukaitis i García-Arenal 2003). Nadalje, virus u sjemenu ne mora nužno biti infektivan i u prisutan dovoljnoj količini da prouzroči patološki proces u mladoj biljci. Istraživanja su također pokazala da o smještaju viriona u sjemenu ovisi vjerojatnost razvoja infekcije u mladici te da je infekcija embrija, a ne tegumenta ili endosperma temelj za navedeno (de Assis i Sherwood 2000). Povrh toga, sama inficiranost embrija ne dovodi nužno do oboljenja mladice; čak i kad se infekcija mlade biljke ustanovi, često je asimptomatska (de Assis i Sherwood 2000).

Osim sistemske infekcije majčinske biljke koja dovodi do infekcije gametofita, virioni sjeme mogu zaraziti i putem peluda. Prenosivost virusa gametama također varira između vrsta virusa, ali i spolova pa je tako u nekim slučajevima vjerojatniji prijenos virusa putem ženskog gametofita (de Assis i Sherwood 2000).

1.1.2. RODOVI *Potyvirus* i *Cucumovirus*

Virusi iz rodova *Potyvirus* (porodica *Potyviridae*) i *Cucumovirus* (porodica *Bromoviridae*) su virulentni i poznati patogeni sa širokim krugom biljnih domaćina. Rasprostranjeni su globalno i zaražavaju poljoprivredno i ekonomski važne kultivirane biljke u kategorijama povrća, voća, uljarica, drvnih i ostalih industrijskih biljaka (http://www.dpvweb.net/). Genom gradi (+) jednolančana RNA te ima karakteristično visoke frekvencije mutacija, što dovodi do brze divergencije i formiranja kvazivrsta (Roossinck 2010, Safari i Roosinck 2014, Holland i sur. 1982). Velika raznolikost i varijabilnost virusne vrste značajni su u patogenezi, dijagnostici i epidemiologiji jer se formiraju i biološke razlike između virusnih varijanti iste vrste (http://www.dpvweb.net/). Prijenos ovih virusa u prirodi primarno se odvija neperzistentno posredstvom lisnih uši. Kukci virus tijekom hranjenja brzo stječu i brzo predaju, a viruliferni ostaju relativno kratko vrijeme (nekoliko minuta do nekoliko sati) (López-Moya 2009). Epidemije često uzrokuju propadanje usjeva i velike ekonomske štete pa je znanosti u cilju doznati što više o epidemiologiji i razvoju virulencije te djelovati na rezistenciju biljke genetičkim modificiranjem i poticanjem obrambenih mehanizama.

1.1.2.1. Virus mozaika krastavca (*Cucumber mosaic virus*, CMV)

CMV pripada rodu *Cucumovirus* (porodica *Bromoviridae*). To je jedan od najvirulentnijih i najrasprostranjenijih biljnih virusa. Ima najširi poznati krug domaćina među biljnim virusima koji broji preko 1200 vrsta biljaka iz više od 100 porodica divljih i kultiviranih biljaka te se javlja se u svim klimatskim zonama od umjerenog do tropskog pojasa (http://www.dpvweb.net/). Simptomatologija varira ovisno o domaćinu i virusnom soju te uključuje mozaik, kloroze, nekroze, kržljavost, a počinje se razvijati nekoliko dana nakon inokulacije (Accotto i sur. 1998, Mochizuki i Ohki 2012). CMV prenosi oko 80 vrsta lisnih uši od kojih su najznačajnije *Myzus persicae* i *Aphis gossypii* (Palukaitis i García-Arenal 2003). Alternativno se prenosi vilinom kosom u kojoj se i replicira, mehaničkom inokulacijom i zaraženim biljnim sokom te sjemenom (Roossinck 2001, (http://www.dpvweb.net/). Prenosivost sjemenom se kreće u rasponu od 1-50% ovisno o CMV-soju, biljci-

domaćinu te zaraženosti biljnih roditelja (podrijetlo od majčinske, očinske ili obje biljke), a najefikasnija je među mahunarkama i travama ((http://www.dpvweb.net/). Virioni mogu biti prisutni u embriju, endospermu i tegumentu, kao i polenu (Palukaitis i García-Arenal 2003, Yang i sur. 1997). Iako varijabilna, prisutnost virusa u sjemenu je često kritična upravo zato što omogućava dugoročni opstanak virusa i neočekivano izbijanje zaraze u novim područjima.

Genom CMV-a, kao i ostalih članova porodice čine tri genomska segmenta (+) jednolančane (eng. *single-stranded*, ss) RNA (RNA1, 2 i 3), a u pregledima molekularnih virusnih vrsta u stanici vidljiva su zbog specifične virusne translacijske strategije i dva subgenomska segmenta. Genomski s pripadajućim subgenomskim segmentima pakiraju se u kapside odvojeno tako da se stvara tri vrste izometričnih viriona različitog sedimentacijskog koeficijenta. Inokulacija svih genomskih RNA nužna je za infektivnost. Segmentiranost genoma doprinosi varijabilnosti i evolucijskom potencijalu jer omogućava razmjenu svih segmenata unutar vrste te RNA3 između vrsta (Palukaitis i García-Arenal 2003, Roossinck 2005, Roossinck 2001).

Neki sojevi CMV-a nose satelitsku RNA (satRNA) – kratku, linearnu ssRNA koja se bez CMV-a kao virusa pomagača (eng. *helper virus*) ne može replicirati. Prisutnost satRNA tijekom infekcija može djelovati na različite načine, od izostanka utjecaja preko pogoršanja do slabljenja simptoma izazvanih infekcijom (Roossinck 2001, Palukaitis i García-Arenal 2003).

1.1.2.2. Virus mozaika repe (*Turnip mosaic virus*, TuMV)

Virus mozaika repe pripada rodu *Potyvirus* (porodica *Potyviridae*). Kao i CMV, ima širok krug domaćina (biljne vrste potječu iz 20 porodica dvosupnica) i rasprostranjen je globalno. U prirodi ga neperzistentno prenosi 40-50 vrsta lisnih uši, među kojima su najznačajnije vrste *Myzus persicae* i *Brevicoryne brassicae*. Kukci virus stječu i predaju u novu biljku u manje od minute, a zadržavaju ga manje od 4 h. Relativno dugo zadržava stabilnost u biljnom soku pa se lako prenosi tijekom mehaničkih manipulacija (http://www.dpvweb. net/). Prijenos sjemenom, s druge strane, je puno rjeđa pojava o kojoj za neke vrste gotovo nema podataka (http://www.dpvweb. net/).

Simptomatologija uključuje brojne patološke pojave, primjerice pjegavost i crna nekrotična područja (kupus, cvjetača) te mozaičnost, kržljavost i distorzije listova (repa,

repica, bijela repa, rotkvica, gorušica). Razlike u virulenciji sojeva kao i specifični odgovori domaćinske biljke proizvode varijacije u tipu i intenzitetu simptoma (http://www.dpvweb.net/).

Virioni TuMV-a su, kao i u ostalih članova porodice *Potyviridae*, fleksibilni filamentozni štapići s (+) ssRNA genomom. Dijagnostički značajno svojstvo članova čitave porodice je proizvodnja inkluzija nalik na vjetrenjače u zaraženim stanicama prema kojima se mikroskopski mogu razlikovati od drugih vrsta virusa (López-Moya i sur. 2009, http://www.dpvweb.net/).

1.1.2.3. Virus običnog mozaika graha (*Bean common mosaic virus*, BCMV)

Virus običnog mozaika graha također pripada rodu *Potyvirus* te s virusom mozaika repe dijeli sličnosti strukture genoma i viriona, kao i sposobnost tvorbe karakterističnih inkluzija (López-Moya 2009, http://www.dpvweb.net/). BCMV se pronalazi globalno, ali u odnosu na CMV i TuMV prirodno ima puno uži krug domaćina – zaražava vrste iz roda *Phaseolus*, dominantno *Phaseolus vulgaris* L. (obični grah) te nekoliko kultiviranih i divljih vrsta mahunarki. Na običnom grahu uzrokuje dvije osnovne skupine simptoma - mozaik te sustavnu nekrozu, koji se javljaju ovisno o kombinaciji soja virusa i genotipa domaćina te stadiju u kojem je biljka zaražena (http://www.dpvweb.net/, Petrović i sur. 2010). Simptomatologija BCMV-a je pretežno karakteristična, ali nije dovoljna za makroskopsku identifikaciju uzročnika jer i druge vrste virusa uzrokuju sličnu patološku sliku, npr. CMV ili virus žutog mozaika graha (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV). BCMV je stabilan i lako se prenosi zaraženim biljnim sokom, u kojem infektivnost zadržava i nekoliko dana. U prirodi ga neperzistentno prenosi nekoliko vrsta lisnih uši, među kojima su najznačajnije *Acyrthosiphon pisum, Aphis fabae* i *Myzus persicae* koje virus stječu i predaju u nekoliko desetaka sekundi (http://www.dpvweb.net/). Vrlo značajno za rasprostranjenost i pojavnost BCMV-a je visoka prosječna uspješnost prijenosa sjemenom. Ovisno o genotipu biljnog domaćina i soju virusa postotak potomstva zaraženih roditelja koji razvijaju simptome mozaika može sezati i do 83%. Sjeme se može inficirati putem ženskog i muškog gametofita. Virus pretežno inficira embrio, a postojanost u sjemenu može zadržati i do 30 godina (http://www.dpvweb.net/).

1.2. VIRUSI KOJI UZROKUJU PERZISTENTNE ZARAZE

Virusi koji neopaženi perzistentno zaražavaju biljke otkriveni su u drugoj polovici 20. stoljeća. Njihovo postojanje je oku znanosti dugo izmicalo zbog ovog intrigantnog i zanimljivog biološkog svojstva (Roossinck 2010). Izuzev nekoliko iznimaka koje ipak u domaćinima izazivaju određene promjene (Nakatsukasa-Akune i sur. 2005, Pfeiffer 1998, Xie i sur. 1994), infekcije uzrokovane većinom poznatih „perzistentnih virusa“ potpuno su asimptomatske odnosno ne uzrokuju fenotipske promjene. Prvotni naziv „kriptički virusi“ odražavao je navedeno (Roossinck 2015), dok naziv „perzistentni virusi“ upućuje na kasnije otkrivene osobitosti – osim što su neprimjetni i prividno benigni, infekcija koju uspostave je (u većini slučajeva) trajna, neizlječiva i nasljedna. Takvi virusi su prisutni u svim tkivima domaćina tijekom niza generacija, a kontinuitet zaraze ostvaruju isključivo vertikalnim prijenosom putem gameta odnosno sjemena čija je uspješnost gotovo 100% (Roossinck 2015). Još jedna zanimljiva i definirajuća značajka je potpuni izostanak virusnog horizontalnog transporta. Osim što se infekcija nijednim poznatim putem, primjerice vektorima ili cijepljenjem, ne može prenijeti na drugu biljku, nema dokaza o ikakvoj mogućnosti kretanja virusa između stanica u tkivima (Roossinck 2010). Sustavna infekcija se razvija isključivo uslijed diobe stanica te je pasivni transport citoplazmom jedini put do nove stanice (Safari i Roossinck 2014). Takav niz bioloških osobitosti omogućava razvoj osobitog odnosa između virusa i domaćina, potpuno drukčijeg od onog između patogenih virusa i njihovih domaćina. Podrijetlo „perzistentnih virusa“ je nepoznato, a o pritiscima koji su usmjerili njihovu evoluciju se nagađa. Ipak, jasno je da primjenjuju drukčije adaptivne strategije od virusa akutnih infekcija. Za početak, uspješnost prijenosa sjemenom je garancija kontinuiteta infekcije i rasprostranjivanja. Uz regulaciju veličine populacije u stanici, kao i efekta na molekularne procese moguće je otvaranje stabilne niše za virus čiju će prisutnost biljka moći podnijeti. „Perzistentni virusi“ pokazuju kako izgleda drugo lice *fitness*-a biljnih virusa: proizvodnja malih populacija i (čini se) mala genetička raznolikost, izostanak horizontalnog transporta i narušavanja biljne fiziologije osigurava stalnog, pouzdanog domaćina. To je ujedno temelj za dalje razvijanje simbiotskog odnosa između dvije strane te razvoj novih adaptacija (Safari i Roossinck 2014). Jasno je da „perzistentni virusi“ postoje u biljkama kao komenzali, ali vjerojatno i kao mutualisti. Spoznaja o njima nas uči da je generalna predodžba o virusima kao patogenima nuspojava povijesnog tijeka razvoja znanja

iz biljne virologije (Márquez i sur. 2007, Nakatsukasa-Akune i sur. 2005, Roossinck 2010). Navedeno dobro dopunjuje procjena rasprostranjenosti perzistentnih virusa u prirodi. Čini se da u divljim populacijama čine 50-70% virusa dostupnih analizama. Razvoj metagenomike dao je maha potrazi za skrivenim biljnim simbiontima i omogućio proširivanje opsega podataka baziranog na proučavanju perzistentnih infekcija u kultiviranim biljkama.

Perzistentni biljni virusi potječu iz nekoliko porodica biljnih virusa: *Partitiviridae*, *Endornaviridae*, *Chrysoviridae* i *Totiviridae* i većinom imaju dvolančani RNA-genom (Roossinck 2015, Safari i Roossinck 2014). Nalazi upućuju na njihovu prisutnost širom biosfere: velike dsRNA pronađene su u protistima, gljivama, oomicetama, biljkama, ali i u životinjama (Fukuhara i sur. 2006). Filogenetičke analize upućuju na složenu evoluciju koja se odvijala u domaćinima raznih carstava i vjerojatno uključivala višestruke razmjene genskog materijala s domaćinima. U prilog tome govori široka prisutnost sekvenci homolognih virusnima u genomima prokariota i eukariota koje su relikti pradavnih infekcija i svjedočanstvo o genskoj razmjeni tijekom evolucijske povijesti (Liu i sur. 2010, Song i sur. 2013).

1.2.1. ROD *Endornavirus*

Postojanje endornavirusa ustanovljeno je tek početkom 90-ih godina prošlog stoljeća. Kratak istraživački period otkrio je najbitnije o najmlađoj skupini virusa, ali se o njoj i dalje vrlo malo zna. Opisano je tek 12 virusnih vrsta smještenih u rod *Endornavirus*, zasad jedini rod u porodici *Endornaviridae* (http://ictvonline.org/). Svi endornavirusi imaju obilježja „perzistentnih virusa“, a pronađeni su u biljkama, gljivama i oomicetama (Fukuhara i sur. 2006). Imaju dvolančani (eng. *double-stranded*, ds) RNA-genom veličine između 9,8 i 17,6 tisuća baznih parova (kbp) bez kapside koji je u stanici zaštićen vezikularnim tvorbama (Okada i sur. 2013). Mogu zaraziti važne usjeve, primjerice rižu, grah, bob, papriku, ječam i papar. U nekim njihovim kultivarima gotovo je nemoguće naći jedinku koja ne nosi endornavirus. Osim što daje uvid u dio zajedničkog evolucijskog puta virusa i domaćina u kontekstu domestikacije, taj podatak pokreće pitanja o karakteru takve simbioze. Asimptomatske infekcije, mali i relativno konstantan broj replika u stanicama te gotovo maksimalna efikasnost prijenosa isključivo sjemenom i sporama čine biološki temelj za razvoj

mutualističkih odnosa (Okada i sur. 2013, Roossinck 2013). Testiranje hipoteza o mutualizmu, kao i parazitizmu će tek uslijediti, a otežava ih česta nedostupnost neinficiranih biljaka za usporedbu. Kontrole su nužne jer utjecaj virusa na fenotip može biti suptilan i naoko neprimjetan, pozitivan kao i negativan. Iz navedenog slijedi mogućnost da su endornavirusi indirektno selektirani tijekom evolucije nekih skupina biljaka zbog unaprjeđenja *fitness*-a domaćina.

O evoluciji endornavirusa se malo zna, kao i o evoluciji perzistentnih virusa općenito. Filogenetske analize jasno upućuju na veliku složenost i modularnost u razvoju kompozicije genoma recentnih virusa. Jedna od mogućnosti je da su evoluirali od arhaičnih mikovirusa nakon skoka između carstava čemu u prilog idu genetičke i ekološke sličnosti. Također je moguće da su dijelove genetskog materijala stekli i od bakterija.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

CMV, BCMV i TuMV značajni su biljni patogeni sa širokim krugom domaćina koji često uzrokuju štetu na kultiviranim biljkama (Wilson 2014). Uz visoku infektivnost i patogenost, pojavi i širenju virusnih infekcija doprinose različite mogućnosti prijenosa virusa. Sva tri virusa se prenose primarno horizontalno, posredovanjem kukaca-vektora, a prijenos je moguć i infektivnim biljnim sokom tijekom rukovanja i mehaničke inokulacije. Iako je postotak prijenosa navedenih virusa vertikalnim putem tj. sjemenom malen (http://www.dpvweb.net/), sve se više razmatra zbog važnosti u uvjetima monokulturnog uzgoja. Također postoje virusi koji se isključivo prenose sjemenom poput članova nedavno otkrivene porodice *Endornaviridae.* Endornavirusi perzistiraju u domaćinskoj biljci i ne uzrokuju bolesti; štoviše, njihova prisutnost u biljci je fenotipski neprimjetna (Okada i sur. 2013, Roossinck i sur. 2011). Prenosivost sjemenom je biološka značajka koja povezuje ovdje istraživane viruse kojima domaćini mogu biti mahunarke. Cilj ovog diplomskog rada je istražiti prisutnost navedenih virusa u biljkama dobivenima iz komercijalno dostupnog sjemena različitih vrsta mahunarki, kao i popratnu simptomatologiju, te potvrditi njihovu vertikalnu prenosivost i krug domaćina kao važne biološke odrednice pojedinih virusa. Ovo bi ujedno bilo prvo istraživanje endornavirusa u Hrvatskoj.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. PUFERI I OTOPINE

3.1.1.1. Puferi i otopine za izolaciju dsRNA

Fenol zasićen natrijevom lužinom (Acros Organics, UK)

Kloroform (Kemika, Hrvatska)

3 M Na-acetat, pH 5,5 (Kemika, Hrvatska)

96%-tni etanol (Gram Mol, Hrvatska)

SDS (10%-tna otopina, Sigma-Aldrich, SAD)

Celuloza CF-11 (Sigma-Aldrich, SAD)

10xSTE-pufer : 1 M NaCl (Alkaloid, Makedonija)

0,5 M Tris (Alkaloid, Makedonija)

10 mM EDTA (Kemika, Hrvatska)

pH 6,8 (podešeno s konc. HCl, Kemika, Hrvatska)

1xSTE/16%-tni etanol

TE-pufer: : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

10xTAE-pufer, Kemika, Hrvatska

400 mM Tris

200 mM Na-acetat

10 mM Na-EDTA, ph 7,2 (podešen ledenom octenom kiselinom)

3.1.1.2. Puferi i otopine za elektroforezu u agaroznom gelu

Agaroza, Sigma Chemical, SAD

10xTBE-pufer, Lonza, SAD

0,89 M Tris-borat, 0,02 M EDTA, pH 8,3

1xTAE-pufer (pripreman razrjeđivanjem 10xTAE-pufera)

Otopina boje za nanošenje uzoraka, *6x Loading Dye*, Fermentas, Litva

Tris-HCl (10 mM), pH 7,6

Bromfenol-plavilo (BFB) 0,03% (w/v)

Ksilen-cijanol FF 0,03%

Glicerol 60% (v/v)

EDTA (60 mM) (w/v)

3.1.1.3. Puferi i otopine za poliakrilamidnu gel-elektroforezu

10xTAE-pufer

Poliakrilamidni nativni gel, 6%-tni

Akrilamid (AA) 40%-tni, Merck, Njemačka

Bis-akrilamid (BIS) 2%-tni, Merck, Njemačka

TEMED 2%-tni, Fluka Chemie, Švicarska

Amonijev persulfat (APS), 10%-tni, Fluka Chemie, Švicarska

3.1.2. ENZIM I PUFER ZA TRETMAN DNazom

RQ1 RNase-Free DNase, 1U/µl, Promega, SAD

RQ1 DNase 10X Reaction Buffer, Promega, SAD

3.1.3. STANDARDI ZA ODREĐIVANJE MOLEKULARNE MASE dsRNA

GeneRuler High Range DNA Ladder, 0,5 µg/µL, Thermo Fisher Scientific, SAD

Duljine fragmenata u baznim parovima (bp): 48502, 24508, 20555, 17000, 15258, 13825, 12119, 10171

Za primjenu u gelu razrijeđen je 5 puta vodom za PCR.

100 bp DNA Ladder, 0,5 µg/µL, New England Biolabs, SAD

Duljine fragmenata (bp): 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500/517, 400, 300, 200, 100

1 kb DNA Ladder, 0,5 µg/µL, New England Biolabs, SAD

Duljine fragmenata (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500

ϕX174 DNA/BsuR1 (HaeIII) Marker 9, 0,1 µg/µL, Thermo Fisher Scientific, SAD

Duljine fragmenata (bp): 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72

Za primjenu u gelu razrijeđen je 5 puta vodom za PCR.

3.1.4. POČETNICE, ENZIMI I OTOPINE ZA RT-PCR

3.1.4.1. Početnice za detekciju virusa

CMV : CMV RNA 2-R, CMV RNA 2-F

BCMV: Dbcmv, Ubcmv

TuMV: M4T-R, Sprimer-F

Endornavirusi: Endor-R, Endor-F

Početnice CMV RNA 2-R i CMV RNA 2-F proizveo je Invitrogen, SAD, a sve ostale Macrogen, Republika Koreja. Podaci o specifičnosti početnica nalaze se u potpoglavlju 3.2.6., Tablica 3.

3.1.4.2. Enzimi i otopine za RT-PCR

MuLV reverzna transkriptaza, 50 U/µL, Applied Biosystems, SAD

5xM-MLV reakcijski pufer (sadrži $MgCl_2$), Promega, SAD

AMV reverzna transkriptaza, 300 U/µL, Promega, SAD

SuperScript III reverzna transkriptaza, 200 U/µL, Invitrogen, SAD

$MgCl_2$, 25 mM, Promega, SAD

dNTP Mix, 10mM, Invitrogen, SAD

Inhibitor RNaze, 20 U/µL, Applied Biosystems, SAD

10x PCR Buffer II (bez $MgCl_2$), Applied Biosystems, SAD

5X Colorless GoTaq Flexi Buffer, Promega, SAD

GoTaq DNA polimeraza, 5 U/µl, Promega, SAD

3.1.5. BILJNI MATERIJALI

Biljno tkivo korišteno kao izvor dsRNA potječe od 4 vrste mahunarki (grah, *Phaseolus vulgaris* L.; grašak, *Pisum sativum* L.; bob, *Vicia faba* L.; slanutak, *Cicer arietinum*, L.) i sezama (*Sesamum indicum* L.). Biljke su uzgojene iz komercijalno dostupnog sjemena u stakleničkim uvjetima u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu tijekom proljetnih mjeseci 2015. godine (Sl. 1.). Zasađeno je 20 biljaka svakog kultivara. Od svake dobro razvijene biljke prikupljeno je 500 mg tkiva listova i korišteno u procesu ekstrakcije. Kao dodatne kontrolne biljke za detekciju endornavirusa iz sjemena su uzgojene čili paprike i paprike babure (Tab. 12.), no iz njih su ekstrahirane ukupne RNA pomoću komercijalnog kompleta kemikalija (*RNeasy*, Qiagen, SAD) u postupku koji nije bio dio mog diplomskog rada. Zbog praktičnosti prikaza rezultata, popisi korištenih biljaka s opisom njihovih značajki prikazane su u poglavlju Rezultati (Tab. 8., Tab. 9., Tab. 10., Tab. 11., Tab. 12.).



Slika 1. Stakleničkiuzgoj dijela sjemenjaka mahunarki korištenih u ovom radu.

3.2. METODE

3.2.1. UZGOJ BILJAKA I PRAĆENJE FENOTIPSKIH PROMJENA TIJEKOM RASTA

Za potrebe istraživanja u standardnim stakleničkim uvjetima (prirodno osvjetljenje dugog dana, 21-30°C, min. 70% relativna vlažnost) je zasađeno ukupno 220 biljaka, tj. po 20 od svakog kultivara graha, boba, graška, i slanutka, te 20 biljaka sezama. Rast i razvoj od pojave klijanaca praćen je i dokumentiran u redovitim tjednim razmacima. Svaka biljka je detaljno pregledavana u potrazi za fenotipskim nagovještajima viroze; posebna pozornost posvećivana je mozaičnim, klorotičnim i nekrotičnim pojavama. Biljke su fotografirane te su bilježeni podaci o klijavosti i ostalim potencijalno značajnim promjenama na habitusu.

3.2.2. IZOLACIJA VIRUSNIH dsRNA

Analiza dsRNA je praktična i korisna metoda za detekciju prisutnosti virusa u biljnim tkivima. DsRNA veće relativne molekulske mase je redovito indikator replikacije virusa, a količina i duljina fragmenata većinom odražava strukturu virusnog genoma. Ova dijagnostička metoda nije specifična za pojedini virus, ali dobar odabir tkiva i pravilno provođenje postupaka omogućava brzo postavljanje hipoteze o postojanju viroze, a ponekad i o tipu virusa (na razini virusne porodice).

Metoda izolacije dsRNA iz biljnog tkiva korištena u ovom istraživanju uključuje kromatografski postupak razdvajanja dvolančanih ribonukleinskih kiselina od ostalih u smjesi. Temelji se na selektivnom vezanju dsRNA za celulozni prah (CF-11) suspendiran u puferu s volumnim udjelom etanola oko 16 % (16,5 % za najbolje rezultate). Propuštanje ekstrakta ukupnih nukleinskih kiselina kroz kolonu dovodi do adsorpcije dsRNA na čestice celuloze uz propuštanje ostalih molekula. Ispiranje kolone čistim STE-puferom (bez etanola) oslobađa i eluira dsRNA (Dodds 1993, Kearney i sur. 1990).

3.2.2.1. Priprema kromatografskih kolona

U epruvetama od 12 ml pomiješan je 1 g celuloze CF-11 sa 5 ml 1xSTE-pufera koji sadržava 16% etanola; smjesa je miješana na vibracijskoj miješalici uz oprez da ne zaostanu mjehurići zraka. Epruvete su ostavljene na stalku na sobnoj temperaturi da se sadržaj slegne. Prije upotrebe kolona odliven je supernatant te je ostavljen tanak sloj tekućine iznad stupca kako se isti ne bi osušio.

3.2.2.2. Ekstrakcija

Uzorci su pripremani od svježih listova dviju biljaka, ukupne mase 1 g. Listovi su smrznuti tekućim dušikom i homogenirani u sterilnom tarioniku. Homogenat je prebačen u čistu epruvetu od 12 ml, dodano je 4 ml 2xSTE-pufera te je sadržaj protresen nekoliko puta. Epruvete s homogenatima čuvane su na hladnome dok za sve uzorke nije završen taj korak. Na 4 ml homogenata dodano je 6 ml fenola i 0,6 ml otopine SDS-a, oko 1 min miješano na vibracijskoj miješalici te centrifugirano 5 min na 11 000 rpm-a (bez hlađenja). Automatskom pipetom je potom u novu epruvetu preneseno oko 3 ml gornje, vodene faze. Dodan je isti volumen kloroforma, smjesa je miješana na vibracijskoj miješalici oko 1 min te centrifugirana 5 min (11000 rpm-a, bez hlađenja). Vodena faza (4 ml) je prebačena u novu epruvetu te joj je dodano 640 µL 96%-tnog etanola tako da koncentracija istog u svakom uzorku bude 16%. Ovisno o izmjerenom volumenu vodene faze za pojedini uzorak, prilagođavan je volumen etanola tako da se osigura volumni udio od 16%. Sadržaj zatvorene epruvete promiješan je okretanjem nekoliko puta.

Uzorci su potom automatskom pipetom preneseni na unaprijed priređene kromatografske kolone. Adsorpcija na stupac osigurana je miješanjem na vibracijskoj miješalici 30 - 40 s, zatim centrifugiranjem 3 min (11000 rpm-a, bez hlađenja). Pažljivo je odliven supernatant.

Stupac celuloze je od pigmenata i ostalih nečistoća ispran dodatkom 5 ml 1xSTE-pufera koji sadrži 16% etanola, miješan na vibracijskoj miješalici 15 s, centrifugiran 3 min te je odbačen supernatant. Ispiranje je provođeno 3 puta kako bi se uklonili svi biljni pigmenti s kolone i što više potencijalnih kontaminirajućih tvari. Pri tome je boja stupca sa svakim

ispiranjem bila sve bliža bijeloj kao kod čiste celuloze.

Dvolančana RNA adsorbirana na celulozu eluirana je s kolone dodatkom 1 ml čistog hladnog 1XSTE-pufera; smjesa je snažno miješana na vibracijskoj miješalici 1 min te centrifugirana 7 min. Vodena faza je bačena, a postupak je ponovljen sa 3 ml STE pufera. Vodena faza je prebačena u čistu epruvetu od 12 ml.

Dvolančana RNA taložena je dodatkom 1/10 volumena Na-acetata i 3 volumena hladnog (-20°C) 96%-tnog etanola (9ml) pri -20°C minimalno 2 h.

Dvolančana RNA je nakon hlađenja sakupljena centrifugiranjem pri 4°C u trajanju od 30 min (11000 rpm-a). Supernatant je odliven; markerom je označen položaj taloga na dnu epruvete te su sve epruvete okrenute otvorom prema dolje na stalku kako bi se višak tekućine iscijedio na papir. Nakon 15-ak min epruvete su vraćene u položaj otvorom prema gore i ostavljene da etanol u potpunosti ispari. Tako osušen talog dvolančane RNA je otopljen u 50 µL vode za PCR, uz oprez da se resuspenzijom automatskom mikropipetom dobro ispere mjesto na kojem je talog bio, odnosno da se otopi sav raspoloživi talog. Ekstrakti su pohranjeni na led odnosno na -20°C ukoliko dalje analize nisu slijedile u istom danu, te analizirani elektroforezom.

3.2.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA ČISTOĆE UZORAKA

Na temelju elektroforetske analize izolirane dsRNA odabrano je 9 uzoraka (Tab. 16.) koji su podvrgnuti spektrofotometrijskoj analizi radi utvrđivanja čistoće i koncentracije nukleinskih kiselina. Analiza je provedena u uređaju *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, SAD).

Apsorbancija je mjerena pri valnim duljinama koje predstavljaju apsorpcijske maksimume za potencijalno prisutne molekule u uzorcima, a to su 260 nm (nukleinske kiseline), 280 nm (proteini) te 230 nm (kontaminacijske soli i fenol) (Brozović i sur. 2007). Na temelju dobivenih vrijednosti i njihovih omjera određeni su tip i koncentracija nukleinskih kiselina u uzorcima te je procijenjen stupanj njihove čistoće.

3.2.4. TRETMAN DNazom

Tretman DNazom primijenjen je na 9 odabranih uzoraka (Tab. 16.) kao dodatni purifikacijski korak s ciljem otklanjanja potencijalno prisutnih kontaminacijskih fragmenata DNA. Primijenjeni postupci temelje se na preporukama proizvođača enzima (Promega, SAD).

U volumen od 8 µl uzorka dodan je 1 µl pufera te 1 µl DNaze (1 U/µg). Smjesa je inkubirana 30 min na 37ºC. Potom je dodano 10 µl smjese fenola i kloroforma (1:1) te centrifugirano 15 min na 3000g uz hlađenje (4°C). Vodena faza je mikropipetom prebačenau novu epruvetu te je dodano 30 µl 96%-tnog etanola i 1 µl Na-acetata. Obrađeni uzorci pohranjeni su na -20ºC.

3.2.5. ELEKTROFORETSKA ANALIZA DVOLANČANE dsRNA i RT-PCR-PRODUKATA

Budući da su se u nekim slučajevima očekivale dsRNA endornavirusa koji imaju velike genome (9,8 – 17,6 kbp) bilo je potrebno provesti optimizaciju elektroforetske analize (Okada i sur. 2013, Okada i sur. 2011). Ekstrahirana dsRNA elektroforetski je analizirana na agaroznom i poliakrilamidnom gelu. U svrhu optimizacije postupka provedeno je nekoliko elektroforeza na oba tipa gela u različitim elektroforetskim uvjetima (gustoća gela, napon, trajanje).

3.2.5.1. Elektroforeza na agaroznom gelu

Postupak pripreme agaroznog gela

<u>0,8%-tna agaroza u 1xTAE-puferu, za 30 ml gela</u>

U 30 ml pufera dodano je 240 mg agaroze i promiješano; smjesa je zagrijavana u mikrovalnoj pećnici (oko 2 min) dok se sve čestice agaroze nisu otopile, a otopina postala

bistra. Nakon što se otopina malo ohladila, dopunjena je deioniziranom vodom do početnog volumena i dodatno ohlađena pod mlazom vode. Gel je izliven u prethodno pripremljeni nosač za izlijevanje (10cm x 7 cm) uz oprez da u gelu ne zaostanu mjehurići zraka koji bi narušili pravilno kretanje molekula kroz gel. Istovjetan postupak primjenjivan je i za pripremu ostalih agaroznih gelova uz varijacije u postotku agaroze (0,4%-tna, 1%, 1,2% agaroza u 1xTAE-puferu).

Priprema uzoraka za nanošenje na gel

Uzorci su izvađeni iz leda, otopljeni i centrifugirani. Na komadu parafilma resuspendirano je 2 µL boje za nanošenje s određenim volumenom svakog uzorka (Tab. 1.). Kao marker je korišten HR-marker, po 5 µL na svakome gelu. Agarozni gelovi bojani su u etidij-bromidu (5 mg/ml, 10 min), odbojavani u vodi te promatrani na UV-transiluminatoru i fotografirani.

Optimizacija uvjeta elektroforeze

Uzorci su testirani na različitim tipovima gelova, i u različitim uvjetima u inačicama navedenima u Tablici 1:

Tablica 1. Uvjeti provođenja optimizacijskih elektroforeza na agaroznom gelu.

Inačice elektroforeze	1.	2.	3.
Gustoća gela (% agaroze)	0,8	0,4	0,8
Volumen uzorka (µL)	10	10	5
Napon (V)	90	30	60
Trajanje (h)	2	1,5	1,5

3.2.5.2. Poliakrilamidna gel-elektroforeza (PAGE)

Za analizu izolirane dsRNA metodom PAGE pripremljen je 6%-tni poliakrilamidni gel u 1xTAE-puferu prema receptu (Tab. 2.) miješanjem sastojaka na magnetskoj miješalici. TEMED kao katalizator polimerizacije dodan je posljednji. Volumen od 20 ml dostajao je za 2 gela dimenzija 10,1 x 7,3 cm, debljine 1,0 mm. Smjesa je izlivena u pripremljene nosače (*Mini Protean Tetra Cell*, BioRad, SAD) i ostavljena oko pola h da polimerizira.

Tablica 2. Sastav smjese za 6 %-tni poliakrilamidni gel u 1xTAE-puferu (dostatno za 2 gela).

Sastojak	**Volumen**
H_2O (ml)	13,648
10xTAE-pufer (ml)	2
AA + BIS (29:1) (ml)	4
10 % APS (µL)	320
TEMED, konc. (µL)	32
Ukupni volumen (ml)	**20**

Uzorci su otopljeni i centrifugirani, na parafilmu resuspendirani s po 2 µL boje te naneseni na pripremljeni gel.

Provedene su dvije optimizacijske elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u sljedećim uvjetima: 110 V, 1 h, 7 µL uzorka te 110 V, 1,5 h, 10 µL uzorka. Druga kombinacija uvjeta bila je prikladnija te je primijenjivana u narednim eksperimentalnim postupcima.

3.2.6. UMNAŽANJE VIRUSNIH SEKVENCI REVERZNOM TRANSKRIPCIJOM I LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE

Dijelove genoma virusa potencijalno prisutnih u uzorcima izolirane dsRNA pokušalo se umnožiti metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR). Sintezu komplementarne DNA (cDNA) i njezino umnožavanje provodilo se uz pomoć početnica različite specifičnosti (Tab. 3.) u dva koraka: denaturacija dsRNA kalupa uz prisutnost r-početnice i sinteza cDNA te umnožavanje cDNA.

Tablica 3. Karakteristike parova početnica korištenih u identifikaciji različitih biljnih virusa (RdRp – RNA-ovisna RNA-polimeraza).

Naziv početnice	**Sekvenca 5′- 3′**	**Duljina amplikona (bp)**	**Dio genoma**	**Izvor**
CMV RNA 2-R CMV RNA 2-F	GAGCGGTCACAAGAGAGTAG GGAAATCACACCACCACTTA	634	2a protein (podjedinica RdRp)	Gal-On i sur. 1998
M4T-R Sprimer-F	GTTTTCCCAGTCACGAC(T) GGXAAYAAYAGYGGXCAZCC (X=A, G, C ili T, Y=T ili C, Z=A ili G)	*c*. 1700	RdRp	Chen i sur. 2001
Dbcmv Ubcmv	ACCACGCTGCAGCTAAAGAGAACA AATCTAGATGATATCATACTCTCTA	1456	protein kapside	Xu i Hampton 1996
Endor-R Endor-F	CTAGWGCKGTBGTAGCTTGWCC AAGSGAGAATWATHGTRTGGCA	381	RdRp	Okada i sur. 2011

Sastojci za reakcijske smjese su prije upotrebe kratko promiješani i držani na ledu. Završne smjese su prije inkubacije kratko promiješane i centrifugirane u stolnoj mikrocentrifugi. Sastavi reakcijskih smjesa i uvjeti u kojima su se odvijali enzimski procesi su varirani ovisno o ciljanom virusu i uspješnosti prethodnih reakcija u pokušaju da se dobije što bolji rezultat (prikazano niže u tekstu). Reakcije su se odvijale u uređaju *GeneAMP® 2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, SAD). Prilagodbe su provođene na temelju preporuka proizvođača enzima te protokola opisanih u značajnim radovima (Gal-On i sur. 1998, Okada i sur. 2013, Okada i sur. 2011, Xu i Hampton 1996), ukoliko su bile potrebne.

3.2.6.1. Reverzna transkripcija

Procesu reverzne transkripcije prethodila je denaturacija dsRNA kalupa uz prisutnost r-početnice. Za pripremu RT-reakcije je u epruvete za PCR dodan odgovarajući volumen RNA-kalupa (Tab. 4.) i reakcijske smjese za sintezu cDNA (Tab. 5.). Smjesa za kalup je prethodno inkubirana 5 min na 70ºC (80ºC za TuMV) i potom brzo ohlađena na ledu. Smjesa za sintezu cDNA CMV-a i BCMV-a je inkubirana 60 min na 42ºC, za sintezu TuMV-a 45 min na 42ºC te 5 min na 95ºC, a smjesa za sintezu cDNA endornavirusa 45 min na 42ºC te 2 min na 94ºC.

Tablica 4. Sastavi smjesa za denaturaciju dsRNA-kalupa prije reverznog prepisivanja s početnicama za CMV, BCMV, TuMV i endornaviruse.

Sastojak	Volumen (µL)			
	CMV	**BCMV**	**TuMV**	**Endorna**
Ekstrakt dsRNA	3	0,6	2	3
R-početnica	3,136	3,316	-	3,3
Sterilna deH_2O	7,864	10,264	-	7,7
Ukupno	**14**	**14,2**	**2**	**14**

Tablica 5. Sastavi reakcijskih smjesa za sintezu cDNA uz reverzne početnice za CMV, BCMV, TuMV i endornaviruse (za 1 uzorak).

Sastojak	Volumen (µL)			
	CMV	**BCMV**	**TuMV**	**Endorna**
dsRNA kalup	14	14,2	2	14
Sterilna deH_2O	-	-	7	-
5x M-MLV reakcijski pufer (bez $MgCl_2$)	5	5	2	2,5
$MgCl_2$ (25 mM)	3	3	3	3
dNTP (10 mM)	5	5	2	4
M4T/R-početnica	-	-	2	-
Inhibitor RNaze	-	-	1	0,5
MuLV reverzna transkriptaza	1	1	1	1
Ukupno	**28**	**28,2**	**20**	**25**

3.2.6.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Nakon RT-reakcije, 1 µL otopine cDNA je novim epruvetama dodan reakcijskoj smjesi za PCR (Tab. 6.) Uvjeti umnožavanja cDNA prikazani su u Tablici 7. Procesi denaturacije, vezanje početnica i produljenja lanaca odvijali su se kroz 35 ciklusa za CMV i BCMV, kroz 30 ciklusa za TuMV, te kroz 40 ciklusa za endornaviruse. Na kraju reakcije produkti su ohlađeni na 4ºC te analizirani elektroforezom na 1,2%-tnom agaroznom gelu u 1xTAE-puferu uglavnom u trajanju od 1h (11V/cm).

Tablica 6. Sastavi reakcijskih smjesa za PCR-umnažanje cDNA dobivene reverznim prepisivanjem s početnicama za CMV, BCMV, TuMV i endornaviruse (za 1 uzorak).

Sastojak	**Volumen (µL)**			
	CMV	**BCMV**	**TuMV**	**Endorna**
Sterilna deH_2O	14,7	14,7	10	14,3
10x *GoTaq Flexy* pufer (bez $MgCl_2$)	2	2	4	5
$MgCl_2$ (25 mM)	1,6	1,6	1,25	3
dNTP (10 mM)	0,4	0,4	0,5	0,4
R-početnica	0,5	0,5	1	0,5
F-početnica	0,6	0,6	1	0,6
GoTaq-polimeraza	0,2	0,2	0,25	1
Ukupno	**20**	**20**	**18**	**24**

Tablica 7. Uvjeti PCR-umnažanja cDNA dobivene reverznim prepisivanjem uz početnice za CMV, BCMV, TuMV i endornaviruse.

Dio ciklusa	CMV	BCMV	TuMV	Endorna
Početna denaturacija	95º 2 min	95º 2 min	94º 2 min	94º 2 min
Denaturacija	95º 30 s	95º 30 s	94º 30 s	94º 1 min
Vezanje početnica	56º 1 min	53º 1 min	47º 50 s	50º 45 s
Produljenje lanaca	72º 2 min	72º 2 min	72º 1 min	70º 45 s
Završno produljenje	72º 10 min	72º 10 min	72º 5 min	70º 5 min
Broj ciklusa: denaturacija – vezanje početnica – produljenje lanaca	**35**	**35**	**30**	**40**

Kao pozitivna kontrola za CMV i TuMV korišteni su uzorci dsRNA ranije izolirane iz inficiranog biljnog tkiva, koje je u slučaju TuMV-a bilo starije i neprovjerene kvalitete. Za BCMV je korištena dsRNA iz biljnog tkiva sa simptomima koji su nalikovali na infekciju tim virusom, ali to nije bilo i potvrđeno. Kontrolni uzorak za endornaviruse također nije provjereno sadržavao virusnu dsRNA, već je odabran na temelju literaturnih podataka koji upućuju na visoku incidenciju endornavirusa u paprici baburi (Okada i sur. 2011). Kao negativna kontrola služila je sterilna voda bez kalupa i uzorci sezama u nekim skupinama uzoraka.

3.2.7. SEKVENCIRANJE I ANALIZA PRODUKATA RT-PCR REAKCIJE

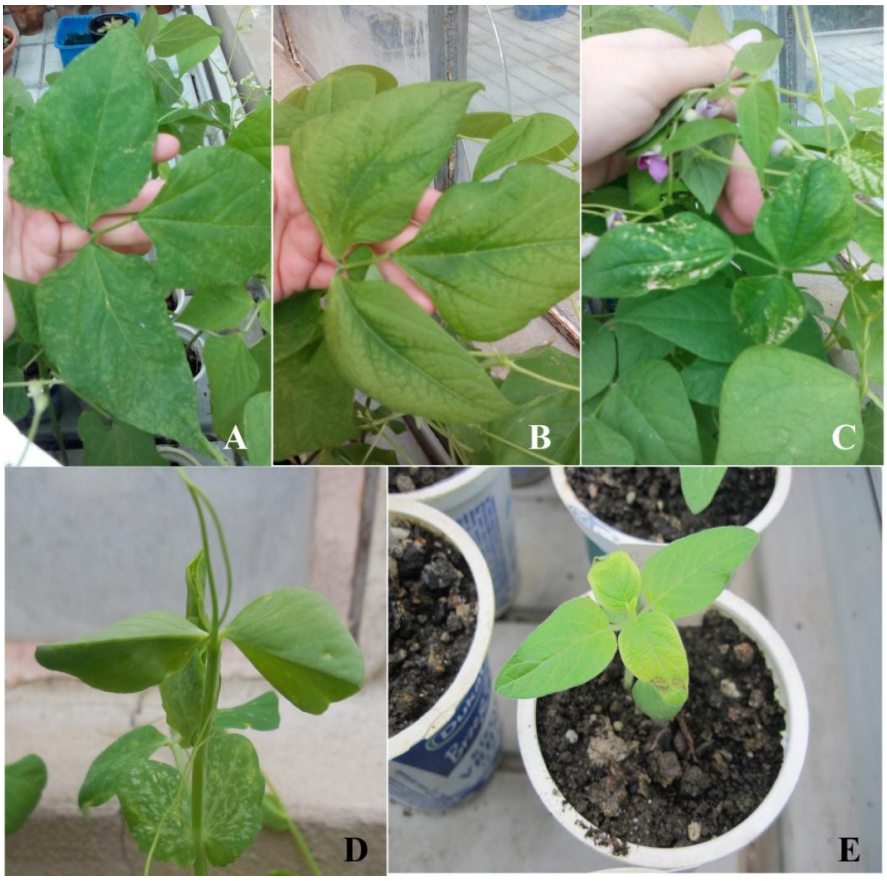
Na temelju elektroforetske analize RT-PCR produkata odabranisu uzorci s potencijalno prisutnim virusnim amplikonima te poslani u tvrtku Macrogen Inc. (Seul, J. Koreja) gdje je obavljeno standardno sekvenciranje. Sekvence su uređene (SequencherTM 5.4.3., http://www.genecodes.com/), a njihov identitet provjeren programom BLAST (Altschul i sur. 1990).

4. REZULTATI

4.1. FENOTIPSKE PROMJENE NA BILJKAMA

Za potrebe ovog istraživanja uzgojeno je 5 vrsta biljaka (ukupno 12 kultivara) iz komercijalno dostupnog sjemena (Tab. 13). Njihov rast je praćen do faze razvoja generativnih organa te su bilježene fenotipske promjene koje uobičajeno mogu odražavati određenu vrstu infekcije biljnim virusima.

Klijavost se za različite kultivare kretala između 40% i 100% (Tab. 8., Tab. 9., Tab. 10., Tab. 11., Tab. 12) te je u konačnici uspjelo 190 biljaka. Jedinke svih kultivara su općenito govoreći izgledale zdravo, tj. bile su uglavnom bez znakova sustavnih oboljenja te bez vanjskih nametnika. Ipak, na dijelu jedinki svih kultivara se mogla uočiti lokalna pojava različitih promjena koje su nalikovale na virusne simptome. Na lišću nekoliko jedinki kultivara graha (Sl. 2. A, B, C) javile su se mozaične promjene te nekrotične točke i područja, kao i na nekim listovima boba. Lišće graška djelomično je razvilo kloroze oko žila (Sl. 2. D). Na jedinkama slanutka se mogao uočiti poneki požutjeli i savijeni list, a među jedinkama sezama se javljao sporiji rast i sušenje rubnih dijelova listova (Sl. 2. E).



Slika 2. Fenotipske promjene na uzgojenim mahunarkama koje mogu upućivati na prisutnost virusa: A, B - mozaične promjene na listovima jedinki graha (*P. vulgaris*); C – nekrotične promjene na listovima jedinki graha; D – klorotične pojave na jedinkama graška (*P. sativum*); E – žutilo i sušenje rubnih dijelova listova sezama (*S. indicum*).

Tablica 8. Karakteristike korištenih kultivara graha (*Phaseolus vulgaris* L.).

***Phaseolus vulgaris* L. (Fabaceae)**				
Naziv i/ili fenotip kultivara	`Starozagorski E`, patuljasta mahuna	`Merveille de Piemonte`; niski mahunar	`Zelenčec`	visoka mahuna `puter`, žuta
Laboratorijska oznaka	PV 1	PV 2	PV 3	PV4
Podaci o podrijetlu proizvodnji	proizvodi Impex s.r.I. Sementi, PD, Italy; uvozi AgroBonus	proizvodi Impex s.r.I. Sementi, PD, Italy; uvozi AgroBonus	Domaće, Ivan Radosavljević; okolica Bjelovara	Domaće, Ivan Radosavljević; okolica Bjelovara
Službeni podaci o klijavosti i tretmanu	klijavost 89%; tretirano s Thiram 50	klijavost 92%; tretirano s Thiram 50	-	-
Dobiveni podaci o klijavosti	100 %	95 %	80 %	75%

Tablica 9. Karakteristike korištenih kultivara graška (*Pisum sativum* L.).

***Pisum sativum* L. (Fabaceae)**				
Naziv i/ili fenotip kultivara	`American wonder`	`Kelvedon wonder`	`Telefon`; penjačica, kasni	`Piccolo Provenzale`; niski , rani
Laboratorijska oznaka	PS 1	PS 2	PS 3	PS 4
Podaci o proizvodnji	Sjemenar d.o.o., proizvodnja Semenarna Coop, Petrovaradin, Srbija	niski; Impex s.r.I Sementi; uvozi AgroBonus	Franchi Sementi, Grassobbio (BG), Diba - Charm	Franchi Sementi, Grassobbio (BG), Diba – Charm
Službeni podaci o klijavosti i tretmanu	netretirano sjeme	klijavost 83%; tretirano s Thiram 50	netretirano sjeme, standard; klijavost 90%	netretirano sjeme, standard; klijavost 100%
Dobiveni podaci o klijavosti	60 %	75 %	70 %	85 %

Tablica 10. Karakteristike korištenih kultivara boba (*Vicia faba* L.).

***Vicia faba* L. (Fabaceae)**		
Naziv kultivara	`Superaguadulce`	`Aguadulce`
Laboratorijska oznaka	VF 1	VF 2
Podaci o proizvodnji	proizvodnja Impex s.r.I. Sementi, Padova, IT; uvozi AgroBonus	Franchi Sementi; uvozi Diba – Charm
Službeni podaci o klijavosti i tretmanu	klijavost 87 %; tretirano s TMTD 50, Classe III (Thiram 50)	Klijavost 80 %
Dobiveni podaci o klijavosti	90 %	80 %

Tablica 11. Karakteristike korištenih kultivara slanutka (*Cicer arietinum* L.).

***Cicer arietinum* L. (Fabaceae)**	
Laboratorijska oznaka	CA
Podaci o podrijetlu i proizvodnji	konzumni; proizvedeno u Kanadi
Službeni podaci o klijavosti i tretmanu	netretiran
Dobiveni podaci o klijavosti	40 %

Tablica 12. Karakteristike korištenih kultivara sezama, paprike babure i čili papričice.

Vrsta	**Sezam (*Sesamum indicum* L.)**	**Paprika babura (*Capsicum annuum* L.)**	**Čili papričica (*Capsicum annuum* L.)**
Naziv kultivara ili fenotip kultivara	Konzumni bijeli	Nepoznato	'Peruvian Purple'
Laboratorijska oznaka	SI	Ca1	Ca2
Podaci o podrijetlu i proizvodnji	Uganda; Alnatura, DM	Domaće, Svjetlana Šitina, Ivanić Grad	Materijal koji se koristi u praktikumu iz kolegija Hortikultura (ljubaznošću doc. dr. sc. R. Šoštarić)
Službeni podaci o klijavosti i tretmanu	Eko uzgoj, netretirano sjeme	Eko uzgoj, netretirano	Netretirano
Dobiveni podaci o klijavosti	100 %	80%	90%

4.2. ELEKTROFORETSKA ANALIZA EKSTRAKATA dsRNA

Metodom ekstrakcije dsRNA obrađeno je tkivo 180 biljaka te je dobiveno ukupno 118 uzoraka, od kojih 95 uzoraka dsRNA eksperimentalnih biljaka, 13 kontrolnih uzoraka dsRNA iz biljaka potencijalno ili provjereno zaraženih različitim virusima (Tab. 12., Tab. 14, Tab.

15.), 1 uzorak nezaraženog tkiva *N. megalosiphon* (Tab. 15) te 9 uzoraka obrađenih DNazom (Tab. 16.).

Tablica 13. Pregled izoliranih uzoraka dsRNA prema vrstama i kultivarima mahunarki te podaci o provedenim RT-PCR detekcijama uz početnice za CMV, TuMV, BCMV i endornaviruse (Ev).

Laboratorijske oznake pojedinačnih biljaka u uzorcima	**Laboratorijska oznaka ekstrakta dsRNA**	**Proveden RT-PCR s početnicama za detekciju virusa**				**Prisutnost amplikona**
		CMV	TuMV	BCMV	*Ev*	
***Phaseolus vulgaris* L. (PV)**						
PV1						
1,2	27	+		+	+	NE
3,4	28					
5,6	29	+		+		
7,8	30					
9,10	31					
11,12	32					
13,14	33					
15,16	34	+		+		
17,19	35					
20	36					
PV2						
1,2	1	+		+	+	NE
3,4	2			+		
5,6	3					
8,9	4	+		+		

Tablica 13. Pregled izoliranih uzoraka dsRNA prema vrstama i kultivarima mahunarki te podaci o provedenim RT-PCR detekcijama uz početnice za CMV, TuMV, BCMV i endornaviruse (Ev).

Laboratorijske oznake pojedinačnih biljaka u uzorcima	**Laboratorijska oznaka ekstrakta dsRNA**	**Proveden RT-PCR s početnicama za detekciju virusa**				**Prisutnost amplikona**
		CMV	TuMV	BCMV	*Ev*	
***Phaseolus vulgaris* L. (PV)**						
PV2						
10,11	5					NE
12,13	6					
14,15	7	+		+	+	
16,17	8					
18,19	9					
20	10				+	
PV3						
1,2	13	+		+		NE
3,4	14	+		+	+	
5,7	15					
8,9	16					
11,12	17	+		+		
13,15	18					
16,17	25					
18,19	26					
PV4						
1,2	11	+		+	+	NE
3,5	12					
6,7	19					
9,12	20	+		+		

Tablica 13. Pregled izoliranih uzoraka dsRNA prema vrstama i kultivarima mahunarki te podaci o provedenim RT-PCR detekcijama uz početnice za CMV, TuMV, BCMV i endornaviruse (Ev).

Laboratorijske oznake pojedinačnih biljaka u uzorcima	**Laboratorijska oznaka ekstrakta dsRNA**	**Proveden RT-PCR s početnicama za detekciju virusa**				**Prisutnost amplikona**
		CMV	TuMV	BCMV	*Ev*	
***Phaseolus vulgaris* L. (PV)**						
PV4						
13,14	21					NE
15,17	22					
18,19	23	+		+		
20	24					
***Pisum sativum* L. (PS)**						
PS1						
1,3	66					NE
5,6	67					
7,9	68	'+		+		
10,13	69					
15,18	70					
20	71	+		+	+	
PS2						
2,3	56	+		+		NE
4,5	57					
6,7	58					
9,10	59	+		+	+	
12,13	60					
14,15	63					
17,18	64					

Tablica 13. Pregled izoliranih uzoraka dsRNA prema vrstama i kultivarima mahunarki te podaci o provedenim RT-PCR detekcijama uz početnice za CMV, TuMV, BCMV i endornaviruse (Ev).

Laboratorijske oznake pojedinačnih biljaka u uzorcima	**Laboratorijska oznaka ekstrakta dsRNA**	**Proveden RT-PCR s početnicama za detekciju virusa**				**Prisutnost amplikona**
		CMV	TuMV	BCMV	*Ev*	
***Pisum sativum* L. (PS)**						
PS2						
20	65					NE
PS3						
2,6	47	+		+		NE
7,8	48					
9,11	51					
13,14	52	+		+		
16,17	53					
18,19	54					
20	55	+		+		
PS4						
1,2	37	+		+		NE
3,5	38					
6,7	39					
9,10	40					
11,12	41					
13,15	42					
16,17	44	+		+		
18,19	45	+		+		
20	46					

Tablica 13. Pregled izoliranih uzoraka dsRNA prema vrstama i kultivarima mahunarki te podaci o provedenim RT-PCR detekcijama uz početnice za CMV, TuMV, BCMV i endornaviruse (Ev).

Laboratorijske oznake pojedinačnih biljaka u uzorcima	**Laboratorijska oznaka ekstrakta dsRNA**	**Proveden RT-PCR s početnicama za detekciju virusa**				**Prisutnost amplikona**
		CMV	TuMV	BCMV	*Ev*	
***Cicer arietinum* L. (CA)**						
2, 5	72	+				NE
6, 8	73	+		+		
10, 19	74					
***Vicia faba* L. (VF)**						
VF1						
1,2	92	+		+	+	NE
3,4	93					
5,6	94	+		+	+	
8,9	95					
10,11	96	+		+		
13,14	97					
16,17	98			+		
18,19	99					
20	100					
VF2						
1,2	84					NE
3,4	85	+		+		
5,6	86					
7,8	87					
9,11	88	+		+		
16,17	89					

Tablica 13. Pregled izoliranih uzoraka dsRNA prema vrstama i kultivarima mahunarki te podaci o provedenim RT-PCR detekcijama uz početnice za CMV, TuMV, BCMV i endornaviruse (Ev).

Laboratorijske oznake pojedinačnih biljaka u uzorcima	**Laboratorijska oznaka ekstrakta dsRNA**	**Proveden RT-PCR s početnicama za detekciju virusa**				**Prisutnost amplikona**
		CMV	TuMV	BCMV	*Ev*	
***Vicia faba* L. (VF)**						
VF2						
18,19	90			+		NE
20	91					
***Sesamum indicum* L. (SI)**						
2,3	75					NE
5,6	76	+		+		
7,8	77					
9,10	78					
11,12	79					
13,14	80					
15,17	81					
18,19	82					
20	83					

Tablica 14. Pregled kontrolnih uzoraka izoliranih iz zaraženih biljaka te provedenih RT-PCR detekcija virusne dsRNA uz prisutnost početnica za CMV, TuMV, BCMV i endornaviruse.

Laboratorijska oznaka (broj ekstrakta)	Naziv patogena i opis biljnog tkiva koje zaražava	Proveden RT-PCR s početnicama za detekciju virusa				Prisutnost amplikona
		CMV	TuMV	BCMV	Endorn avirusi	
49	*Cucumber mosaic virus* (CMV) bez satelita iz rajčice	+				NE
50	CMV sa satelitom iz rajčice	+		+		**DA**
61	*Turnip mosaic virus* (TuMV) iz cvjetova *Mathiola incana*	+	+			NE
62	TuMV iz listova *Mathiola incana*		+			
101	*Citrus tristeza virus* (CTV) iz kore i vršnog tkiva mladica *Citrus wilsonii*			+		
102	CTV iz kore i vršnog tkiva mladica *Citrus wilsonii*					

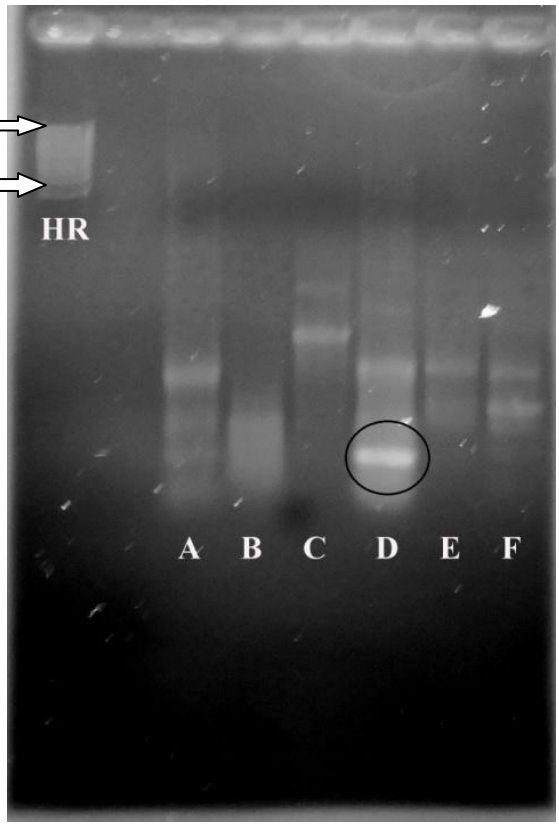
Tablica 15. Kontrolni uzorci dsRNA korišteni u optimizacijama elektroforeze.

Laboratorijska oznaka uzorka	Naziv patogena i opis biljnog tkiva iz kojeg je izolirana dsRNA
A	*Citrus tristeza virus* (CTV) – kora i vršno tkivo mladica *Citrus wilsonii*
B	*Turnip mosaic virus* (TuMV) – smrznuti materijal, *Matthiola incana*
C	*Tobacco mosaic virus* (TMV) – svježi listovi *Nicotiana megalosiphon*
D	*Cucumber mosaic virus* (CMV) sa satelitom – svježi listovi *Nicotiana megalosiphon*
E	Nezaražena *N. megalosiphon*
F	viroidi CbVd-1 i 3 – svježi listovi *Coleus blumei*

Tablica 16. Pregled uzoraka dsRNA kontrolnih i eksperimentalnih biljaka tretiranih DNAzom; redoslijed uzoraka u Tablici jednak je onom na agaroznom gelu na Slici 6.

Broj uzroka	Opis i/ili oznaka biljnog tkiva iz kojeg potječe dsRNA
101	kora i vršno tkivo mladica *Citrus wilsonii*, *Citrus tristeza virus* (CTV)-zaraza
61	cvjetovi *Mathiola incana*, *Turnip mosaic virus* (TuMV)-zaraza
49	rajčica, *Cucumber mosaic virus*-zaraza (CMV, bez satelita)
50	rajčica, *Cucumber mosaic virus*-zaraza (CMV, sa satelitom)
1	PV1 (*P. vulgaris*, kultivar 1)
38	PS4 (*P. sativum*, kultivar 4)
72	CA (*C. arietinum*)
80	SI (*S. indicum*)
93	VF1 (*V. faba*, kultivar 1)

Svi uzorci su elektroforetski analizirani na 6% poliakrilamidom gelu (10 µL uzorka, 110 V, 1,5 h). Uzorci dsRNA kontrolnih virusa (Tab. 15.) korišteni su tijekom optimizacije elektroforeze na agaroznom gelu, na kojem je obrađen i dio eksperimentalnih uzoraka. Elektroforeza na agaroznom gelu nije dala zadovoljavajuće rezultate (Sl. 3.) te je analiza ekstrakata nastavljena isključivo na poliakrilamidnom gelu (Sl. 4., Sl. 5.) u pokušaju da se dobije veća čistoća i bolje razlučenje komponenti u uzorku.

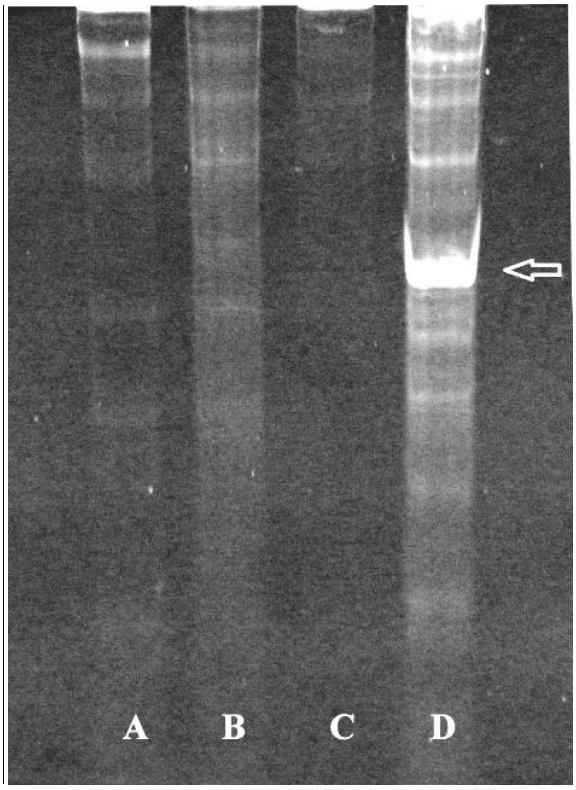


Slika 3. Uzorci dsRNA kontrolnih biljaka (slovima A-F označene laboratorijske oznake uzoraka opisanih u Tablici 15., str. 38) analizirani na 0,8%-tnom agaroznom gelu. Strelicama su označeni položaji najdužeg i najkraćeg fragmenta *High Range* (HR) DNA markera (Thermo Fisher Scientific, SAD i iznose 48502 pb i 10171 pb. Krug označava položaj satRNA veličine između 330 i 400 pb.

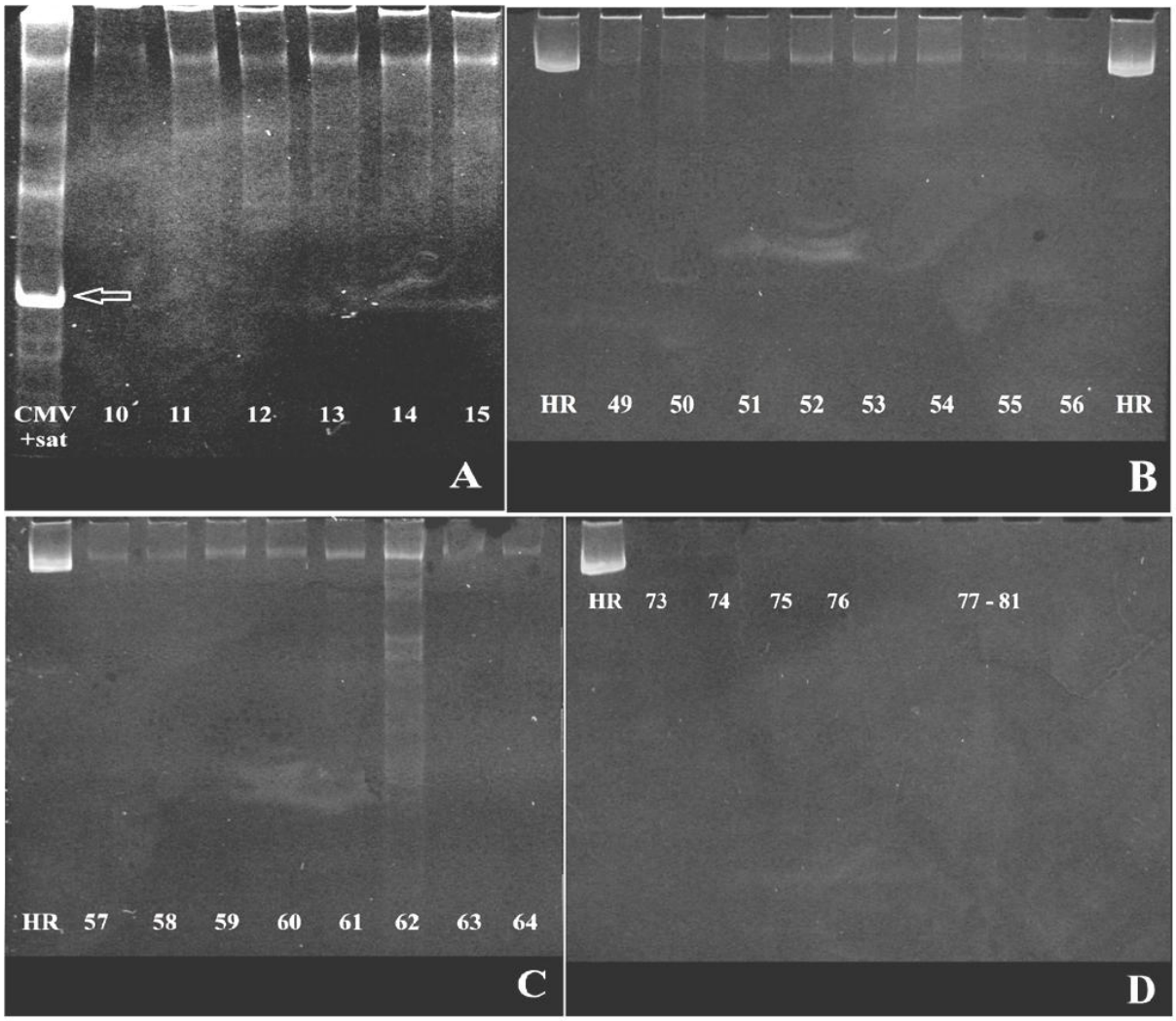
U elektroforezama na poliakrilamidnom gelu korišten je raspoloživi DNA marker HR s fragmentima većima od 10 kbp. Fragmenti markera nisu adekvano razdvojeni (Sl. 5.) te je to stavka koja otežava donošenje hipoteza o kvanitativnim obilježjima fragmenata koji su se vidljivi kao pruge u gelu. Izuzev ekstrakata dsRNA iz sezama i slanutka (Sl. 5. D), većina uzoraka je dala vrlo sličan elektroforetski profil (Sl. 5. A, B,C), koji obilježava dosljedna pojava isključivo visokopozicioniranog fragmenta dsRNA.

Tretman DNazom proveden je kako bi se u odabranom setu uzoraka isključila odnosno potvrdila prisutnost kontaminacijske DNA. Usporedba elektroforetskog profila uzoraka prije i poslije digestije pokazuje veliku promjenu: ranije prisutne elektroforetske pruge se, osim u uzorku graha (br. 1) nakon tretmana nisu pojavile (Sl. 6.). Analiza uzoraka sezama i slanutka (u većini uzoraka) nije pokazala da su u uzorcima prisutne nukleinske kiseline u detektabilnim količinama. Poznato je da se s tikvima nekih biljnih vrsta teže manipulira tijekom ekstrakcije

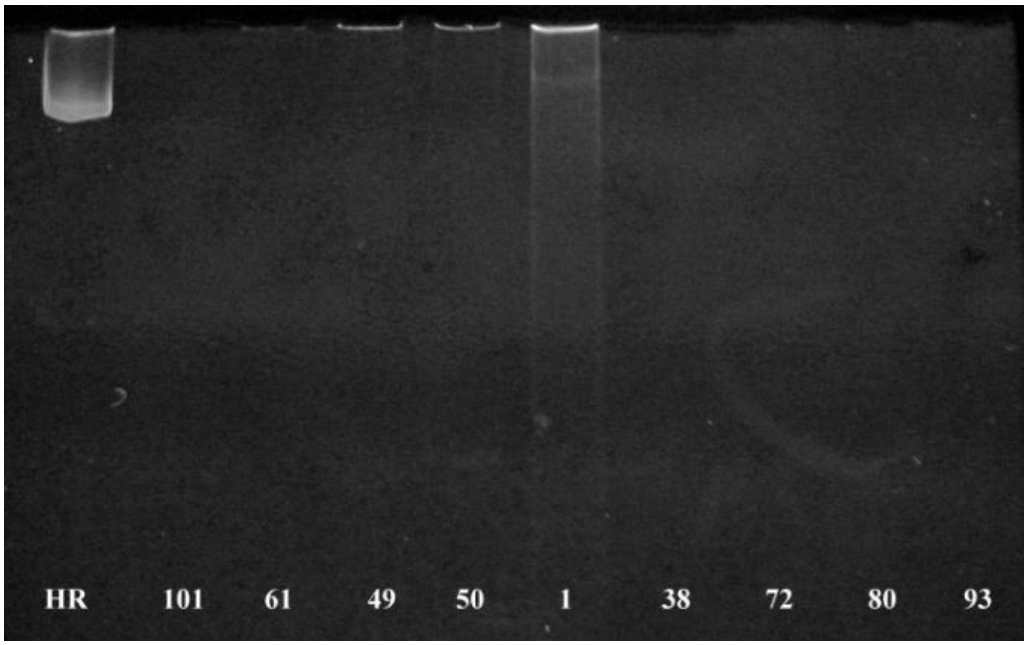
fenolom te uspješnost ekstrakcije može biti smanjena (Brozović i sur. 2007, Dodds 1993).



Slika 4. Uzorci dsRNA kontrolnih biljaka (slovima A-D označene laboratorijske oznake uzoraka opisanih u Tablici 15., str. 38) analizirani na 6%-tnom poliakrilamidnom gelu. Strelica označava položaj satRNA veličine između 330 i 400 pb.



Slika 5. Prikaz reprezentativnih rezultata elektroforetske analize uzoraka dsRNA (označeni brojevima) izoliranih iz mahunarki i sezama (Tab. 13.) te kontrolnih biljaka (Tab. 14.) na 6%-tnom poliakrilamidnom gelu. Kao markeri su korišteni dsRNA CMV-a sa satRNA iz uzorka br. 50 (A) i *High Range* (HR) DNA marker (Thermo Fisher Scientific, SAD) (B, C, D). Fragmenti HR-markera su neadekvatno razdvojeni. Uzorci redom po slikama s pripadajućim oznakama kultivara iz kojih potječu: **A** – **10** - *P. vulgaris*, kultivar 2 (PV2), **11-15** - *P. vulgaris*, kultivar 3 (PV3); **B** – **49** - CMV, **50** - CMV+satRNA, **51-55** - *P. sativum*, kultivar 3, (PS3), **56** - *P. sativum*, kultivar 2 (PS2); **C** – **57-60, 63, 64** – *P. sativum*, kultivar 2 (PS2), **61,62**- TuMV; **D** – **73,74** - *C. arietinum* (CA), **75-81**- *S. indicum* (SI)



Slika 6. Rezultat elektroforetske analize uzoraka dsRNA tretiranih DNAzom (brojevi predstavljaju laboratorijske oznake uzoraka opisanih u Tablici 16., str. 39) na 1,2% agaroznom gelu uz *High Range* (HR) DNA marker (Thermo Fisher Scientific, SAD). Duljine najkraćeg i najdužeg fragmenta iznose 48502 pb i 10171 pb. Fragmenti HR-markera su neadekvatno razdvojeni.

4.3. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA

Numerički rezultati spektrofotometrijske analize prikazani su u Tablici 17. Uspješnost ekstrakcije (koncentracija nukleinske kiseline) različito se kreće između testiranih uzoraka, kao i čistoća izolirane RNA.

Tablica 17. Rezultati spektrofotometrijske analize 9 ekstrakata dsRNA. Testirani uzorci prikazani su i opisani u Tablici 16.

Broj uzorka	Konc. nukeinskih kiselina (ng/µl)	A260	A280	260/280*	260/230	Faktor	Tip nukleinske kiseline
101	5,3	0,132	0,066	1,99	0,75	40,00	RNA
61	-3,4	-0,086	-0,078	1,10	0,43	40,00	RNA
49	10,5	0,262	0,083	3,16	7,91	40,00	RNA

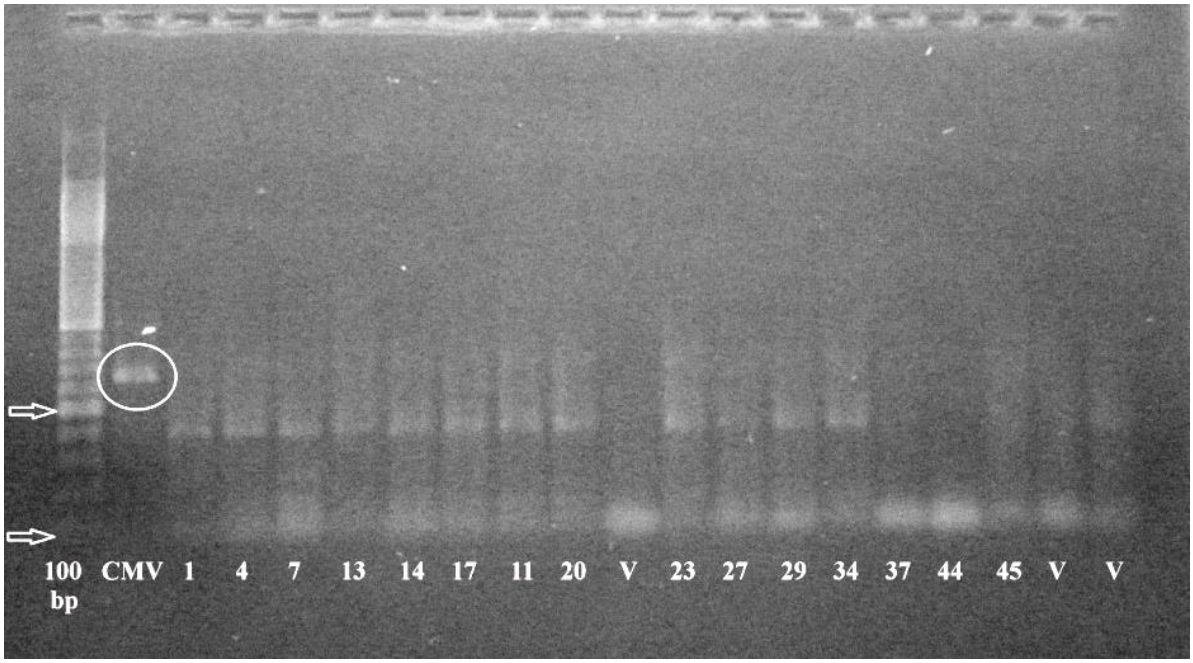
Tablica 17. Rezultati spektrofotometrijske analize 9 ekstrakata dsRNA. Testirani uzorci prikazani su i opisani u Tablici 16.

Broj uzorka	Konc. nukeinskih kiselina (ng/µl)	A260	A280	260/280*	260/230	Faktor	Tip nukleinske kiseline
50	11,7	0,293	0,122	2,40	0,64	40,00	RNA
1	117,4	2,936	1,385	2,12	1,55	40,00	RNA
38	3,8	0,094	0,052	1,81	0,49	40,00	RNA
72	-2,8	-0,071	-0,063	1,12	-4,39	40,00	RNA
80	-10,0	-0,249	-0,156	1,59	0,99	40,00	RNA
93	-3,1	-0,077	-0,075	1,03	0,80	40,00	RNA

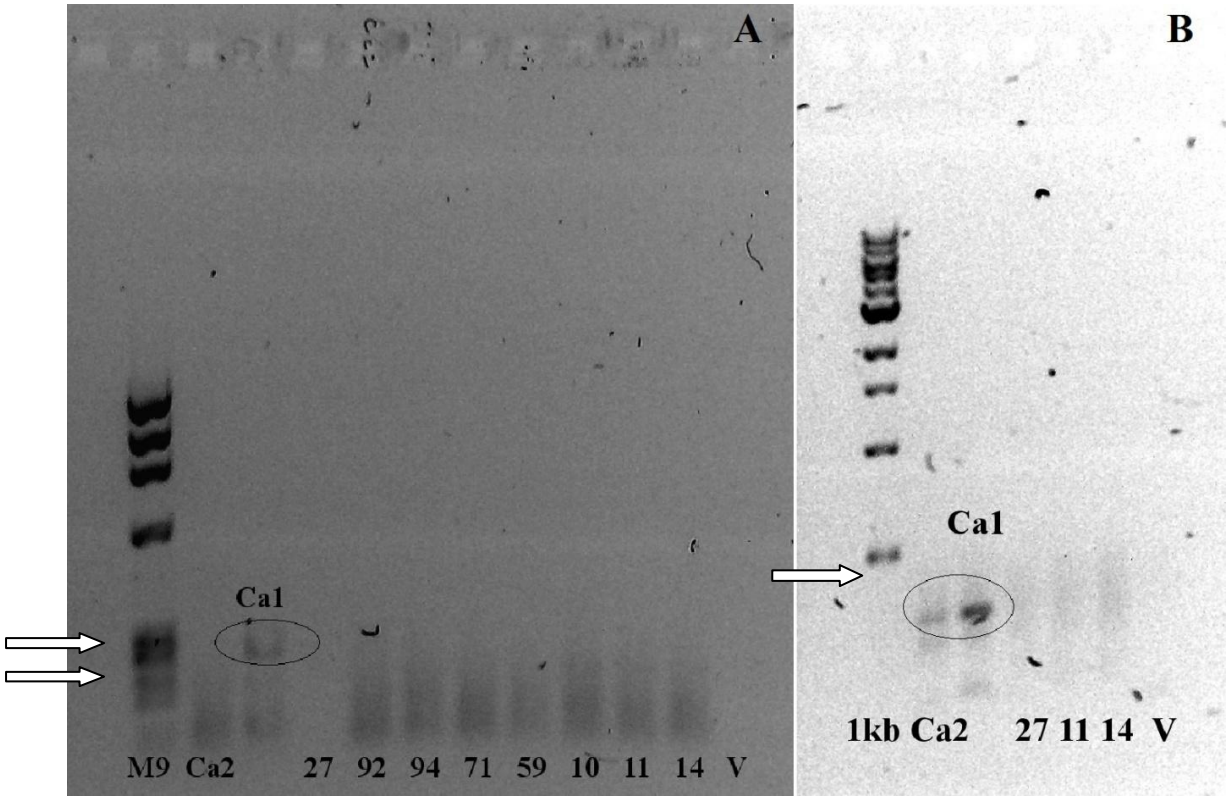
*A260/280 se za čistu dsDNA kreće se između 1,8, i 2,0, a čistu RNA između 1,6 i 1,9

4.4. ELEKTROFORETSKA ANALIZA PRODUKATA RT-PCR REAKCIJE

Elektroforetske analize produkata RT-PCR reakcije nisu potvrdile prisutnost traženih virusa u odabranim uzorcima mahunarki i sezama (Sl. 7.). RT-PCR reakcija s početnicama za CMV dala je pozitivan rezultat u kontrolnom uzorku što znači da su reakcijski uvjeti bili ispravni, tj. mogli su i u dosad neistraženim uzorcima rezultirati amplifikacijom CMV-sekvenci. RT-PCR reakcija s početnicama za endornaviruse upućivala je na pozitivan rezultat u uzorcima čili papričice i paprike babure te su amplikoni sekvencirani (Sl. 8.).



Slika 7. Prikaz reprezentativnih rezultata elektroforetske analize (1,2% agarozni gel) produkata RT-PCR-a (označeni brojevima) uz prisutnost početnica za CMV-RNA2. Krug označava položaj virusnog amplikona u kontrolnom uzorku CMV-a sa satRNA. Strelice označavaju položaje dvaju fragmenata (100 i 500 pb) *100 base pairs* (100 bp) DNA markera (New England Biolabs, SAD). Voda za PCR kao negativna kontrola označena je oznakom „V“. Uzorci redom s pripadajućim oznakama kultivara iz kojih potječu: **1**, **4**, **7** – *P. vulgaris*, kultivar 2 (PV2); **13**, **14**, **17** – *P. vulgaris*, kultivar 3 (PV3); **11**, **20**, **23** – *P. vulgaris*, kultivar 4 (PV4); **27**, **29**, **34** – *P. vulgaris*, kultivar 1 (PV1); **37**, **44**, **45** – *P. sativum*, kultivar 4 (PS4). Prikazani uzorci su pod istim oznakama navedeni u Tablici 13.



Slika 8. Rezultati elektroforetske analize (1,2% agarozni gel) produkata RT-PCR-detekcije uz prisutnost početnica za endornaviruse. Uzorci su pod brojčanim oznakama s gelova navedeni u Tablici 13. Voda za PCR kao negativna kontrola označena je oznakom „V“. **A** - Krug označava položaj amplikona u kontrolnom uzorku paprike babure (**Ca1**). Strelice označavaju položaje dvaju fragmenata (310 i 281 pb) Markera 9 (M9, Thermo Fisher Scientific, SAD). Uzorak br. **27** (*P. vulgaris*, kultivar 1) je tijekom postupka izgubljen. Uzorci redom s pripadajućim oznakama kultivara iz kojih potječu: **92**, **94** – *V. faba*, kultivar 1 (VF1); **71** – *P. sativum*, kultivar 1, (PS1); **59** – *P. sativum*, kultivar 2 (PS2); **10** – *P. vulgaris*, kultivar 2, (PV2); **11** – *P. vulgaris*, kultivar 4 (PV4); **14** – *P. vulgaris*, kultivar 3 (PV3). **B** - Pozitivan rezultat ponovljene reakcije u uzorku Ca1 i **Ca2** (čili papričica). Strelica označava položaj fragmenta (500 pb) *1 kb* DNA markera (New England Biolabs, SAD).

4.5. REZULTATI SEKVENCIRANJA

Elektroforetska analiza RT-PCR produkata umnoženih uz pomoć početnica za endornaviruse u uzorcima Ca1 i Ca2 upućivala je na prisutnost fragmenta očekivane veličine (oko 380 pb). Na temelju analize sekvenci zaključeno je da analizirani fragmenti nisu potjecali od dsRNA genoma endornavirusa, već su nastali kao produkt nespecifične amplifikacije kontaminacijske DNA biljnog genoma.

5. RASPRAVA

Prenosivost sjemenom važna je značajka biljnih virusa koja često određuje pojavnost i raširenost zaraze i utječe na tip odnosa između virusa i domaćina. Jako varira unutar i između virusnih i domaćinskih vrsta pa o specifičnoj kombinaciji virus – domaćin ovisi relativna uloga prenosivosti sjemenom u epidemiologiji viroza (http://www.dpvweb.net/). Pošto efikasnost prijenosa sjemenom nije konstantna za pojedine vrste virusa već ovisi o nizu faktora, teže ju je kontrolirati i predvidjeti. Sjeme može biti izvor zaraze i na novim staništima i u biljnim vrstama za koje prenosivost još nije utvrđena.

Ovim sam radom htjela istražiti prenosivost važnih i raširenih patogenih i neidentificiranih „perzistentnih virusa“ sjemenom mahunarki koje je dostupno u slobodnoj prodaji. Jasno je da otkrivanje izvora zaraze u sjemenu i praćenje njenog podrijetla može dati vrijedne biološke i epidemiološke podatke te pridonijeti kontroli i kvaliteti biljnog materijala. Endornavirusi još nisu nađeni u Hrvatskoj usprkos obilju podataka koji govore o njihovoj rasprostranjenosti u divljim i kultiviranim biljkama, npr. grahu, bobu i paprici baburi (Fukuhara i sur. 2006, Okada i sur. 2013, Okada i sur. 2011). O prenosivosti TuMV-a sjemenom nema podataka, ali se efikasno prenosi lisnim ušima pa je odabran kao negativna kontrola prijenosa virusa vektorima u stakleniku. Prenosivost CMV-a i BCMV-a varijabilna je, ali u nekim domaćinima doseže znatne postotke pa sjeme može biti ključan izvor zaraze s obzirom na virulenciju tih virusa (http://www.dpvweb.net/). Posljednja tri virusa uzrokuju očite simptome bolesti na zaraženim biljkama. Iako ishodi za biljku mogu biti različiti, akutna oboljenja ogledaju se u više ili manje specifičnom skupu patoloških promjena (Roossinck 2010, http://www.dpvweb.net/).

Biljke uzgojene za potrebe ovog istraživanja generalno su se činile zdravima. Nisu pokazivale simptome ni lokalnih ni sistemskih zaraza, iako su neke razvile lokalne fenotipske promjene često povezive sa prisutnošću patogena. Navedene su mogle odražavati infekciju nekim drugim virusom ili gljivicom, kao i poremećaje fiziologije uzrokovane endogeno ili uslijed suboptimalnih okolišnih uvjeta. Utemeljeno na pregledu fenotipa, kao i rezultatima specifičnih postupaka za detekciju virusa, vjerojatno je da eksperimentalne biljke nisu bile zaražene ciljnim virusima. Ako navedeno ipak nije slučaj, lažno negativni rezultati mogu biti posljedica neprilagođenosti eksperimentalnih procedura (nedovoljan prinos dsRNA tijekom

ekstrakcije, neoptimizirani uvjeti elektroforetske analize i/ili RT-PCR-a).

Dobro izvođenje ekstrakcije uvelike određuje kvalitetu, čistoću i količinu dobivene dsRNA. Prinos dsRNA povećavaju: prikladno odabrana količina biljnog tkiva, kvaliteta i količine kemikalija, dobro usitnjeno tkivo, dovoljan broj ciklusa pročišćavanja na koloni uz prikladne koncentracije STE-pufera i etanola (Brozović i sur. 2007). Iako je ekstrakcija provedena prema provjerenim protokolima (Dodds 1993, Kearney i sur. 1990) s količinama tkiva koje provjereno daju dobre prinose dsRNA (Dodds 1993), moguće je da su se dogodili propusti koji su doveli do gubitka ekstrakta u nekim uzorcima (sezam, slanutak), kao i kontaminacije uzorka s DNA tijekom pročišćavanja na koloni. Npr., moguće je da se tijekom završnih koraka ekstrakcije izgubi talog tj. ekstrakt dsRNA. U tom slučaju su uzorci bili potpuno prazni te su prazne staze na gelovima očekivane. Do ulaska DNA u eluat moglo je doći u slučaju nedovoljnog pročišćavanja na koloni, iako je eksperimentalno pokazano da su 2 ciklusa kromatografije dovoljna za smanjenje DNA u uzorcima na zadovoljavajuću razinu koja se ne vidi na gelu (Dodds 1993). Nekontrolirana digestija DNazama se može isključiti jer je dsRNA dovoljno stabilna i otporna na nukleaze ako se tretira u odgovarajućem puferu (Brozović i sur. 2007). Za potrebe analize nekih skupina virusa (npr. luteovirusi, potyvirusi) se zbog manjeg prinosa dsRNA i općenito vrlo teške detekcije njihovih članova preporuča ekstrahirati iz veće količine tkiva nego što se uzima za npr. CMV ili TMV (Dodds 1993). Dodatne provjere bi se mogle napraviti slijedeći tu smjernicu. Također, uspješnost ekstrakcijskog procesa često ovisi o tipu biljnog tkiva: ona bogatija polisaharidima i glikoproteinima su viskoznija i teža za obradu pa je potrebno koristiti prilagođen ekstrakcijski pufer (Brozović i sur. 2007). Možda je to bio uzrok negativnog rezultata ekstrakcije u nekim uzorcima (npr. slanutak).

Kvaliteta i informativnost elektroforetske analize mogla se povećati na nekoliko načina. Za početak, veliki problem izvođenju zaključaka o veličini fragmenata koji su na gelovima dali pozitivne rezultate predstavljaju neadekvatno razdvojeni fragmenti HR-markera na poliakrilamidnim gelovima. Kraći fragmenti (15258, 13825, 12119, 10171) su u rangu veličine endornavirusa i trebali su poslužiti kao standarad u slučaju pojave dsRNA većih molekuskih masa (oko ili iznad 10 kbp), ali neogovarajuća kombinacija gustoće gela i markera dovela je do sabijanja fragmenatau gelu. Ta pojava onemogućava upotrebu komponenti markera kao referentnih fragmenata DNA. Upitno je bi li se eventualno donja granica do koje su fragmenti doprli mogla koristiti kao referentni položaj za veličinu

odgovarajuću duljini najkraćeg fragmenta markera, a to je 10171 pb. U tom slučaju bi duljina molekula u elektroforetskim prugama koji se kontinuirano pojavljuju na gelovima u istoj razini mogla biti približna navedenoj te predstavljati visokomolekularnu dsRNA ili kontaminacijsku DNA koja je eluirana u uzorke. Tretman DNazom proveden je s dijelom uzoraka kako bi se razriješila ova dvojba. Ako su rezultati pouzdani, u 8 od 9 obrađenih uzoraka radilo se o kontaminacijskoj DNA koja je uspješno uklonjena digestijom. Zadržavanje elektroforetske pruge u uzorku graha (br. 1) čini rezultat neujednačenim te može upućivati na neuspješnost procesa digestije DNA u tom uzorku ili na prisutnost dsRNA veće molekulske mase te inficiranost biljke. U potonjem i vjerojatnijem slučaju bi se rezultat elektroforeze proglasilo pozitivnim za uzorak br. 1 te bi trebalo provesti dodatne analize kojima bi se utvrdilo podrijetno prisutne dsRNA.

Osim prikladnijim markerom, rezultati elektroforeza bi se mogli upotpuniti paralelnim analizama svih uzoraka i na agaroznim gelovima u prilagođenijim uvjetima. Iako agarozni gelovi omogućavaju ulazak ssRNA i većih fragmenata DNA, njihova manja gustoća bi omogućila vizualizaciju materijala koji je zbog gustoće poliakrilamidnog gela potencijalno zaostao u jažicama, a koji bi možda bio vrijedan/pozitivan nalaz. Također, veliki raspon veličina u kojem se nalaze genomi odnosno ekvivalentne dsRNA očekivanih virusa otežava pronalazak koncentracije gela optimalne za dobro razlučenje svih. Kvaliteta provedenih agaroznih elektroforeza tj. vizualizacija sadržaja ekstrakata mogla se povećati povećanjem gustoće gelova (na 1,0% ili 1,2%), smanjenjem nanesenih količina uzoraka te produljenjem trajanja elektroforeze pri smanjenom naponu (Brozović i sur. 2007, Dodds 1993). Prikladnost pufera se također mogla provjeriti ponavljanjem elektroforeza u identičnim uvjetima u puferu s većim puferskim kapacitetom (npr. TBE-pufer) (Brozović i sur. 2007).

Provedene PAGE bi vrijedilo ponoviti s nešto manjom gustoćom gela. Okada i sur. (2011) su dobre rezultate s vizualizacijom endornavirusa veličina oko 16,5 kbp postigli na 5%-tnom gelu. Pokazano je (Brozović i sur. 2007, Dodds 1993, Khankhum i sur. 2015, Okada i sur. 2013) da se uz manji napon i dulje trajanje elektroforeze postiže bolja razlučivost, a uz smanjenu gustoću gela se povećava vjerojatnost da velike dsRNA virusnog podrijetla uđu u gel. S druge strane, 6% PAGE je dobar izbor za razlučivanje fragmenata manjih duljina (nekoliko stotina do nekoliko tisuća bp) i dsRNA podrijetlom od ostala tri virusa (Dodds 1993). Dodds (1993) također predlaže dulje trajanje elektroforeze (do 4 h) pri naponu 110 V.

Rezultati elektroforetske analize produkata reakcija RT-PCR su općenito negativni.

Pozitivni rezultati se nisu pojavili ni u jednoj skupini uzoraka osim u uzorku dsRNA paprike babure, ali se sekvenciranjem utvrdilo da amplikon ne potječe od dijela genoma endornavirusa te tako predstavlja lažno pozitivan rezultat. Uz to, jedino je uzorak sa dsRNA CMV-a (br. 50) korišten kao pozitivna kontrola uspješno amplificiran, što potvrđuje da su uvjeti odvijanja reakcija pogodovali reverznom prepisivanju i amplifikaciji dijela genoma očekivanog CMV-a. U mnogim se uzorcima nakon amplifikacije s početnicama za CMV na istom položaju pojavila elektroforetska pruga u razini koja približno odgovara veličini fragmenata od 400 pb. Tip i podrijetlo nukleinskih kiselina koje čine elektroforetske pruge bi trebalo istražiti, ali je vjerojatno da su nastale kao posljedica nespecifične amplifikacije.

Dobiveni rezultati mogu biti posljedica stvarnog odsutstva infekcije biljaka traženim virusima, što se s većom sigurnošću može reći za uzorke testirane na CMV zbog njegove opće slabe prenosivosti sjemenom. O prisutnosti dsRNA TuMV-a, BCMV-a te endornavirusa se, s druge strane, ne može još sa sigurnošću zaključivati. U slučaju prva dva virusa izostala je amplifikacija kontrolne sekvence virusa, što upućuje na neuspješnost enzimskih reakcija. Za BCMV tu tvrdnju ipak treba uzeti s rezervom pošto virus u kontrolnom uzorku nije identificiran. Provjerena pozitivna kontrola za endornaviruse je izostala. Dakle, moguće je da je virusna dsRNA u uzorcima posljednja tri virusa postojala, ali nije omogućeno uspješno odvijanje svih koraka koji bi u konačnici dali virusni amplikon. Jasno je da je provjerena pozitivna kontrola od ključnog značaja za interpretaciju ishoda reakcija, prvenstveno jer omogućava dobivanje informacije o prikladnosti odabranih uvjeta odvijanja reakcija. Ako pretpostavim da su biljke bile inficirane te da je virusna dsRNA bila prisutna u uzorcima u količini dovoljnoj da se detektira RT-PCR-om, vrijedni nalazi bi promakli vjerojatno zbog suboptimalnih uvjeta ili previđenih propusta tijekom izvođenja postupaka. Osim uvođenja pozitivnih kontrola i osiguravanja tehničke ispravnosti, kvaliteta metoda i rezultata se može povećati na nekoliko načina. Za početak, bitno je raspolagati funkcionalnim enzimima, prikladnim početnicama te optimizirati koncentracije sastojaka reakcijskih smjesa. Iako su uvjeti odabrani u ovom istraživanju preuzeti iz literature, ne bi bilo na odmet provesti optimizacije s uzorcima iz ovog istraživanja (Chen i sur. 2001, Gal-On i sur. 1998, Okada i sur. 2011, Xu i Hampton 1996).

6. ZAKLJUČAK

- Na temelju dobivenih rezultata ne može se potvrditi prijenos istraživanih virusa sjemenom u testiranim skupinama biljaka. Dodatne provjere i analize su potrebne da bi rezultati bili jasni i pouzdani.
- Iako nije testirana inficiranost samog sjemena i premda rezultati RT-PCR-a nisu definitivni, analiza fenotipa biljaka i elektroforeza ekstrakata upućuju na odsustvo zaraze CMV-om, BCMV-om i TuMV-om.
- Prisutnost endornavirusa (ili nekih drugih „perzistentnih virusa“) je dvojbena. Pošto infekcije takvim virusima većinom prolaze fenotipski neprimjetno, makroskopskim pregledom biljaka se ne bi mogle ustanoviti anomalije. Također, rezultati elektroforetske analize tj. podrijetlo prisutnih elektroforetskih pruga nisu do kraja razjašnjeni te se još uvijek ne može prihvatiti ni odbaciti mogućnost prisustva perzistentnih virusa.
- Analiza sekvenci amplikona iz uzorka paprike babure nije potvrdila njegovo endornavirusno podrijetlo. Analizu treba ponoviti koristeći različite jedinke ovog tipa biljnog domaćina.

7. LITERATURA

Accotto, G. P., Adam, G., Alioto, D., Basalp, A., Bech, K., Cuperus, C., Dellavalle, G., Desibiez, C., Grassi, G., Hellwald, K. H., Katis, N., Lecoq, H., Lisa, V., Luis-Arteaga, M., Luisoni, E., Miller, A., Moriones, E., Nolasco, G., Rabenstein, F., Roggero, P., Tomassoli, L., Torrance, L., van der Vlugt, R., Vaira, A. M., Vetten, J., Winter, S. (1998). Detection and biodiversity of *Cucumber mosaic cucumovirus*. Conclusions from a ringtest of European Union COST 823 (new technologies to improve phytodiagnosis). *Journal of Plant Pathology*, **80**: 133–149

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**: 403–410

Bos, L. (1999). Beijerinck's work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **354**: 675–685

Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Ćetković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vujaklija, D. (2007). Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Chen, J., Chen, J., Adams, M. J. (2001). A universal PCR primer to detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology*, **146**: 757–766

de Assis Filho, F. M., Sherwood, J. L. (2000). Evaluation of Seed Transmission of Turnip yellow mosaic virus and Tobacco mosaic virus in Arabidopsis thaliana. *Phytopathology*, **90**: 1233–1238

Dodds, J. A. (1993). dsRNA in diagnosis. In: Diagnosis of plant virus diseases (Ed. R. E. F. Matthews), CRC Pres, Boca Raton, pp. 273–294

Fukuhara, T., Koga, R., Aoki, N., Yuki, C., Yamamoto, N., Oyama, N., Moriyama, H. (2006). The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. *Archives of Virology*, **151**: 995–1002.

Gal-On, A., Wolf, D., Wang, Y., Faure, J. E., Pilowsky, M., Zelcer, A. (1998). Transgenic resistance to *Cucumber mosaic virus* in tomato: blocking of long-distance movement of the virus in lines harboring a defective viral replicase gene. *Phytopathology*, **88**: 1101–1107

Gray, S. M., Banerjee, N. (1999). Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and Animal Viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **63**: 128–148.

Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., VandePol, S. (1982). Rapid Evolution of RNA Genomes. *Science*, **215**: 1577–1585

Ingwell, L. L., Eigenbrode, S. D., Bosque-Pe´rez, N. A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, **2**: 1–6

Kearney, C. M., Gonsalves, D., Provvidenti, R. (1990). A severe strain of cucumber mosaic virus from China and its associated satellite RNA. *Plant Disease*, **74**: 819–823

Khankhum, S., Valverde, R. A., Pastor-Corrales, M. A., Osorno, J. M., Sabanadzovic, S. (2015). Two endornaviruses show differential infection patterns between gene pools of Phaseolus vulgaris. *Archives of Virology*, **160**: 1131–1137

Liu, H., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Xie, J., Cheng, J., Peng, Y., Ghabrial, S. A., Yi, X. (2010). Widespread Horizontal Gene Transfer from Circular Double-stranded RNA Viruses to Eukaryotic Nuclear Genomes. *Journal of Virology*, **84:** 11876–11887

López-Moya, J. J., Valli, A., García, J. A. (2009). *Potyviridae*. *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons. Ltd: Chichester

Márquez, L. M., Redman, R. S., Rodriguez, R. J., Roossinck, M. J. (2007). A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science*, **315**: 513–515

Mochizuki, T., Ohki, S. T. (2012). Cucumber mosaic virus : viral genes as virulence determinants. *Molecular Plant Pathology*, **13**: 217–225

Nakatsukasa-Akune, M., Yamashita, K., Shimoda, Y., Uchiumi, T., Abe, M., Aoki, T., Kamizawa, A., Ayabe, S., Higashi, S., Suzuki, A. (2005). Suppression of root nodule formation by artificial expression of the TrEnodDR1 (coat protein of White clover cryptic virus 1) gene in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**: 1069–1080

Ng, J. C. K., Perry, K. L. (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Molecular Plant Pathology*, **5**: 505–511

Okada, R., Yong, C. K., Valverde, R. A., Sabanadzovic, S., Aoki, N., Hotate, S., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T. (2013). Molecular characterization of two evolutionarily distinct endornaviruses co-infecting common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of General Virology*, **94**: 220–229

Okada, R., Kiyota, E., Sabanadzovic, S., Moriyama, H., Fukuhara, T., Saha, P., Roossinck, M. J., Severin, A., Valverde, R. A. (2011). *Bell pepper endornavirus*: molecular and biological properties, and occurrence in the genus *Capsicum*. *Journal of General Virology*, **92**: 2664–2673

Palukaitis, P., García-Arenal, F. (2003). Cucumoviruses. *Advances in Virus Research*, **62**: 241–323

Petrović, D., Ignjatov, M., Nikolić, Z., Vujaković, M., Vasić, M., Milošević, M., Taški-Ajduković, K. (2010). Occurrence and distribution of viruses infecting the bean in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, **62**: 595–601

Pfeiffer, P. (1998). Nucleotide sequence, genetic organization and expression strategy of the double-stranded RNA associated with the '447' cytoplasmic male sterility trait in *Vicia faba*. *Virology*, **79**: 2349–2358

Roossinck, M., J. (2015). Metagenomics of plant and fungal viruses reveals an abundance of persistent lifestyles. *Frontiers in Microbiology*, **5**: 1–3

Roossinck, M. J. (2013). Plant Virus Ecology. *PLoS Pathogens*, **9**: 9–11

Roossinck, M. J., Sabanadzovic, S., Okada, R., Valverde, R. A. (2011). The remarkable evolutionary history of endornaviruses. *Journal of General Virology*, **92**: 2674–2678

Roossinck, M. J. (2010). Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **365**: 1899–905

Roossinck, M. J. (2005). Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews. Microbiology*, **3**: 917–924

Safari, M., Roossinck, M. J. (2014). How does the genome structure and lifestyle of a virus affect its population variation? *Current Opinion in Virology*, **9**: 39–44

Simmonds, P., Adams, M. J., Benko, M., Breitbart, M., Brister, J. R., Carstens, E. B., Davison, A. J., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Hull, R., King, A. M. K., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Orton, R, Marilyn J. Roossinck, M. J., Sabanadzovic, S., Sullivan, M. B., Suttle, C. A., Tesh, R. B., van der Vlugt, R. A., Varsani, A., Zerbini, F. M. (2017). Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, doi:10.1038/nrmicro.2016.177

Song, D., Cho, W. K., Park, S. H., Jo, Y., Kim, K. H. (2013). Evolution of and Horizontal Gene Transfer in the *Endornavirus* Genus. *PLoS ONE*, **8**:e64270

Wilson, C. (2014). Applied Plant Virology. Modular Text Series, CABI, Wallingford.

Xie, W. S., Antoniw, J. F., White, R. F., Jolliffe, T. H. (1994). Effects of beet cryptic virus infection on sugar beet in field trials. *Annals of Applied Biology*, **124**: 451–459

Xu, L., Hampton, R. O. (1996). Molecular detection of *Bean common mosaic* and *Bean common mosaic necrosis potyviruses* and pathogroups. *Archives of Virology*, **141**: 1961–1977

Yang, Y., Kim, K. S., Anderson, E. J. (1997). Seed transmission of *Cucumber mosaic virus* in spinach. *Phytopathology*, **87**: 924–931

http://www.dpvweb.net/ (Descriptions of Plant Viruses, online verzija; pristup- studeni 2016.,

siječanj 2017.)

http://www.genecodes.com/

http://www.ictvonline.org/

8. PRILOZI

Prilog 1. Nukleotidni sljedovi produkta RT-PCR detekcije (*forward*, f i *reverse*, r) u uzorku paprike babure (*C. annuum*, Ca1). Sljedovi su prikazani u formatu *FASTA.*

>f

CCAGGGAACGAGCGCGTTAGTACTGATGTTCAGGTCAGCTACGACCGCTCTGGAT
GTTAATGACTTCCTTGGGGTAACGCGCCGGTGCCGTAGCTAATCGAGTAGCTCTA
GAAGCATGTGTAAAAGCTCGTAATGAAGGACGCGATCTTGCTCGGGAAGGTAATG
AGATTATTCGCGAGGCTTCCAAATGGAGCCCGGAACTAGCTGCTGCTTGTGAGGT
ATGGAAAGAGATCGTATTTAATTTTGCAGCAGTGGACGTTTTGGTCAAGCTACCA
CCCGCTCTAGATAGAACTCCTGACAATCTCCCAAAGGTCTTTCCATCTAGTGGAA
GGGGAACCCTTGATTCACACAAGTGGACAATTAAAAACTTCAAAAGAAAAGGGG
GGGTATGGGGGGGGGACCTTTCTTCGGAAGGAGAAAACACATGGTGGGGGTTAA
A

>r

GAAGGTATATCTTCCTTCTCTCCCTCCTTCCTGGTGTCCTTCTTTTATTCTCTCTTATT
ATTTCTGTCTCTTATTCTCCTATAAAGACTTATCTCTTTACCTTCCCGATCAAGATCG
CCCCTTTAAATACGAGATTTTACACATGCGTTCTAGAGCTACTCATTTAGCTACGGC
ACCTGGCGCATTACCCCAAGGATGTCCTAAAGTTCCTCCTACGAACTGTAGTACGG
AATCCTCCCCAAAGATCTCGGTCAGAGCAGGCATATGCCACACAATTATTCTCCCTT
AACTTACCTTTCCAAAAGGTTTCTCTTTTTTGGTGAAAACCTTATCTCCGCCTTAAC
GAGTTTTTTTAATAAATTATTAGAAAAAAAGGGTGATGAAAGAGGAATAAAAATAT
AAAAAGTAAAAAAGAAAAAGAGAGAGATTTTTTTAAAGAAGAAAAGAAAGAGA
GAAGGCGGTAGGGGATGAATAAGACAGAACAAGAAAAAGCGGGAGGCGGGGAA
AGGGG

Prilog 2. Nukleotidni sljedovi produkta RT-PCR detekcije (*forward*, f i *reverse*, r) u uzorku čili papričice (*C. annuum*, `Peruvian purple`, Ca2). Sljedovi su prikazani u formatu *FASTA.*

> f

CCGAACCAAAGTTCGTGTGATTCTGAGTCAGGTCAAGCTACCACCGCTCTAGAAC
TTGACGAATCTCTGGGGTATTGCGCCGGAGCCGAAGCTTAGCGAGTATCTCCAGAA
GCATGTGTAAAAGCTCGTCATGAACGACTCGATCTTGCTCGGGAAGGTAATGAGAT
TATTCGCGAGGCTTCCAAATGGAACCCGGAACTAGCTGCTGCTTGTGAGGTATGGA
AAGAGATCGTATTTAATTTTGCAGCAGTGGACGTTTTGGACAAGCTACAACCGCAC
TAGAACCAAGAGTCAAAATAGGGACAAGCTACTACAGCTCTAGAGAGAGGAACA
GTTGATTCACGCAATTGGTCAAGCTACTACAGCACTAGAGGGGGGGAAGGAATGA
TCCATTTTTTTAGAGTGGAAAAGAACAGGGGGGGGTGATAGGAGAGG

>r

AATCCGCTTAAGCGAGCTATACTCTTCTGTGCATACATCATTCTCGCTTAGGGGCGG
GCACAATTGTAACTGGGGATAAATCTCAGTACGTTTCGAGCAAGATCGCGTCCTTA
ATTAACAGATTTTGACGTGGTTCAGAGCTAATCGATTAACTACGGCACCAGGGGCA
TTACCCCTGGGATGTCCTAAAGTTCCTCCTACGAACTGTAGTACGGATTCATCCCCA
AAGATCTCGGTCAGAGCAGGCATATGCCACACGATAATTCTCCCTTACCTGGGCCT
TTTTTCGGGTTAAGGGCCATAATTCTCTCTTACTCCTATAAGCTTTTACCCTTCGGTG
CAAAACAAAAATTCTCGCTTAAGGGGAGAAGAATGGAGGGAAACAACATTTAAA
AGGAGGAAAAAAAGTTGGTTTGATTAAAAAAGGAAGGAGGG

9. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

Ime i prezime: Helena Justić

Mjesto i datum rođenja: Zagreb, 14. siječnja 1989. g.

Adresa stanovanja: Marjanovićev prilaz 6, 10010 Zagreb

Mobilni telefon: 099 819 1768

E-mail: hjustic@gmail.com

Školovanje

2003. – 2007. – Gimnazija Sisak, Sisak – srednjoškolsko obrazovanje

2007. – 2010. – Filozofski fakulet Sveučilišta u Zagrebu – preddiplomski studij psihologije

2010. –2013. – Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu – preddiplomski studij biologije

Strani jezici

Engleski jezik – izvrsno poznavanje

Njemački jezik – osnovno poznavanje