

Biološka i molekularna karakterizacija novog izolata virusa venske nekroze koleusa

Herek, Dominik

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:620773>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dominik Herek

**Biološka i molekularna karakterizacija
novog izolata virusa venske nekroze koleusa**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Dominik Herek

**Biological and molecular characterization
of a new isolate of coleus vein necrosis virus**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Mikrobiološkom zavodu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Biološka i molekularna karakterizacija novog izolata virusa venske nekroze koleusa

Dominik Herek

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Coleus scutellarioides (L.) Benth. ili koleus važna je ukrasna biljka diljem svijeta. Najnovije otkriveni virus koleusa je virus venske nekroze koleusa (*Coleus vein necrosis virus*, CVNV). CVNV je prvi puta detektiran 2007. godine u Sjevernoj Americi, a zatim i u Europi i to u Hrvatskoj u Botaničkom vrtu u Zagrebu 2018. U rujnu 2020. u Botaničkom vrtu u Zagrebu zapažena su dva nova koleusa sa simptomima nalik na virusne. Cilj ovog rada bio je potvrditi CVNV kao uzročnika infekcija koleusa iz 2020. te usporediti nove virusne izolate s prijašnjima iz Botaničkog vrta. Infekcija CVNV-om potvrđena je biotestom na eksperimentalnim biljkama, umnažanjem dijela gena za kapsidni protein CVNV-a reverznom transkripcijom i lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR) te analizama nukleotidnog slijeda. Jedan od novih izolata analiziran je transmissijskom elektronskom mikroskopijom te su uočeni mogući citopatološki učinci. Nijedan od dva nova izolata nije uspješno inficirao sve poznate domaćinske vrste. Ostale biološke značajke (simptomatologija i uvjeti za uzgoj virus *in planta*) novih izolata iste su kao kod starijih Zagrebačkih izolata. Filogenetski se jedan od novih izolata značajno razlikuje od starijih, dok je drugi vrlo sličan. Potrebna su dalja istraživanja da se odredi jesu li uzorci ovih razlika biološki ili metodološki.

(47 stranica, 10 slika, 6 tablica, 52 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: CVNV, *Carlavirus*, ukrasna kopriva, TEM, RT-PCR

Voditelj: prof. dr. sc. Dijana Škorić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dijana Škorić

izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

Rad prihvaćen: 2.9.2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Biological and molecular characterization of a new isolate of coleus vein necrosis virus

Dominik Herek

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Coleus scutellarioides (L.) Benth., also known as coleus, is a globally important ornamental plant. The most recently discovered viral pathogen of coleus is *Coleus vein necrosis virus* (CVNV). It was first detected in North America in 2007, and subsequently in Croatia (Europe) in the Botanical garden of the Faculty of Science, Zagreb in 2018. In September 2020, two new coleus plants in the Botanical garden were observed to have virus-like symptoms. The aim of this work was to confirm CVNV as an agent infecting these two coleus plants and compare them to previous isolates from the Botanical garden. The CVNV infection was confirmed by biotest on experimental plants and by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification and sequence analysis of a region of the viral coat protein gene. One of the isolates was examined by transmission electron microscopy and possible cytopathic effects were identified. Both new CVNV isolates failed to infect all of the known host species, but they didn't differ from the previous isolates from Zagreb in other biological characteristics (symptomatology, growth conditions *in planta*). Phylogenetically, one of the new isolates was quite similar to older ones, while the other differed substantially. Further research is needed to see if the differences have biological or methodological basis.

(47 pages, 10 figures, 6 tables, 52 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: CVNV, *Carlavirus*, TEM, RT-PCR

Supervisor: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.

Reviewers: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, Ph.D.

Assoc. Prof. Silvija Černi, Ph.D.

Thesis accepted: 2.9.2021.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Koleus	1
1.2. Virus venske nekroze koleusa	2
1.2.1. Građa CVNV-a.....	2
1.2.2. Prijenos CVNV-a.....	3
1.2.3. Makroskopska obilježja infekcije biljaka CVNV-om	4
1.2.4. Obilježja infekcije CVNV-om na staničnoj razini.....	5
1.2.5. Detekcija CVNV-a.....	6
2. Ciljevi rada	7
3. Materijali i metode.....	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Biljni materijal	8
3.1.2. Zamrznuti uzorci korišteni u pokusima	10
3.1.3. Materijali za mehaničku inokulaciju.....	11
3.1.4. Materijali za transmisijsku elektronsku mikroskopiju.....	11
3.1.5. Materijali za izolaciju RNA.....	11
3.1.6. Materijali za vanjsku sterilizaciju sjemeni	12
3.1.7. Komercijalni komplet za tretman uzoraka DNazom – RQ1 RNase-Free DNase, Promega, SAD.....	12
3.1.8. Komercijalni komplet za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, Invitrogen, SAD.....	12
3.1.9. Materijali za elektroforezu u agaroznom gelu	12
3.1.10. Računalni programi i resursi korišteni za analizu nukleotidnih sljedova i izradu filogenetskih stabala	13

3.2. Metode	15
3.2.1. Biološki testovi	15
3.2.2. Transmisijaska elektronska mikroskopija prereza listova inficiranih biljaka	16
3.2.3 Izolacija RNA iz biljnog tkiva	17
3.2.4. Tretman uzoraka izolirane RNA DNazom	19
3.2.5. Amplifikacija fragmenta gena za kapsidni protein CVNV-a metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom.....	19
3.2.6. Analiza RT-PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu	20
3.2.7. Sekvenciranje RT-PCR produkata	21
3.2.8. Računalna analiza dobivenih nukleotidnih sljedova i izrada filogenetskog stabla	21
4. Rezultati.....	23
4.1. Biološki testovi	23
4.2. Transmisijaska elektronska mikroskopija.....	28
4.3. Amplifikacija regije gena za kapsidni protein metodom RT-PCR i analiza RT-PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu	30
4.4. Sekvenciranje, analiza nukleotidnih sljedova i izrada filogenetskog stabla.....	32
5. Rasprava	35
5.1. Biotest.....	35
5.2. Analiza prereza listova inficiranih CVNV-om transmisijskom elektronskom mikroskopijom.....	36
5.3. Amplifikacija regije gena za kapsidni protein CVNV-a metodom RT-PCT	37
5.4. Sekvenciranje i filogenetska analiza na temelju nukleotidnog slijeda regije gena za kapsidni protein CVNV-a	38
6. Zaključak	41
7. Literatura	42
Životopis	48

1. Uvod

1.1. Koleus

Coleus scutellarioides (L.) Benth. biljka je iz porodice *Lamiaceae* porijeklom iz Jugoistočne Azije koja se danas sadi diljem svijeta (Missouri Botanical Garden 2018). Važna je ukrasna biljka, a vrijednost njene prodaje godišnje prelazi 14 milijuna američkih dolara (Harlan i Hausbeck 2018). Taksonomija ove biljke često se mijenjala tijekom godina pa su i dalje često korišteni sinonimi poput *Coleus blumei*, *Plectranthus scutellarioides* i *Solenostemon scutellarioides* (N.C. Extension 2020), a današnji taksonomski položaj određen je na temelju filogenetskih odnosa 2018. godine (Paton i sur. 2018, Paton i sur. 2019). U Hrvatskoj je ova biljka poznata kao ukrasna kopriva, šarena kopriva ili ukrasna šarena kopriva, ali budući da postoji izrazito velik broj morfološki raznolikih kultivara (Lebowitz 1985), a neki od njih nisu dobro opisani ovim nazivima jer nisu ni šareni, a sama vrsta *C. scutellarioides* ne pripada u koprive (porodica *Urticaceae*) smatram da je bolje koristiti naziv koleus.

Poznato je nekoliko patogena koji redovito inficiraju koleus, ali nijedan nije posebno ekonomski značajan te ne izaziva velike gubitke. Ovi patogeni uključuju gljive i pseudogljive (*Oomycota*), viruse te viroide (Tablica 1.) Patogeni ne izazivaju uvijek simptome na koleusu, a interakcije s patogenima i ishod infekcije mogu se razlikovati od kultivara do kultivara (Harlan i Hausbeck 2018). U Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu patogeni koleusa istražuju se već nekoliko godina, a zabilježeni su viroidi *Coleus blumei viroid 1* (CbVd-1) i CbVd-3 (Škorić i sur. 2019) te virus venske nekroze koleusa (Škorić i sur. 2018). U rujnu 2020. zapažena su dva nova koleusa sa simptomima nalik na virusne u Botaničkom vrtu u Zagrebu koja su zatim korištena kao početni materijal u ovom istraživanju.

Tablica 1. Poznati patogeni koji inficiraju koleus (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.).

Patogen	Porodica	Kategorija
<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Sclerotiniaceae</i>	Gljiva
<i>Peronospora</i> sp.	<i>Peronosporaceae</i>	<i>Oomycota</i>
<i>Pythium</i> sp.	<i>Pythiaceae</i>	<i>Oomycota</i>

Tablica 1. Nastavak

Patogen	Porodica	Kategorija
<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Ceratobasidiaceae</i>	Gljiva
<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Bromoviridae</i>	Virus
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	<i>Tospoviridae</i>	Virus
<i>Tobacco etch virus</i>	<i>Potyviridae</i>	Virus
<i>Coleus vein necrosis virus</i>	<i>Betaflexiviridae</i>	Virus
viroidi roda <i>Coleviroid</i>	<i>Pospiviroidae</i>	Viroid

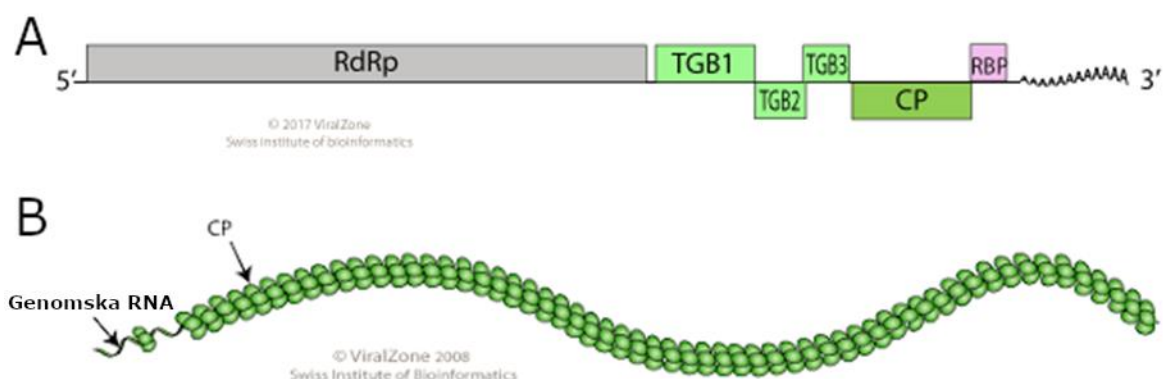
1.2. Virus venske nekroze koleusa

Zadnje otkriveni patogen koleusa te ujedno jedan o kojem se najmanje zna, virus je venske nekroze koleusa (*Coleus vein necrosis virus*, CVNV), pripadnik roda *Carlavirus* i porodice *Betaflexiviridae* (King i sur. 2012). Prvi put je detektiran upravo u koleusu 2007. godine (Mollov i sur. 2007), a ubrzo mu je sekvenciran cijeli genom (Kraus i sur. 2008). Nakon ovih istraživanja nema mnogo drugih navoda u literaturi. U Europi je prvi put detektiran u Hrvatskoj u Botaničkom vrtu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (Škorić i sur. 2018).

1.2.1. Građa CVNV-a

CVNV je virus s jednolančanim RNA-genomom pozitivnog smisla dužine oko 8700 nukleotida (King i sur. 2012, Kraus i sur. 2008). Genomska RNA sadrži 5'-kapu i 3'-poli-A rep, kratke netranslatirane regije na 5'- i 3'-krajevima i 6 otvorenih okvira čitanja (*Open Reading Frame*, ORF), odnosno gena koji kodiraju 6 proteina (Slika 1.A) (Foster 1992). Prvi ORF kodira virusnu replikazu, veliki protein koji sadrži funkcionalne domene RNA-ovisne RNA-polimeraze (*RNA dependant RNA polymerase*, RdRp), metil-transferaze, helikaze i proteaze. Drugi, treći i četvrti ORF čine trostruki genski blok (*Triple Gene Block*, TGB) čiji se genski produkti nazivaju TGBp1, TGBp2 i TGBp3 (Kraus i sur. 2008). Ova tri proteina imaju mnoge uloge, ali im je najvažnija pokretanje virusa od stanice do stanice kroz plazmodezmije (Morozov i Solovyev 2003). ORF 5 kodira kapsidni protein, a ORF 6 kodira protein koji veže RNA (*RNA binding protein*, RBP), nazivan još i protein bogat cisteinom (Cysteine rich protein, CRP) čija je glavna uloga inhibicija glavnog biljnog obrambenog mehanizma - RNA-utišavanja (Kraus i sur. 2008).

Čestice CVNV-a filamentozne su, građene helikalnom simetrijom postignutom omotavanjem monomera kapsidnih proteina duž cijelog genoma virusa (Slika 1.B) (DPV 1982). Prosječna zabilježena dužina čestice CVNV-a je oko 640 nm (Mollov i sur. 2007), što je u skladu s veličinom čestica svih virusa iz roda *Carlavirus* (DPV 1982).



Slika 1. Organizacija genoma (A) i struktura čestica (B) virusa roda *Carlavirus*. RdRp – RNA-ovisna RNA-polimeraza (*RNA Dependant RNA Polymerase*), TGB – trostruki genski blok (*Triple Gene Block*), CP – kapsidni protein (*Capsid Protein*), RBP – protein koji veže RNA (*RNA Binding Protein*). Preuzeto od <https://viralzone.expasy.org/268>

1.2.2. Prijenos CVNV-a

Biljni virusi se od biljke do biljke mogu prenositi na više različitih načina koji ovise o svojstvima pojedinog virusa i pojedinih biljnih vrsta koje inficiraju. Ovisno o biljkama s kojih i na koje se prenose virusi, razlikujemo vertikalni prijenos, odnosno prijenos s roditeljskih biljaka na potomke, i horizontalni prijenos, odnosno prijenos virusa s biljke na biljku koje nisu u odnosu roditelj-potomak (Jones 2018). Daleko najčešći mehanizam prijenosa biljnih virusa je horizontalni prijenos vektorima, a najčešći vektori su insekti iz natporodica *Aphidoidea* (lisne uši) i *Aleyrodoidea* (štitasti moljci) koji zajedno prenose preko 500 vrsta biljnih virusa (Nault 1997; Fereres i Raccach 2015). Većinu karlavirusa prenose lisne uši, dok jedan karlavirus, virus blagog šarenila crnookog graha (*Cowpea mild mottle virus*, CpMMV), prenose štitasti moljci. Za neke karlaviruse vektori još nisu poznati (DPV 1982; Zanardo i Carvalho 2017). Učestala vrsta lisne uši, *Myzus persicae*, čest je vektor raznih virusa, a istraživana je i kao vektor za CVNV. U jednom istraživanju pokazan je prijenos CVNV-a putem *M. persicae*, ali ne na sve

poznate biljne vrste koje mogu poslužiti kao domaćini CVNV-a (Kraus i sur. 2008), dok u drugom istraživanju prijenos ovim vektorom nije utvrđen (Mollov i sur. 2007).

Važan način prijenosa također je i vertikalni prijenos sjemenom (Mink 1993). Prijenos karlavirusa sjemenom slabo je istražen. Istraživanja su uglavnom provedena na CpMMV-u, ali se rezultati istraživanja prilično razlikuju. Postotak proklijalog sjemena u kojem je detektiran CpMMV varira u rasponu od 0,9% do 94,8%, a vjerojatno ovisi o biljnoj vrsti ili kultivaru te možda i o specifičnoj varijanti virusa (Prasad i sur. 1990; Jeyanandarajah i Brunt 1993; Zanardo i Carvalho 2017). Od karlavirusa sjemenom su prenosivi i virus prugavosti graška (*Pea streak virus*) i virus mozaika žila crvene djeteline (*Red clover vein mosaic virus*) (King i sur. 2012). Prijenos CVNV-a sjemenom dosad nije istraživan.

1.2.3. Makroskopska obilježja infekcije biljaka CVNV-om

Tijekom trajanja infekcije interakcije virusa i domaćina konstantne su te njihova ravnoteža određuje posljedice infekcije. Kronične virusne infekcije biljaka definirane su kao infekcije uzrokovane virusima prenesenim na biljku horizontalnim ili vertikalnim putem pri kojima virus ne biva brzo eliminiran, niti biljka umire od posljedica bolesti, dok sama infekcija može trajati dugi niz godina (Roossinck 2010). Ovakve infekcije često uspostavlja i CVNV u koleusu (Škorić, osobno priopćenje). I akutne i kronične infekcije mogu, ali i ne moraju biti simptomatične. U slučaju CVNV-a rijetko su simptomatične (Škorić, osobno priopćenje).

CVNV na koleusu, ali i na indikatorskim biljkama, najčešće izaziva simptome u uvjetima kratkog dana koji se pojavljuju tri do četiri tjedna nakon inokulacije biljaka. Unatoč tome, simptomi na indikatorskim biljkama jasno su vidljivi i relativno specifični, djelomično zbog specifičnih okolišnih uvjeta koji pogoduju njihovom razvitku. Simptomi na koleusu variraju od kultivara do kultivara, ali obično uključuju klorotične točkaste lezije, deformacije listova, nekroze listova uz žile i sistemične mozaike (Mollov i sur. 2007; Škorić, osobno priopćenje). Sistemični simptomi javljaju se na mjestima udaljenim od mjesta inokulacije zbog rasprostranjivanja virusa kroz biljku putem plazmodezmija i floemskog sustava (Carrington i sur. 1996). Na nekim indikatorskim biljkama drugih vrsta, CVNV također izaziva simptome poput lokalnih klorotičnih i nekrotičnih lezija, sistemskih mozaika i nekroza te kloroza uz žile listova (Mollov i sur. 2007; Škorić, osobno priopćenje). Poznati krug domaćina ovog virusa, osim koleusa,

uključuje vrste *Verbena x hybrida* 'Taylor Town Red', *Gomphrena globosa* L., *Chenopodium amaranticolor* (Coste & A.Reyn.) Coste & A.Reyn., *Chenopodium murale* L., *Chenopodium quinoa* Willd., *Nicotiana benthamiana* Domin, *Nicotiana clevelandii* A.Gray i *Nicotiana tabacum* L. (Mollov i sur. 2007; Kraus i sur. 2008; Škorić, osobno priopćenje).

1.2.4. Obilježja infekcije CVNV-om na staničnoj razini

Simptomi na inficiranim biljkama nastaju kao produkt vrlo kompleksnih interakcija virusnih proteina sa raznim staničnim metama te djelovanjem obrambenih mehanizama biljke (Laliberté i Sanfaçon 2010; Mandadi i Scholthof 2013; Pallas i García 2011). Niti u jednom slučaju ove kompleksne interakcije nisu u potpunosti razjašnjene, ali su određeni aspekti poznati. Iako ne postoje podaci specifično za CVNV, neke zaključke i pretpostavke možemo postaviti na temelju prijašnjih istraživanja drugih virusa roda *Carlavirus*, ali i biljnih virusa općenito.

RNA-virusi uvijek se repliciraju u posebnim membranskim strukturama koje nastaju interakcijama virusnih proteina s unutarnjim membranama domaćinske stanice (Diaz i Ahlquist 2012). Ove strukture su mnogobrojne i raznolike, mogu nastajati od svih vrsta unutarstaničnih membrana te mogu poprimati i različite oblike (Jin i sur. 2018; Verchot 2011). Neki od čestih oblika ovih membranskih struktura su sferule (kružne invaginacije membrana) te multivezikularna tjelešca (nakupine vezikula obavijenih dvjema membranama), poznata još kao vezikule s dvostrukim membranama (*Double membrane vesicle*, DMV). Glavna funkcija svih ovih struktura je osigurati sigurno mjesto za učinkovitu replikaciju virusa, zaštićeno od obrambenih mehanizama domaćina (Laliberté i Sanfaçon 2010, Verchot 2011). Multivezikularna tjelešca mogu nastati i kao posljedica biljnog obrambenog odgovora, ali i kao takva mogu označavati infekciju stanice (Li i sur. 2018). Razni virusni proteini mogu izazvati formaciju membranskih struktura, a kod virusa koji imaju TGB pa tako i kod karlavirusa, to su proteini TGBp2 i TGBp3 (Morozov i sur. 1991; Morozov i Solovyev 2003). Citopatološke promjene u stanicama uzrokovane karlavirusima nisu puno istraživane. Najčešće su primjećivani agregati virusnih čestica u citoplazmi (DPV 1982), ali viđene su i neke membranske promjene u obliku vezikula (Brunt i sur. 1983; Brunt i sur. 1976; Edwardson i Christie 1978; Forster i Milne 1978; Mansour i sur. 1998).

1.2.5. Detekcija CVNV-a

CVNV je, kao i ostale biljne viruse, moguće detektirati standardnim metodama koje se koriste u biljnoj virologiji. Najstarija, a vjerojatno i najosjetljivija metoda je biotest proveden mehaničkom inokulacijom eksperimentalnih biljaka (González-Garza 2017). Biotestovi su uspješno korišteni za detekciju CVNV-a zbog kombinacije relativno uskog kruga domaćina i specifičnih uvjeta (3-4 tjedna u uvjetima kratkog dana) u kojima se najčešće razvijaju simptomi (Mollov i sur. 2007; Kraus i sur. 2008; Škorić i sur. 2018). Također, CVNV je detektiran transmisijском elektrоnskom mikroskopijom (Mollov i sur. 2007). Ovim dvjema metodama nije moguća sigurna detekcija do razine vrste, ali uz primjenu molekularnih metoda moguća je precizna karakterizacija izolata. Detekcija je moguća i analizom produkata amplificiranih metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) uz primjenu specifičnih početnica kojima se amplificira regija gena za kapsidni protein (Kraus i sur. 2008). Detekcija je moguća i sekvenciranjem koje može biti izravno usmjereno na regiju genoma (Mollov i sur. 2007) ili na cijeli genom (Kraus i sur. 2008), a moguće je i sekvenciranje produkta dobivenog metodom RT-PCR (Škorić i sur. 2018).

2. Ciljevi rada

Cilj mog diplomskog rada bio je potvrditi CVNV kao uzročnika infekcija koleusa iz vegetacijske sezone 2020. u Botaničkom vrtu PMF-a. Hipoteza postavljena na početku istraživanja je da se ovaj izolat CVNV-a prema biološkim i molekularnim značajkama ne razlikuje bitno od izolata detektiranog u Botaničkom vrtu ranijih godina (Škorić i sur. 2018.) te je stoga istraživanje bilo usmjereno na određivanje tih značajki i usporedbu s već istraživanim izolatom. U tu svrhu, cilj rada bio je biološki okarakterizirati novi izolat istraživanjem mogućih citopatoloških efekata, simptomatologije, kruga domaćina te uvjeta potrebnih za uzgoj virusa. Također, cilj je bio i molekularno okarakterizirati ovaj izolat koristeći metodu RT-PCR sa specifičnim početnicama (Kraus i sur. 2008) za amplifikaciju regije gena za kapsidni protein i određivanjem nukleotidnog slijeda amplificirane regije gena te provedbom filogenetske analize dobivenih sljedova.

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal

Prije početka mog rada, u rujnu 2020. godine, dva koleusa iz Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu koja su pokazivala simptome virusne infekcije u obliku reznica unesena su u staklenik i dalje održavana kroz 2020. i 2021. godinu. Prva biljka, nazvana C1 (Slika 3.A), kultivar je koleusa bijelo-zelene boje listova, dok je druga, C2, kultivar bijelo-zeleno-ružičaste boje (Slika 3.B). Također, reznica jednog zeleno-bijelog kultivara koleusa bez simptoma unesena je u staklenik i održavana kao negativna kontrola te označena kao CZ (Slika 4.A).



Slika 3. Koleusi (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) iz Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu koji pokazuju simptome nalik na virusne. U jesen 2020. uneseni su u staklenik kao reznice, imenovani kao C1 (A) i C2 (B) te održavani i korišteni za daljnje eksperimente uključujući one opisane u ovom diplomskom radu. Simptomi (klorotične točkaste lezije) su označeni strelicama.

Jedan od kultivara koleusa koji je korišten u prijašnjim istraživanjima i održavan u stakleniku od 2016. poslužio je kao pozitivna kontrola u ovom istraživanju jer je u utvrđeno da je inficiran CVNV-om i *Coleus blumei* viroidom 3 iako nema nikakve simptome infekcije (Škorić i sur. 2018). Ovaj kultivar ima oznaku Vn (Slika 4.B). Osim svježeg materijala ovih biljaka, koristio sam i uzorak lišća biljke Vn zamrznut od 2016. godine.

Kao eksperimentalne biljke u svrhu provođenja biotesta koristio sam sadnice više različitih vrsta koje su uzgojene iz sjemena u stakleniku. Koristio sam sljedeće vrste: *Ch. murale*, *Ch. quinoa*, *C. scutellarioides* 'Aurora Black Cherry', *Datura stramonium* L., *G. globosa*, *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana megalosiphon* Van Heurck & Muell. Arg., *N. tabacum*, *Solanum lycopersicum* Dunal 'Rutgers' i *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Korišteni kultivar koleusa 'Aurora Black Cherry' nabavljen je u obliku sjemena. Darovali su ga japanski istraživači dr. sc. Taro Tsushima, i prof. dr. sc. Teruo Sano kao sjeme biljaka u kojima nema ni virusa ni viroida.



Slika 4. Koleusi (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) iz Botaničkog vrta Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Koleus CZ (A) korišten je kao negativna kontrola, a Vn (B) je inficiran virusom venske nekroze koleusa (*Coleus vein necrosis virus*, CVNV) i *Coleus blumei* viroidom 3 te je služio kao pozitivna kontrola.

Koristio sam i sjeme više različitih koleusa, nekih inficiranih s CVNV-om i/ili CBVd-3, a nekih neinficiranih, koje je prikupljeno u razdoblju od 2016. do 2021. godine. Uzorci označeni kao S1 i S2 prikupljeni su od zdravih koleusa 2016. i 2017. godine, uzorak S3 prikupljen je od inficirane biljke (Vn) 2016. godine, uzorak S4 prikupljen je 2021. godine od zdravog koleusa (CZ), a uzorak S5 prikupljen je 2021. od koleusa C1.

3.1.2. Zamrznuti uzorci korišteni u pokusima

Koristio sam i tri uzorka već izolirane RNA čuvane na -20 °C od 2018. godine. Ovi uzorci su dio prijašnjih istraživanja CVNV-a te su dobiveni izolacijom RNA iz tkiva lišća eksperimentalnih biljaka mehanički inficiranih inokulumom dobivenim od koleusa Vn. Uzorci koje sam ja koristio

bili su: #1, izolirana RNA iz lišća biljke *N. benthamiana* za koju je u prijašnjim istraživanjima potvrđeno da je pozitivna na CVNV te je i sekvenciran njegov gen za kapsidni protein; #2, izolirana RNA iz lišća biljke *Ch. murale* pozitivne na CVNV (sekvenciran CP-gen) i #4, izolirana RNA iz lišća biljke *G. globosa* pozitivne na CVNV, ali amplikon CP-gena nije bio sekvenciran. Ovi uzorci su prvenstveno korišteni kao pozitivne kontrole, ali je CVNV-CP-amplikon iz uzorka #4 u sklopu ovog istraživanja i sekvenciran.

3.1.3. Materijali za mehaničku inokulaciju

- Sörensonov pufer (0,06 M, pH 7,0)
- Natrijev askorbat
- Prah od karborunduma

3.1.4. Materijali za transmisijsku elektronsku mikroskopiju

- 1 %-tna otopina glutaraldehida u natrijevom kakodilatnom puferu (0,05 M, pH 7,2)
- 1 %-tna otopina osmijevog tetroksida u natrijevom kakodilatnom puferu (0,05 M, pH 7,2)
- Natrijev kakodilatni pufer (0,05 M, pH 7,2)
- Serijska razrjeđenja etanola (96%, 80%, 70%, 60% i 50%)
- 100%-tni etanol
- 100%-tni aceton
- Epoksidna smola Spurrrovo sredstvo
- 2%-tni uranil acetat
- 2%-tni olovni citrat

3.1.5. Materijali za izolaciju RNA

- TRI Reagent®, SigmaAldrich, SAD
- Kloroform
- 2-propanol
- 70 %-tni etanol

- Voda bez RNaza

3.1.6. Materijali za vanjsku sterilizaciju sjemena

- 70 %-tni etanol
- Izosan® G, PLIVA, Hrvatska

3.1.7. Komercijalni komplet za tretman uzoraka DNazom – RQ1 RNase-Free DNase, Promega, SAD

- RQ1 DNase 10X reakcijski pufer
- RQ1 DNase Stop Solution
- RQ1 RNase-Free DNase

3.1.8. Komercijalni komplet za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, Invitrogen, SAD

- Mješavina enzima reverzne transkriptaze SuperScript™ III RT i DNA-polimeraze Platinum™ Taq
- 2X koncentrirani reakcijski pufer

3.1.9. Materijali za elektroforezu u agaroznom gelu

- 10X koncentrirani TBE-pufer, pH 8,3
- Agaroz, SigmaAldrich, SAD
- SYBR™ Safe DNA Gel Stain, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, SAD
- DNA Gel Loading Dye (6X), Thermo Scientific, SAD
- Markeri za određivanje veličine fragmenta DNA u gelu
 - phiX174 DNA/BsuRI (*HaeIII*) Marker, 9, Thermo Scientific, SAD
 - 50 bp DNA Ladder, New England Biolabs, SAD

3.1.10. Računalni programi i resursi korišteni za analizu nukleotidnih sljedova i izradu filogenetskih stabala

- AliView (Larsson 2014), verzija 1.20, <https://ormbunkar.se/aliview/> - program za poravnanje i uređivanje sljedova
- MEGA 7 (Kumar i sur. 2016), verzija 7.0.26, <https://www.megasoftware.net/> - program za filogenetsku analizu i izradu filogenetskih stabala
- FigTree (Rambaut 2018), verzija 1.4.4, <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> - program za uređivanje filogenetskih stabala
- BLAST[®] (Altschul i sur. 1990), <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - online alat za pretragu i poravnanje nukleotidnih sljedova pohranjenih u bazi podataka nukleotidnih sljedova GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Nukleotidni sljedovi korišteni za filogenetske analize i izradu stabala navedeni su i objašnjeni u Tablici 2.

Tablica 2. Nukleotidni sljedovi korišteni u filogenetskim analizama.

GenBank pristupni broj	Oznaka	Opis	Referenca
DQ915963	DQ915963	Nukleotidni slijed zadnjih ~2000 nukleotida na 3'-kraju genoma CVNV- a, uključujući i gen za kapsidni protein	Mollov i sur. 2007
EF527260	EF527260	Kompletni nukleotidni slijed genoma CVNV-a	Kraus i sur. 2008
-	ABC	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz koleusa 'Aurora Black Cherry'	Škorić i sur. neobjavljeno
-	No6	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz koleusa	Škorić i sur. neobjavljeno
-	Chm	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz <i>Ch. murale</i>	Škorić i sur. neobjavljeno
-	Vn	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz koleusa Vn	Škorić i sur. neobjavljeno
-	Cha	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz <i>Ch. amaranticolor</i>	Škorić i sur. neobjavljeno

Tablica 2. Nastavak.

GenBank pristupni broj	Oznaka	Opis	Referenca
-	Nb	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz <i>N. benthamiana</i>	Škorić i sur. neobjavljeno
-	EtqD1	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz koleusa	Škorić i sur. neobjavljeno
-	EtQD2	Slijed CVNV-a dužine oko 300 nukleotida regije gena za kapsidni protein iz koleusa	Škorić i sur. neobjavljeno
MN450069	CLV_CP	Kompletni nukleotidni slijed genoma CLV-a (<i>Carnation latent virus</i>)	Jordan i sur. 2021

3.2. Metode

3.2.1. Biološki testovi

Biološke testove proveo sam u više navrata mehaničkom inokulacijom eksperimentalnih biljaka. Inokulacije sam izvršio s inokulumom dobivenim od tkiva lišća koleusa C1. Otprilike 1 gram tkiva simptomatskog lišća homogenirao sam u sterilnom tarioniku s tučkom u otprilike 10 mL Sörensonovog pufera (0,06 M, pH 7,0) uz dodatak oko 200 mg antioksidansa natrijevog askorbata. Pufer i antioksidans štite prisutne virusne čestice od degradacije uslijed promjene pH i oslobađanja raznih enzima iz vakuola homogeniranih biljnih stanica. Dva ili tri lista na svakoj eksperimentalnoj biljci posuo sam prahom karborunduma te sam inokulacijskim štapićem jednu kapljicu inokuluma lagano protrljao po posutim listovima. Čestice

karborunduma stvaraju mikroskopska oštećenja na listovima i omogućuju ulazak virusnih čestica iz inokuluma u stanice biljke. Nakon inokulacije, sve sam biljke isprao destiliranom vodom kako bih uklonio višak karborunduma i inokuluma s površine listova.

U prvom sam navratu, u listopadu 2020. godine inokulirao 15 eksperimentalnih biljaka 7 različitih vrsta: *Ch. murale*, *Ch. quinoa*, *D. stramonium*, *G. globosa*, *N. benthamiana* i *N. glutinosa* u duplikatu te *N. megalosiphon* u triplicatu. Zatim sam, u studenom 2020., u drugom navratu inokulirao 13 eksperimentalnih biljaka 5 različitih vrsta: *C. scutellarioides* 'Aurora Black Cherry', *N. clevelandii*, *N. tabacum* i *V. unguiculata* u duplikatu te *S. lycopersicum* 'Rutgers' u pentaplikatu.

U studenom 2020. izvršene su i inokulacije setova od po 14 biljaka inokulumom dobivenim od koleusa C2 i Vn. Biljke svih skupina pratio sam do mjesec dana nakon inokulacije. One biljke koje su razvile simptome održavane su i duže te su od njih prikupljeni uzorci, dok biljke bez simptoma nisu dalje promatrane i više nisu korištene u eksperimentu. Uzorke sam prikupio od simptomatičnih biljaka u obliku jednog ili više ubranih listova.

3.2.2. Transmisijska elektronska mikroskopija prereza listova inficiranih biljaka

Priprema uzoraka i sama transmisijska elektronska mikroskopija provedene su u sklopu praktikuma kolegija elektronska mikroskopija u grupi od 3 studenta i uz pomoć nastavnika. Od koleusa C1 i Vn uzeo sam po jedan list za analizu elektronskom mikroskopijom.

Sa svakog smo lista odrezali komad tkiva veličini otprilike 1 x 1 cm te taj komad narezali na komadiće veličine otprilike 1 x 1 mm. Komadiće tkiva smo fiksirali na ledu u 1,5 mL 1%-tne otopine glutaraldehida u 0,05 M kakodilatnom puferu u trajanju od sat vremena. Glutaraldehyd ima ulogu fiksativa jer unakrsno povezuje amino-skupine u proteinima te na taj način pomaže očuvanju struktura uzorka što sličnijima živom uzorku. I dalje na ledu, uzorke smo isprali u 0,05 M kakodilatnom puferu 2 puta u trajanju od po 10 minuta te ih postfiksirali u 1,5 mL 1%-tne otopine osmijevog tetroksida u 0,05 M kakodilatnom puferu u trajanju od sat vremena. Osmijev tetroksid dodatno fiksira uzorak tako što reagira s nezasićenim masnim kiselinama i oksidira njihove dvostruke veze, ali ujedno služi i kao kontrastno sredstvo. Nakon postfiksacije uzorke smo ispirali destiliranom vodom u trajanju od 10 min, također na ledu. Uzorke smo zatim na sobnoj temperaturi dehidrirali serijom 10 minutnih inkubacija u 1,5 mL

etanola rastućih koncentracija (50%, 60%, 70%, 80%, 96%) te ih na kraju ostavili u 100%-tnom etanolu preko noći.

Sljedećeg smo dana uzorke infiltrirali prijelaznim sredstvom, acetonom, inkubacijom u otopini 750 μ L 100%-tnog etanola i 750 μ L 100%-tnog acetona u trajanju od 30 minuta te zatim inkubacijom u 1,5 mL 100%-tnog acetona, također u trajanju od 30 minuta. Ovaj korak je važan jer se sredstvo za dehidraciju, etanol, zamjenjuje acetonom koji se znatno bolje miješa sa sredstvom za uklapanje. Zatim smo uzorke infiltrirali sa sredstvom za uklapanje, odnosno epoksidnom smolom Spurrovim sredstvom tako što smo uzorke inkubirali po 30 minuta u mješavini 500 μ L Spurrovog sredstva i 1 mL acetona (omjer 1:2), zatim u mješavini 750 μ L Spurrovog sredstva i 750 μ L acetona (omjer 1:1) pa u mješavini 1 mL Spurrovog sredstva i 500 μ L acetona (omjer 2:1). Na kraju smo uzorke uronjene u čisto Spurrovo sredstvo inkubirali u peći na temperaturi od 42 °C u trajanju od 2 sata. Nakon ove inkubacije uzorke smo stavili u kalup te ih prekrili Spurrovim sredstvom i ostavili u peći tri dana na 65 °C. Na ovoj temperaturi smola polimerizira te nastaje kruti matriks smole koji je pogodan za izradu prereza uzoraka.

Polutanke prereze uzoraka staklenim nožem napravili smo koristeći ultramikrotom Sorvall MT6000-XL (RMC, Njemačka) te ih obojali toluidinskim modrilom i analizirali svjetlosnom mikroskopijom kako bismo utvrdili kvalitetu prereza. Ultratanki prerezi su zatim izrađeni na istom ultramikrotomu te su stavljeni na bakrene mrežice prevučene formvar-folijom naparenom ugljikom. Zbog vremenskog ograničenja praktikuma zatim je samo po jedan prerez od svake biljke pozitivno kontrastiran 2%-tnim uranil acetatom i 2%-tnim olovnim citratom te analiziran transmisijским elektronskim mikroskopom Morgagni 268 D (FEI Company, SAD) pri 70 keV.

3.2.3 Izolacija RNA iz biljnog tkiva

Izolaciju RNA napravio sam koristeći TRI Reagent® (SigmaAldrich, SAD) prema protokolu proizvođača. Sterilnim skalpelom odrezao sam i odvagao 150 mg tkiva lišća iz svakog uzorka, zamrznuo ga tekućim dušikom te ih samljeo teflonskim mikrotučkom unutar 2 mL-Eppendorf epruvete. Smrzavanje tekućim dušikom pomaže pri fizičkom usitnjavanju tkiva, ali i pri očuvanju nukleinskih kiselina u uzorku. U nastali prah svakog uzorka dodao sam 1,5 mL TRI Reagent®-a i vorteksirao uzorke. TRI reagent® sadrži gvanidin-tiocijanat i fenol koji pomažu u

razgradnji staničnih struktura i denaturaciji proteina te tako štite nukleinske kiseline u uzorku od enzimske razgradnje. Uzorke sam zatim inkubirao na sobnoj temperaturi 5 minuta pa u svaki dodao 300 μ L kloroforma, ponovno vorteksirao i inkubirao na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim sam uzorke centrifugirao 15 minuta pri 12 000 g na 4 °C te nakon centrifuge odvojio gornju, vodenu fazu koja sadržava otopljenu RNA i premjestio je u nove epruvete, a donju, organsku fazu sam bacio. U vodenu fazu sam nakon toga dodao po 750 μ L 2-propanola, uzorke lagano promiješao okretanjem i inkubirao ih na sobnoj temperaturi 5 minuta. Uzorke sam zatim ponovno centrifugirao 10 minuta pri 12 000 g na 4 °C te sam bacio supernatant. Dodatkom 2-propanola ometaju se vodikove veze između vode i RNA pa se na taj način RNA precipitira i ostaje u talogu nakon centrifugiranja. Epruvete sam ostavio okrenute otvorom prema dolje dok se nije iscijedila sva tekućina, a talog je ostao pričvršćen za dno epruvete. U svaki sam uzorak dodao 500 μ L 70%-tnog etanola radi ispiranja precipitirane RNA, uzorke sam vorteksirao pa centrifugirao 5 minuta pri 12 000 g na 4 °C. Supernatant sam izlio, a epruvete opet ostavio okrenute otvorom prema dolje dok sve vidljive kapljice tekućine nisu iscurile. Uzorke sam zatim stavio na sušenje pod stolnim svjetlom 30 minuta. Kada su se uzorci potpuno osušili, otopio sam talog svakog uzorka u 30 ili 50 μ L vode bez RNaze, ovisno o količini prisutnog taloga. Neke uzorke, ako su imali veliku količinu taloga, ponovno sam centrifugirao 5 minuta pri 12 000 g na 4 °C i supernatant prebacio u novu epruvetu, dok sam preostali talog bacio.

RNA sam izolirao i iz prikupljenog sjemena istim postupkom kao i za tkivo lišća, ali uz prethodnu vanjsku sterilizaciju. Uzorke sjemena sam najprije isprao u 70%-tnom etanolu te ih zatim uronio u 2%-tnu vodenu otopinu izosana® G (PLIVA, Hrvatska) u trajanju od 7 minuta. Otopinu izosana napravio sam otapanjem 2 g izosana u 100 mL destilirane vode. Uzorke sam zatim ispirao destiliranom vodom tri puta po 5 minuta. Nakon što su se uzorci osušili, smrznuo sam ih tekućim dušikom, samljeo u sterilnim tarionicima s tučkom i otopio u 1 mL TRI Reagent®-a. Daljnji postupak bio je isti kao i za uzorke lišća, ali sam dodao 200 μ L kloroforma i 500 μ L 2-propanola zbog manje mase tkiva ovih uzoraka, odnosno zbog manje korištene količine TRI Reagent®-a.

3.2.4. Tretman uzoraka izolirane RNA DNazom

Sve sam uzorke nakon izolacije RNA tretirao DNazom RQ1 DNase (Promega, SAD) prema protokolu proizvođača. U 8 μL svakog uzorka dodao sam 1 μL RQ1 10X reakcijskog pufera i 1 μL RQ1 DNaze. Uzorke sam inkubirao u termobloku 30 minuta na 37 °C. Zatim sam dodao 1 μL RQ1 DNase Stop Solution-a u svaki uzorak te ih inkubirao u termobloku 10 minuta na 65 °C kako bi se DNaza inaktivirala.

3.2.5. Amplifikacija fragmenta gena za kapsidni protein CVNV-a metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom

Regiju gena za kapsidni protein CVNV-a veličine oko 300 baza amplificirao sam iz izoliranih uzoraka RNA tretiranih DNazom koristeći metodu reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Kako bih specifično amplificirao navedenu regiju gena, koristio sam specifične početnice dizajnirane u tu svrhu (Kraus i sur. 2008). Za provedbu metode RT-PCR koristio sam komercijalni set *SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, SAD) uz neke modifikacije proizvođačkog protokola. Ukupni volumen reakcije bio je 25 μL , a reakcijsku sam smjesu pripremio prema podacima u tablici 3. Prije pripreme smjese sve sam potrebne otopine vorteksirao i kratko centrifugirao.

Metodu RT-PCR provodio sam u uređaju SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD) koristeći sljedeći program: reverzna transkripcija, odnosno sinteza cDNA 30 minuta na 60 °C pa denaturacija 2 minute na 94 °C, zatim 35 ciklusa sastavljenih od denaturacije (30 s, 92 °C), prijanjanja početnica (45 s, 55 °C) i sinteze novih lanaca (60 s, 72 °C) te na kraju konačna sinteza novih lanaca u trajanju od 10 minuta na 72 °C.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za provedbu metode RT-PCR za jedan uzorak

Sastojak	Volumen (μL)
2X reakcijski pufer (Invitrogen, SAD)	12,5
Početnica CVNV F	0,5
Početnica CVNV R	0,5
Mješavina enzima SuperScript™ III RT i Platinum™ Taq (Invitrogen, SAD)	1
Voda	9,5
Uzorak (kalup RNA)	1

3.2.6. Analiza RT-PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu

Nakon amplifikacije metodom RT-PCR sve sam produkte analizirao elektroforezom u agaroznom gelu. Elektroforezu sam provodio više puta koristeći 1,8 %-tni agarozni gel volumena 30 mL ili 45 mL. Gel sam priredio otapanjem 540 mg agaroze u 30 mL 1X TBE pufera, odnosno 810 mg agaroze u 45 mL 1X TBE pufera. Kako bi se agaroz potpuno otopila, otopinu sam zagrijavao u mikrovalnoj pećnici dok nije postala potpuno prozirna. Nakon što se gel ohladio na oko 65 °C u gel volumena 30 mL dodao sam 0,6 μL, a u gel volumena 45 mL 0,9 μL boje za vizualizaciju DNA u gelu SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific, SAD). Gel sam uronio u kadu za elektroforezu napunjenu 1X TBE puferom te sam u prvu jažicu svakog gela dodao 1 μL boje za nanošenje uzoraka DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific, SAD) pomiješane s 5 μL markera phiX174 DNA/BsuRI (*HaeIII*) (Marker, 9, Invitrogen, SAD) ili 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs, SAD) za određivanje veličine DNA fragmenata u gelu, dok sam u ostale jažice redom dodavao po 1 μL boje DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific, SAD) pomiješane s po 5 μL RT-PCR produkta. Elektroforezu sam provodio pri konstantom naponu od 110 V u trajanju od jednog sata. Nakon svake elektroforeze gel sam fotografirao na UV-transiluminatoru GVM20 (Syngene, UK) pomoću sustava EOS Utility-Canon i fotoaparata Canon EOS 1000D (Canon, Japan).

3.2.7. Sekvenciranje RT-PCR produkata

Produkte RT-PCR reakcije u kojima se uspješno amplificirao fragment gena za kapsidni protein CVNV-a pripremio sam za sekvenciranje u tvrtki Macrogen Europe B.V. (Nizozemska) prema njihovim uputama. Odredio sam koncentraciju dvolančane DNA u uzorcima mjereći apsorpciju svjetlosti valne duljine 260 nm na uređaju NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, SAD). Svaki sam uzorak razrijedio do konačne koncentracije dvolančane DNA 50 ng/μL te sam za svaki uzorak priredio alikvote volumena 20 μL u duplikatu. Pripremio sam i otopine obje početnice korištene u RT-PCR reakciji razrijeđene do konačne koncentracije 5 pM, a volumena 12 μL. Ovako pripremljene uzorke i početnice poslao sam u tvrtku Macrogen gdje je provedeno standardno Sangerovo sekvenciranje amplikona u oba smjera.

3.2.8. Računalna analiza dobivenih nukleotidnih sljedova i izrada filogenetskog stabla

Od tvrtke Macrogen dobio sam elektroferograme i priložene nukleotidne sljedove mojih uzoraka. Sljedovi svakog uzorka posebno su određeni i jednom (F) i drugom (R) početnicom. Dobivene sam sljedove, prije svih analiza i obrada, poravnao sa sljedovima CVNV-a u bazi GenBank koristeći online alat *nucleotide* BLAST (Altschul i sur. 1990). BLAST-om sam potvrdio da se uistinu radi o sekvencama genske regije kapsidnog proteina CVNV-a. Zatim sam za svaki uzorak u programu AliView (Larsson 2014) učitao nukleotidne sljedove dobivene početnicama F i R, odredio reverzni komplement slijeda dobivenog početnicom R te ga poravnao s drugim slijedom. Uklonio sam početnih i krajnjih 20ak nukleotida sa svakog slijeda kako bi se uklonili sljedovi korištenih početnica te sam dodatno odbacio dijelove na početku i kraju pojedinog slijeda koji nisu bili zastupljeni u slijedu dobivenom sekvenciranjem iz suprotnog smjera. Zatim sam, uspoređujući oba slijeda i odgovarajuće elektroferograme, odredio konsenzus slijed koji sam dalje koristio u analizama. Za jedan uzorak nisam mogao koristiti slijed dobiven početnicom F jer sekvenciranje nije produciralo dobar rezultat pa sam konsenzus slijed odredio pomoću slijeda dobivenog početnicom R, pripadajućeg elektroferograma te usporedbom s ostalim konsenzus sljedovima te javno dostupnim sljedovima u bazi podataka GenBank.

Dobivene konsenzus sljedove u FASTA formatu poravnao sam programom AliView (Larsson 2014) sa sljedovima dostupnim u bazi podataka GenBank te sa sljedovima dobivenim od

prijašnjih, još neobjavljenih istraživanja provedenih u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (Tablica 2.). Nakon poravnavanja odrezao sam krajeve sljedova iz baze i sljedova iz prijašnjih istraživanja kako bi dužina svih sljedova korištenih u daljnjoj filogenetskoj analizi odgovarala dužini mojih sljedova. Osim sljedova genske regije kapsidnog proteina CVNV-a, uvrstio sam i jedan genski slijed ekvivalentne regije kapsidnog proteina latentnog virusa karanfila (*Carnation latent virus*, CLV), rod *Carlavirus*, u svrhu stvaranja vanjske skupine (*outgroup*) u filogenetskoj analizi. Sve sam ove poravnate sljedove učitao u program MEGA 7 (Kumar i sur. 2016) te sam na temelju njih konstruirao filogenetsko stablo metodom najbližeg susjeda (*Neighbour Joining*, NJ) koristeći supstitucijski model Tamura-Nei. Za provjeru točnosti topologije dobivenog stabla koristio sam metodu samoučitavanja (*bootstrap*) s 1000 ponavljanja. Izgled dobivenog filogenetskog stabla uredio sam u programu FigTree (Rambaut 2018).

4. Rezultati

4.1. Biološki testovi

Od ukupno 58 mehanički inokuliranih eksperimentalnih biljaka iz 13 različitih biljnih vrsta simptome je razvilo 10 biljaka iz 3 različite vrste (*C. scutellarioides* 'Aurora Black Cherry', *Ch. murale* i *G. globosa*). Ostalih 46 biljaka (vrste *Ch. quinoa*, *D. stramonium*, *N. benthamiana*, *N. megalosiphon* i *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. tabacum*, *V. unguiculata* i *S. lycopersicum* 'Rutgers') nije razvilo nikakve simptome (Tablica 4.). Svih 10 biljaka koje su razvile simptome bile su inokulirane u studenom 2020. te su simptome razvile tri do četiri tjedna nakon inokulacije, u prosincu, za vrijeme uvjeta kratkog dana. Nijedna biljka inokulirana u listopadu nije razvila simptome pa čak ni biljke istih vrsta kao biljke koje su razvile simptome u kasnijim inokulacijama, na primjer *G. globosa* i *Ch. murale*.

Od biljaka testiranih u studenom iz skupine biotest C1 samo su inokulirani koleusi 'Aurora Black Cherry' razvili simptome. Simptome sam prvi put zabilježio u četvrtom tjednu nakon inokulacije, ali vjerojatno su se inicijalno pojavili u trećem tjednu. Simptomi su bili pojedinačne lokalne nekrotične lezije i deformacija inokuliranih listova (Slika 5.A i 5.B). Ova su dva koleusa dalje održavana u stakleniku te je praćen razvoj njihovih simptoma. Simptomi su od lokalnih prešli u sistemичne u obliku klorotičnog mozaika (Slika 5.C).



Slika 5. Simptomi biotesta na eksperimentalnim domaćinskim koleusima (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) kultivara Aurora Black Cherry inokuliranim infekcijskim sokom koleusa C1 koji sadržava virus venske nekroze koleusa. Pojedine lokalne lezije i deformacije listova (A, B), kasnije prelaze u sistemski klorotični mozaik (C). Simptomi su označeni strelicama.

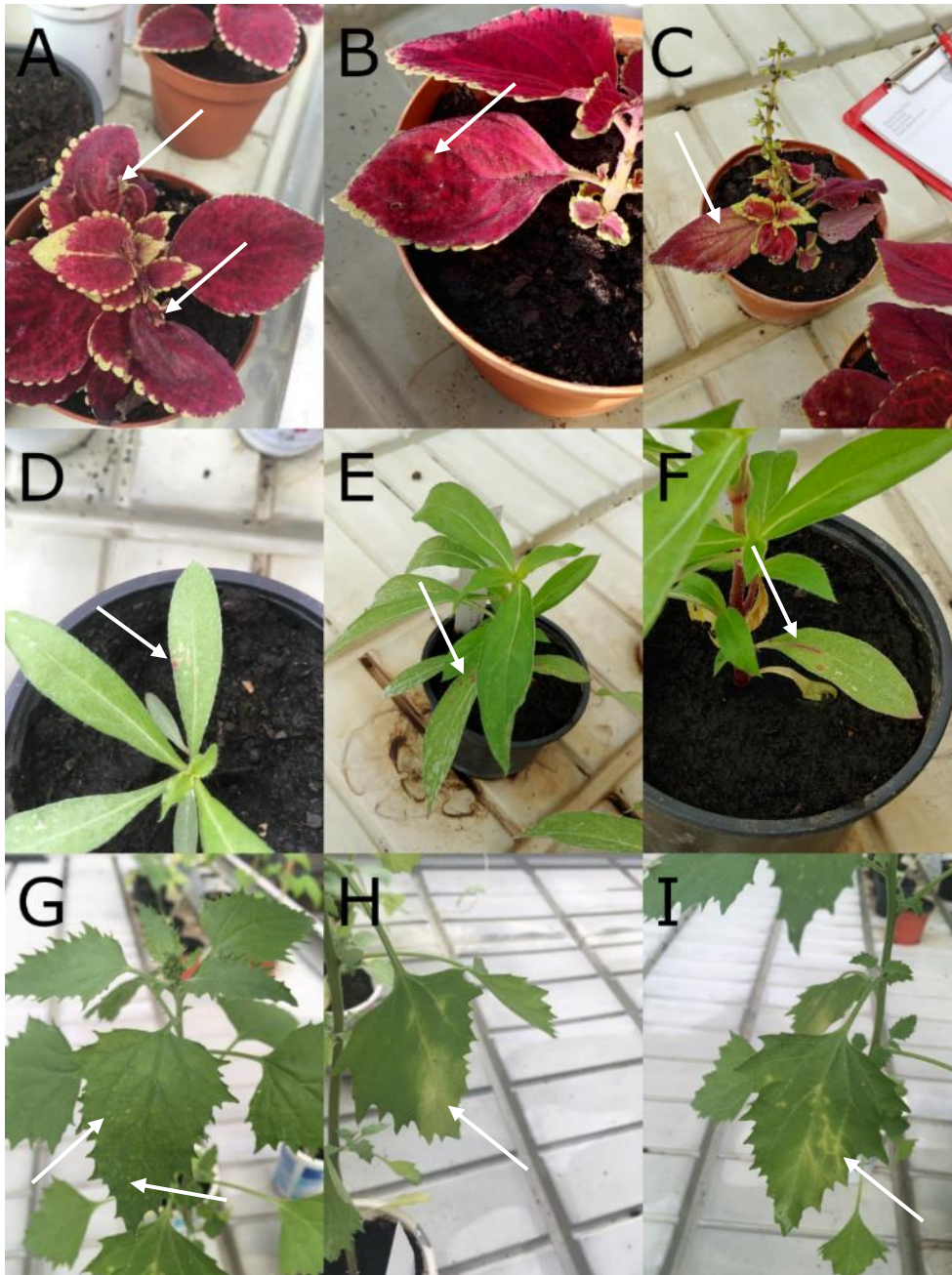
Od biljaka inokuliranih u studenom iz skupine biotest C2, simptome su razvili jedan koleus 'Aurora Black Cherry' i dvije biljke vrste *G. globosa*. Drugi koleus iz ove skupine je uginuo prije pojave simptoma. Simptomi su se na koleusu pojavili u trećem tjednu nakon inokulacije te su započeli kao pojedinačne točkaste lezije, a zatim su prešli u sistemski klorotični mozaik (Slika 6.A i 6.B). Simptomi na biljkama vrste *G. globosa* prvo su uočeni u četvrtom tjednu nakon inokulacije kao pojedinačne lokalne lezije te su prešli u mnogobrojne sistemske lezije (Slika 6.C).

U trećem setu biljaka u studenom, biotest Vn, simptome su razvila dva koleusa 'Aurora Black Cherry', dvije biljke vrste *G. globosa* i jedna od dvije biljke vrste *Ch. murale*. Simptomi na koleusima započeli su u trećem tjednu nakon inokulacije kao pojedinačne lokalne lezije i deformacije inokuliranih listova te su zatim prešli u sistemske lezije, deformaciju listova i

klorotični mozaik. U jednom od dva koleusa očitovao se kržljavi rast i masovno otpadanje listova (Slika 7.A-C). Na biljkama vrste *G. globosa* u četvrtom tjednu nakon inokulacije pojavili su se prvi simptomi u obliku lokalnih lezija koji su prešli u sistemične lezije i nekroze uz žile lista (Slika 7.D-F). Biljka vrste *Ch. murale* razvila je simptome u trećem tjednu nakon inokulacije, a simptomi su uključivali lokalne i sistemične klorotične lezije, sistemični klorotični mozaik te kloroze uz žile listova (Slika 7.G-I).



Slika 6. Simptomi biotesta na eksperimentalnim domaćinskim koleusima (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) kultivara Aurora Black Cherry i domaćinima vrste *Gomphrena globosa* (C – sistemične lezije) inokuliranim infektivnim sokom koleusa C2 koji sadržava virus venske nekroze koleusa. Simptomi su označeni strelicama.



Slika 7. Simptomi biotesta na 2 eksperimentalna koleusa (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth. 'Aurora Black Cherry') (A – deformacije listova, B – pojedinačne lokalne lezije i C – sistemski mozaik, opadanje listova, kržljivost), na dvije biljke *Gomphrena globosa* (D – pojedinačne lokalne lezije, E – sistemske lezije i F – kloroza uz žile) i jednoj biljci *Chenopodium murale* (G – sistemske lezije, H – sistemski mozaik i I – kloroza uz žile). Inokulum je dobivenim od koleusa Vn, biljke inficirane *Coleus blumei* viroidom 3 i virusom venske nekroze koleusa. Simptomi su označeni strelicama.

Tablica 4. Rezultati biotestova različitih izolata virusa venske nekroze koleusa mehaničkom inokulacijom skupina različitih vrsta eksperimentalnih biljaka.

Vrsta	Broj biljaka	Simptomi +/-
Biotest C1 – 10. mjesec 2020.		
<i>Ch. murale</i>	2	-
<i>Ch. quinoa</i>	2	-
<i>D. stramonium</i>	2	-
<i>G. globosa</i>	2	-
<i>N. benthamiana</i>	2	-
<i>N. glutinosa</i>	2	-
<i>N. megalosiphon</i>	3	-
Biotest C1 – 11. mjesec 2020.		
<i>C. scutellarioides</i> 'Aurora Black Cherry'	2	+
<i>N. clevelandii</i>	2	-
<i>N. tabacum</i>	2	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	5	-
<i>V. unguiculata</i>	2	-
Biotest C2 – 11. mjesec 2020.		
<i>C. scutellarioides</i> 'Aurora Black Cherry'	2	+
<i>Ch. murale</i>	2	-
<i>Ch. quinoa</i>	1	-
<i>Datura stramonium</i>	2	-
<i>G. globosa</i>	2	+
<i>N. clevelandii</i>	1	-
<i>N. megalosiphon</i>	1	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	2	-
<i>V. unguiculata</i>	2	-

Tablica 4. Nastavak.

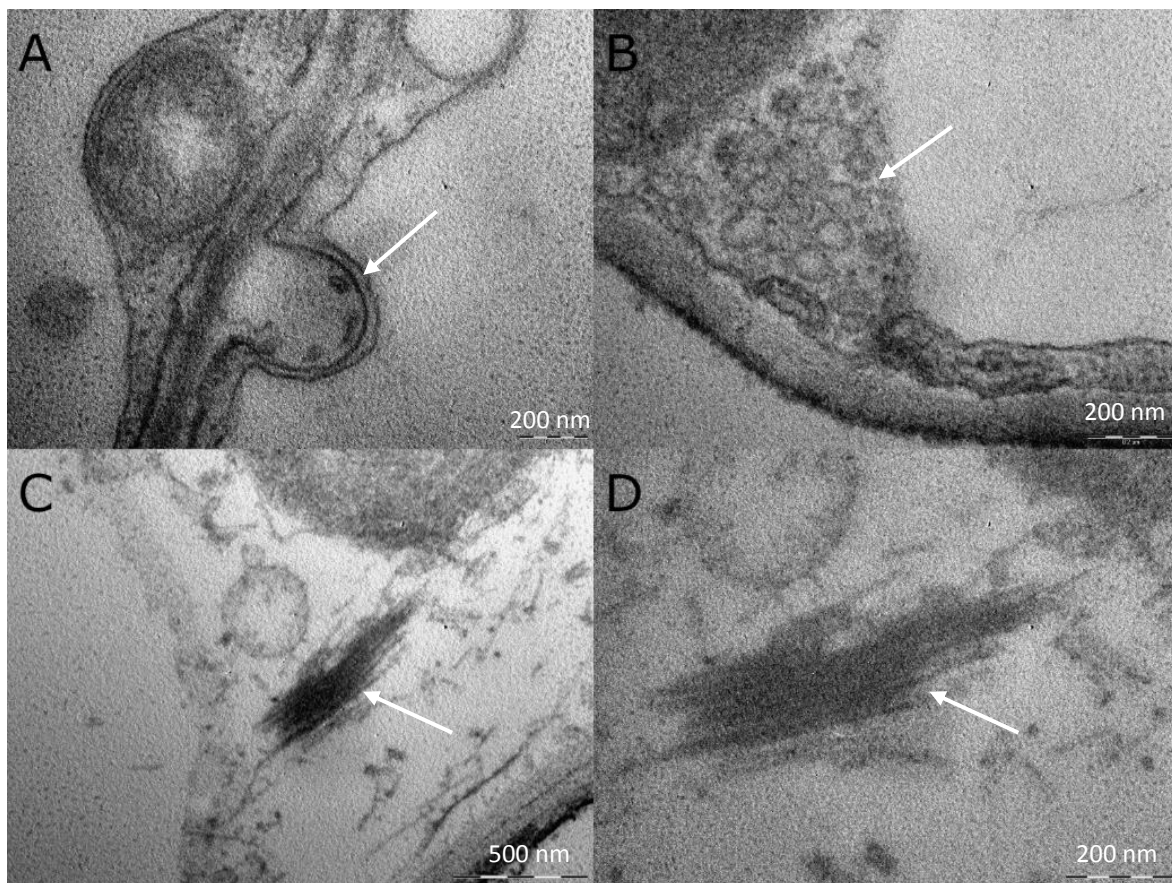
Vrsta	Broj biljaka	Simptomi +/-
Biotest Vn – 11. mjesec 2020.		
<i>C. scutellarioides</i> 'Aurora Black Cherry'	2	+
<i>Ch. murale</i>	2	+
<i>Ch. quinoa</i>	1	-
<i>Datura stramonium</i>	2	-
<i>G. globosa</i>	2	+
<i>N. clevelandii</i>	1	-
<i>N. megalosiphon</i>	1	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	2	-
<i>V. unguiculata</i>	2	-

4.2. Transmisijaska elektronska mikroskopija

Po jedan ultratanki prerez lista biljaka Vn i C1 pozitivno je kontrastiran i analiziran transmisijskom elektronskom mikroskopijom. Prerez biljke Vn nije bio dobre kvalitete. Vidljiv je bio samo malen broj stanica lista s malo unutarstaničnih struktura te nisu uočeni ni virusi ni moguće citopatološke promjene uzrokovane virusnom infekcijom. Prerez lista biljke C1 bio je dobre kvalitete, bio je vidljiv veliki broj stanica i brojne unutarstanične strukture.

Osim normalnih staničnih struktura, uočili smo i neke strukture koje bi mogle biti znak citopatoloških promjena uzrokovanih virusnom infekcijom. Uočili smo invaginaciju membrane s tamnim strukturama u unutrašnjosti (Slika 8.A). Ova struktura mogla bi biti sferula, membranska struktura uzrokovana interakcijama virusnih proteina sa staničnim membranama u kojima se mnogi virusi repliciraju (Diaz i Ahlquist 2012). Također, u citoplazmi u blizini jezgre uočili smo veliki broj međusobno povezanih membranskih vezikula (Slika 8.B). Ovo bi moglo biti multivezikularno tjelešce, membranska struktura, također uzrokovana interakcijama virusnih proteina i staničnih membrana koja može služiti kao sigurno mjesto za replikaciju virusa (Verchot 2011) ili je uzrokovana imunosnim odgovorom biljke na infekciju (Li i sur. 2018).

Osim citopatoloških učinaka, uočili smo u regiji citoplazme strukturu koja bi mogla biti agregat virusnih čestica te strukture koje bi mogle biti pojedinačne virusne čestice u blizini agregata (Slika 8.C i 8.D). Filamentoznim oblikom i veličinom od 500 do 700 nm, ove strukture odgovaraju virusima iz nekoliko porodica i rodova među kojima su i virusi roda *Carlavirus* kao što je i CVNV (Mollov i sur. 2007).



Slika 8. Transmisijnska elektronska mikroskopija ultratankog prereza lista simptomatičnog koleusa C1 (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.). Vidljivi su mogući citopatološki učinci infekcije virusom – membranske strukture poput sferule (A) i multivezikularnog tjelešca (B). Strukture nalik na agregate filamentoznih virusnih čestica i pojedinačne virusne čestice oko agregata (C i D) oblikom i veličinom odgovaraju virusu venske nekroze koleusa.

4.3. Amplifikacija regije gena za kapsidni protein metodom RT-PCR i analiza RT-PCR produkata elektroforezom u agaroznom gelu

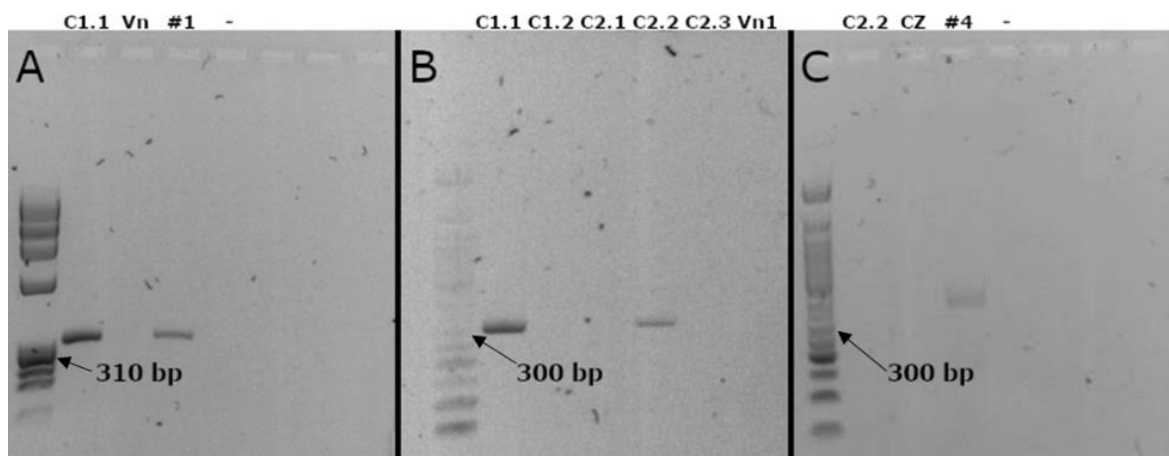
Sve uzorke koje sam dobio nakon izolacije RNA i tretmana DNazom testirao sam na prisutnost CVNV-a metodom RT-PCR u više navrata. Samo su četiri uzorka, nakon detekcije produkta elektroforezom u 1,8%-tnom agaroznom gelu, dala pozitivne rezultate (Tablica 5.). Pozitivni su bili uzorak C1.1, tj. izolirana RNA iz koleusa C1, odnosno reznice simptomatične biljke iz Botaničkog vrta unesene i održavane u stakleniku; uzorak C2.2, izolirana RNA iz dvije biljke vrste *G. globosa* inokulirane u studenom 2020. inokulumom dobivenim od biljke koleus C2; uzorak #1, odnosno pozitivna kontrola izolirana iz biljke *N. benthamiana* koja je 2018. inokulirana CVNV-om originalno iz koleusa Vn u okviru biotesta; te uzorak #4, pozitivna kontrola izolirana iz biljke *G. globosa* koja je također 2018. godine inokulirana CVNV-om iz koleusa Vn. Nijedan uzorak sjemena nije bio pozitivan. Regija gena amplificirana metodom RT-PCR veličine je oko 300 baznih parova što je u skladu s veličinom amplikona koji su prisutni u gelu nakon elektroforeze pozitivnih RT-PCR produkata (Slika 9.) Gelovi koji nisu imali pozitivne rezultate nisu prikazani.

Tablica 5. Popis uzoraka testiranih na CVNV (*Coleus vein necrosis virus*) metodom RT-PCR usmjerenom na regiju gena za kapsidni protein i prisutnost amplificiranog RT-PCR produkta detektiranog elektroforezom u 1,8%-tnom agaroznom gelu.

Uzorak	Izvor uzorka / biotest	Prisutnost amplificiranog RT-PCR produkta
		detektiranog elektroforezom Pozitivno (+) / Negativno (-)
C1.1	Koleus C1	+
C1.2	Biotest C1 koleus	-
C1.3	Biotest C1 koleus	-
C2.1	Koleus C2	-
C2.2	Biotest C2 <i>G. globosa</i>	+
C2.3	Biotest C2 koleus	-
Vn	Koleus Vn	-
Vn1	Biotest Vn <i>Ch. murale</i>	-

Tablica 5. Nastavak.

Uzorak	Izvor uzorka / biotest	Prisutnost amplificiranog RT-PCR produkta
		detektiranog elektroforezom Pozitivno (+) / Negativno (-)
Vn2	Biotest Vn <i>G. globosa</i>	-
Vn3	Biotest Vn <i>G. globosa</i>	-
Vn4	Biotest Vn koleus	-
Vn5	Biotest Vn koleus	-
Vn6	Biotest Vn koleus	-
Vn7	Biotest Vn koleus	-
S1	Sjeme zdravog koleusa	-
S2	Sjeme zdravog koleusa	-
S3	Sjeme koleusa Vn	-
S4	Sjeme koleusa CZ	-
S5	Sjeme koleusa C1	-
#1	Biotest Vn <i>N. benthamiana</i> iz 2018.	+
#2	Biotest Vn <i>Ch. murale</i> iz 2018.	-
#4	Biotest Vn <i>G. globosa</i> iz 2018.	+
CZ	Koleus CZ	-



Slika 9. Fragmenti gena za kapsidni protein virusa venske nekroze koleusa (CVNV) amplificirani metodom RT-PCR iz izolata RNA dobivenog iz tkiva lišća inokuliranih eksperimentalnih biljaka i izvorno inficiranih biljaka (oznake uzoraka u Tablici 3.). Kao molekularni standardi korištene su PhiX174 DNA/BsuRI (*HaeIII*) (Marker 9, Invitrogen, SAD) (A), odnosno 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs, SAD) (B i C). Slike gelova su izrezane te uređene pojačavanjem kontrasta i inverzijom boja kako bi se postigla bolja vidljivost.

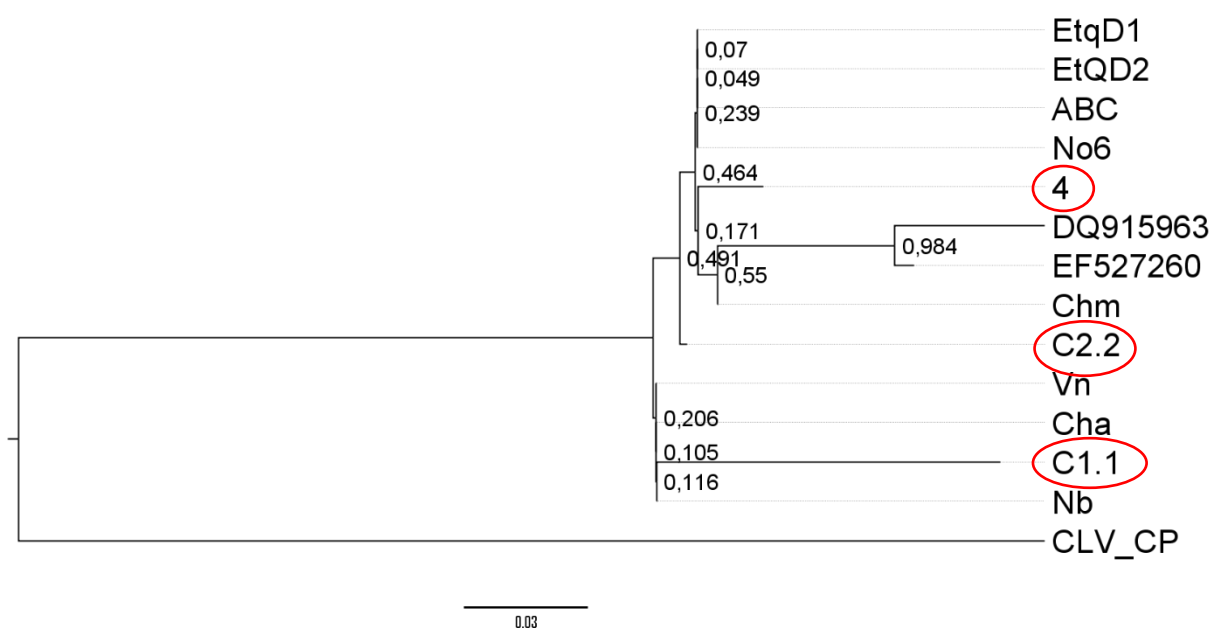
4.4. Sekvenciranje, analiza nukleotidnih sljedova i izrada filogenetskog stabla

RT-PCR produkti pozitivnih uzoraka C1.1, C2.2 i #4 poslani su na sekvenciranje u tvrtku Macrogen Europe B.V (Nizozemska). Konsenzus sljedove za uzorke C1.1 i C2.2 odredio sam usporedbom sljedova dobivenim početnicama F i R te pripadnim elektroferogramima, dok sam konsenzus slijed uzorka #4 odredio samo pomoću slijeda dobivenog početnicom R, pripadnog elektroferograma i usporedbom s ostalim dostupnim sljedovima jer je slijed dobiven početnicom F bio vrlo loše kvalitete. Dobiveni slijed za uzorak C1.1 veličine je 184 nukleotida, dok su sljedovi uzoraka C2.2 i #4 veličine 200 nukleotida (Tablica 6.). Za sljedove iz uzoraka #4 i C2.2 zatražio sam i dobio i pristupne brojeve u bazi GenBank (redom MZ464036 i MZ464037). Poravnao sam sve sljedove dostupne iz baze GenBank (pristupni brojevi: EF527260, Kraus i sur. 2008; DQ915963, Mollov i sur. 2007), još neobjavljene sljedove iz prijašnjih istraživanja i sljedove 3 uzorka iz ovog istraživanja te sam napravio filogenetsko stablo (Slika 10.). Kao vanjsku skupinu (eng. *outgroup*) koristio sam odgovarajuću regiju gena za kapsidni protein CLV-a, roda *Carlavirus*. Sljedovi moja 3 uzorka, C1.1, C2.2 i #4 grupiraju se s ostalim sljedovima CVNV-a, dok je slijed CLV-a kao vanjska skupina zasebno. Iz toga se može

zaključiti da se u mojim uzorcima nalazi CVNV. Vrijednosti samoučitavanja (eng. *bootstrap*) za većinu grana na stablu nisu statistički značajne pa ne možemo sa sigurnošću odrediti filogenetske odnose pojedinih izolata u granama.

Tablica 6. Nukleotidni sljedovi regije gena za kapsidni protein virusa venske nekroze koleusa (*Coleus vein necrosis virus*, CVNV) određeni iz pozitivnih uzoraka.

Uzorak	Nukleotidni slijed (5' – 3')
C1.1	AACTTCACGTCAGAAGCCTTGGACATCATCACTGCACAGGAGCAGGCTACAATG ATGGCCAAGTTGGTTGGTTTGGGTGTGCCACCGCATCGCGCAGCGCCACTCTGC TGGAGCATTGCACGGTACAGTGCCGACACGCGTTCTTCTGCCTTCGCAGATCCA AAAGTTACCTTTGAGATATCGA
C2.2	CACGCCATGAACTTCAAGTCAGAAGCCTTGGACATCATCACTGCACAGGAGCAG GCTACAATTATGGCCAAGTTGGTTGGTTTGGGTGTGCCACCGCAGAGCGCAGC CCCACTCTGCTGGAGCATTGCAAGGTACTGCGCCGACACGAGTTCTTCTGCCTTC GCAGATCCAAAAGGTACCTTTGAGTTTCAGGGTGGGGC
#4	CACGCCATGAACTTCAAGTCAGAAGCCTTGGACATCATCACTGCACAGGAGCAG GCTACAATTATGGCCAAGTTGGTTGGTTTGGGTGTGCCACCGCAGAGCGCAGC CCCACTCTGCTGGAGCATTGCAAGTTACTGCGCCGACACGAGTTCTTCTGCCTTC GCAGATCCAAAAGGTACTTTTGTGTCGAGGGCGGTGC



Slika 10. Filogenetsko stablo izolata CVNV-a (*Coleus vein necrosis virus*) izrađeno na temelju nukleotidnog slijeda regije gena za kapsidni protein koristeći metodu najbližeg susjeda (Neighbour joining, NJ), supstitucijski model Tamura-Nei uz metodu samoučitavanja (eng. *bootstrap*) s 1000 ponavljanja. Na čvorovima stabla prikazane su „*bootstrap*“-vrijednosti. Kao vanjska skupina korištena je odgovarajuća regija gena za kapsidni protein CLV-a (*Carnation latent virus*), rod *Carlavirus*. Izolati sekvencirani u ovom istraživanju zaokruženi su crvenom bojom. Oznake ostalih sljedova objašnjene su u Tablici 2.

5. Rasprava

5.1. Biotest

Sve biljne vrste koje su u ovom istraživanju nakon mehaničke inokulacije CVNV-om razvile simptome, već su bile poznate kao domaćini CVNV-a pa se poznati krug domaćina nije proširio (Mollov i sur. 2007; Kraus i sur. 2008; Škorić i sur. 2018). Sami simptomi – točkaste lokalne i sistemične lezije, mozaici, deformacije listova i nekroze ili kloroze uz žile, već su viđeni na eksperimentalnim biljkama u prijašnjim istraživanjima. Također sam potvrdio i uvjete u kojima se javljaju simptomi – tri do četiri tjedna nakon inokulacije u uvjetima kratkog dana (Mollov i sur. 2007, Škorić i sur. 2018).

Biljne vrste *Ch. quinoa* (Kraus i sur. 2008), *N. benthamiana*, *N. clevelandii* i *N. tabacum* (Mollov i sur. 2007, Škorić i sur. 2018), koje su u prijašnjim istraživanjima pokazane kao domaćini CVNV-a, u ovom istraživanju nisu pokazivale simptome infekcije. Ovaj je efekt već viđen s nekima od tih vrsta. Vrsta *Ch. quinoa* je u jednom istraživanju uspješno služila kao indikatorska biljka (Kraus i sur. 2008), dok u drugom nije (Mollov i sur. 2007). Moguće je da su neke biljke bile uspješno inficirane bez da su razvile simptome pa kao takve nisu dalje istraživane u ovom radu. Cilj biološkog testiranja usporedba je simptoma i određivanje prisutnosti infektivnog agensa pa testiranje asimptomatskih biljaka nije uobičajeno (González-Garza 2017). Također, moguće je da ovaj put te biljne vrste nisu bile uspješno inficirane zbog razlika među izolatima CVNV-a, zbog razlike u okolišnim uvjetima ili zbog razlika genotipova korištenih biljaka. Kompleksne interakcije okolišnih uvjeta, genotipa virusa i domaćinskih biljaka koje utječu na razvoj simptoma i tijek infekcije poznate su kod raznih drugih biljaka, odnosno njihovih virusa (Fletcher i MacNeill 1971). Za CVNV su također poznati neki okolišni uvjeti, poput uvjeta kratkog dana, koji pogoduju razvoju simptoma na inficiranim biljkama (Mollov i sur. 2007, Škorić, usmeno priopćenje). U ovom sam istraživanju uvjete kratkog dana potvrdio kao pogodne za razvoj simptoma na inokuliranim eksperimentalnim biljkama. Biljke vrsta *G. globosa* i *Ch. murale* su u različitim inokulacijama u ovom istraživanju različito reagirale. Budući da u prvoj inokulaciji u listopadu nisu razvile simptome, a u kasnijim inokulacijama u studenom jesu, moguće objašnjenje te razlike vjerojatno je utjecaj uvjeta kratkog dana i/ili snižene temperature u kasnijim mjesecima u godini. Također, biljke vrste *Ch. murale* pokazivale su simptome nakon inokulacije izolatom Vn, ali ne izolatima C1.1 i C2.2. Razlike u pojedinim izolatima, uz utjecaj razlika okolišnih uvjeta mogle bi objasniti ove rezultate.

Uz sve ove mogućnosti, razlike u razvoju simptoma moguće su još i zbog prirodne varijabilnosti i nasumične prirode virusnih infekcija. Za neke je viruse dovoljna infektivna doza vrlo mala, samo nekoliko virusnih čestica, dok je za neke znatno veća (Ali i sur. 2006; Moury i sur. 2007; Zwart i Elena 2015) pa je moguće da u tim slučajevima nije dovoljno virusnih čestica dospjelo u stanice da bi se razvila infekcija. Bez specifičnog istraživanja kruga domaćina i faktora koji ga određuju, kao i faktora koji određuju učinkovitost mehaničke inokulacije, ne može se sa sigurnošću odrediti uzrok varijacija u razvoju simptoma. Za pravilnu usporedbu kruga domaćina ovih izolata bilo bi potrebno provesti sve inokulacije u isto vrijeme, u isto doba godine na istim setovima eksperimentalnih biljaka, što u ovom istraživanju nije bilo moguće zbog ograničenja raspoloživog staklenika koji ne omogućava sasvim reproducibilne uvjete (fotoperiod, temperatura, vlaga) niti kontinuiranu dostupnost biljnog materijala.

5.2. Analiza prereza listova inficiranih CVNV-om transmisijском elektrоnskom mikroskopijom

Transmisijском elektrоnskom mikroskopijom prereza lista simptomatičnog koleusa uočeni su znakovi infekcije na unutarstaničnoj razini. Viđen je agregat virusnih čestica i pojedinačne čestice oko njega koje morfolоški odgovaraju ranije viđenim pročišćenim česticama CVNV-a (Mollov i sur. 2007; Škorić, osobno priopćenje). Iako dosad nema podataka o elektrоnskoj mikroskopiji tkiva inficiranog CVNV-om, ovakvi agregati često su viđeni u infekcijama s drugim karlavirusima (Brunt i sur. 1983; Brunt i sur. 1976; Edwardson i Chrisite 1978), a slične inkluzije viđene su i kod drugih virusnih porodica, na primjer *Potyviridae* (Rodriguez-Cerezo i sur. 1993). Zapažene membranske strukture nisu toliko siguran pokazatelj infekcije CVNV-om jer su samo rijetko viđene kod karlavirusa (Edwardson i Christie 1978; Mansour i sur. 1998), ali slične strukture su zabilježene kod nekih drugih virusa (Movahed i sur. 2019). Važno je napomenuti da je u ovom istraživanju, zbog ograničenja praktikuma u sklopu kojeg je obavljena elektrоnska mikroskopija, analiziran samo jedan prerez jedne simptomatične biljke pa je iz tako malog uzorka vrlo teško sa sigurnošću izvoditi zaključke.

5.3. Amplifikacija regije gena za kapsidni protein CVNV-a metodom RT-PCT

Metodom RT-PCR sa specifičnim početnicama (Kraus i sur. 2008) koje amplificiraju regiju gena za kapsidni protein CVNV-a testirao sam uzorke izolirane RNA iz koleusa inficiranih u prirodi, simptomatičnih, mehanički inokuliranih eksperimentalnih biljaka u biotestu i nekoliko starih laboratorijskih uzoraka izolirane RNA iz eksperimentalnih biljaka iz 2018. godine koje sam koristio kao pozitivne kontrole. Unatoč prijašnjim uspjesima u provođenju ove metode za detekciju CVNV-a (Kraus i sur. 2008; Škorić, osobno priopćenje), u ovom su istraživanju dobiveni rezultati bili uglavnom negativni. Veliki broj uzoraka, uključujući i pozitivne kontrole, bio je negativan unatoč simptomatičnosti biljaka i prijašnjim pozitivnim rezultatima dobivenih istom metodom na istim kontrolnim uzorcima (Škorić, osobno priopćenje). Nakon kratke optimizacije protokola, samo su 3 uzorka konstantno davala pozitivne rezultate pa su ta tri uzorka korištena u daljnjim analizama (Tablica 5.). Iako je samo mali broj uzoraka bio pozitivan, taj je rezultat bio dovoljan kako bi se molekularnim metodama potvrdila infekcija koleusa iz Botaničkog vrta CVNV-om.

Teško je reći zašto je većina uzoraka opetovano davala negativne rezultate testiranjem RT-PCR-om budući da je metoda provođena više puta na svim uzorcima s različitim komercijalnim setovima uz razne optimizacije protokola (podaci nisu prikazani). Moguće je da su se korištene specifične početnice degradirale, iako je korišteno više različitih alikvota, uključujući i novo pripremljeni alikvot iz matične otopine. Također je moguće da su određene mutacije u regiji gena za kapsidni protein onemogućile prijanjanje početnica, no ovo ne objašnjava negativne rezultate potvrđeno pozitivnih kontrola. Kvaliteta izolirane RNA novih uzoraka možda nije bila adekvatna, osim u dva uzorka koja su opetovano davala pozitivne rezultate, a moguće je i da se, tijekom godina skladištenja, RNA degradirala u pozitivnim kontrolama. Neki od uvjeta koji utječu na rezultate RT-PCR-a su temperatura, trajanje pojedinih koraka reakcije, pogodni odnosi molarnosti komponenata reakcijske smjese, ali i mnogi drugi te je, čak i uz provedene optimizacije protokola, nemoguće odrediti jedan faktor zbog kojeg ova metoda nije bila pouzdana. Vjerojatan je i istodoban učinak više od jednog faktora.

Svi uzorci izolirani iz sjemena koleusa bili su negativni na CVNV. Ovo ukazuje da prijenos CVNV-a sjemenom nije vjerojatan, ali s obzirom na općeniti veliki broj negativnih uzoraka i probleme s metodom RT-PCR, ove negativne rezultate ne možemo uzeti kao sigurne. Kako bi se prijenos sjemenom temeljito istražio trebalo bi provesti i biološke testove, odnosno uzgajati koleuse iz

sjemena zaraženih biljaka te zatim molekularno testirati veći broj takvih biljaka, ali i znatno veći broj uzoraka sjemena.

5.4. Sekvenciranje i filogenetska analiza na temelju nukleotidnog slijeda regije gena za kapsidni protein CVNV-a

Sekvenciranjem nukleotidnog slijeda regije gena za kapsidni protein te usporedbom s poznatim nukleotidnim sljedovima CVNV-a potvrdio sam da uzorci testirani pozitivno metodom RT-PCR uistinu sadrže CVNV. Na filogenetskom stablu, koje sam izradio na temelju nukleotidnog slijeda regije gena za kapsidni protein, jasno se razlikuju dvije skupine sljedova, CVNV i vanjska skupina – CLV (Slika 10.). Većina čvorova stabla unutar skupine CVNV-a ima vrlo niske „*bootstrap*“-vrijednosti koje nisu statistički značajne pa ne možemo izvoditi zaključke o evolucijskim odnosima pojedinih izolata. Dva izolata iz baze GenBank (pristupni brojevi DQ915963, Mollov i sur. 2007; EF527260, Kraus i sur. 2008) posebno su grupirana unutar grupe CVNV-a., što je i očekivano budući da su ti izolati prostorno i vremenski vrlo udaljeni od izolata iz Zagreba jer su izolirani 2007., odnosno 2008. godine u Sjevernoj Americi. Većina izolata iz Zagreba, bilo iz ovog ili iz prijašnjih istraživanja, vrlo se malo razlikuju te nije moguće na temelju ovog filogenetskog stabla razmatrati njihove odnose. Ovo ukazuje na to da novi izolat iz koleusa C2 zapravo potječe iz iste populacije CVNV-a kao i izolati iz prijašnjih istraživanja (Škorić i sur. 2018). Izolat iz koleusa C1 znatno se razlikuje od ostalih izolata.

Jedno moguće objašnjenje tog rezultata je različito porijeklo virusa iz koleusa C1 od ostalih izolata iz Botaničkog vrta. Ovo je objašnjenje ipak manje vjerojatno jer su simptomi na koleusima C1 i C2 primijećeni u isto vrijeme, u rujnu 2020., a CVNV se rijetko nalazi u prirodi (Harlan i Hausbeck 2018). Unatoč tome, izolatom C1.1 uspješno su inokulirana samo dva eksperimentalna koleusa 'Aurora Black Cherry', dok su izolatima C2.2 i Vn, uspješno inokulirane i druge eksperimentalne biljke. Sve su ovo razlike koje potencijalno ukazuju na značajnu razliku između izolata C1.1 i ostalih izolata iz Botaničkog vrta, no kako bismo ovo utvrdili sa sigurnošću, potrebno je provesti dodatna istraživanja ovih izolata. Sekvenciranje cijelog genoma te usporedba izolata na genomskoj razini bila bi poželjna uz dodatna istraživanja bioloških karakteristika.

Još jedno moguće objašnjenje razlika nukleotidnog slijeda izolata C1 u odnosu na ostale izolate iz Botaničkog vrta je razlika u korištenim metodama u ovom i prijašnjim istraživanjima. Sekvence iz prijašnjih istraživanja određivane visoko protočnim sekvenciranjem (*high throughput sequencing*, HTS), a Sangerovim sekvenciranjem gena za kapsidni protein su naknadno potvrđeni rezultati (Škorić i sur. 2018). Svi izolati iz ovog istraživanja sekvencirani su samo Sangerovim sekvenciranjem, ali se sljedovi uzoraka 4 i C2.2, ne razlikuju značajno od prijašnjih izolata. Razlog tome mogao bi biti to što su ovi uzorci dobiveni izolacijom RNA iz mehanički inokuliranih eksperimentalnih biljaka vrste *G. globosa* koje su pokazivale simptome sistemичne infekcije, a sami uzorci su uzeti nedugo nakon pojave simptoma, dok je uzorak C1.1 dobiven izolacijom RNA iz koleusa, prirodnog domaćina CVNV-a, inficiranog u prirodi. Ne možemo znati točno kada je koleus C1 inficiran, ali je uzorak C1.1 svakako prikupljen znatno kasnije od uzoraka 4 i C2.2 u odnosu na početak infekcije u svakom od domaćina. Poznato je da su populacije biljnih virusa izložene brojnim snažnim efektima genetičkog uskog grla (*bottleneck effect*) koji mogu drastično smanjiti veličinu, a time i gensku raznolikost populacije (Zwart i Elena 2015). Efekt genetičkog uskog grla javlja se i prigodom sistemичne infekcije i kretanja virusa kroz biljku (Ali i sur. 2006; Ali i Roossinck 2010; Li i Roossinck 2004), a u određenim domaćinima virusi održavaju manji ili veći stupanj genske raznolikosti u populaciji (Schneider i Roossinck 2000; Schneider i Roossinck 2001). Moguće je da populacije CVNV-a u vrsti *G. globosa* zbog interakcija s biljnim obrambenim mehanizmima održavaju manji stupanj genske raznolikosti ili da se populacija do vremena uzorkovanja nije stigla znatno proširiti nakon „*bottleneck*“-efekta tijekom inokulacije i sistemičnog pokretanja virusa. Ovi su efekti specifični za sustav virus-domaćin (Schneider i Roossinck 2001), a za CVNV još uvijek nisu istraživani. Ovakvo istraživanje trebalo bi provesti uz detaljnu analizu populacijske strukture CVNV-a u prirodnom domaćinu koleusu te u raznim eksperimentalnim domaćinima, poput vrste *G. globosa*. Usporedba virusnih populacija u inicijalno inokuliranim listovima te sistemično inficiranim listovima također bi se trebala provesti za potpunije razumijevanje populacijske strukture CVNV-a tijekom infekcije biljaka.

Međutim, ove razlike su moguće i zbog potpuno nasumičnih posljedica korištenih metoda. Tijekom amplifikacije fragmenta metodom RT-PCR može doći do nasumičnih pogrešaka u nastalom nukleotidnom slijedu, no ovo ne objašnjava malu razliku viđenu u uzorcima C2.2 i 4. Budući da se u uzorku radi o heterogenoj populaciji fragmenata DNA, elektroferogram dobiven

Sangerovim sekvenciranjem je za uzorak C1.1 bio znatno varijabilniji te je često više različitih vrhova odgovaralo jednom nukleotidu. Interpretacija ovakvog elektroferograma također je mogla unijeti promjene u dobiveni konsenzus nukleotidni slijed. Vjerojatno zbog manje inicijalne varijabilnosti u uzorcima, elektroferogrami dobiveni sekvenciranjem uzoraka C2.2 i 4 bili su vrlo čisti te je skoro svaki vrh na elektroferogramu jasno odgovarao jednom nukleotidu u slijedu.

6. Zaključak

1. Potvrđena je infekcija dvaju kultivara koleusa iz Botaničkog vrta iz sezone 2020./21. CVNV-om.
2. U sklopu biološke karakterizacije jednog od dva nova CVNV-izolata pokazani su mogući citopatološki učinci infekcije virusom, potvrđena je većina poznatog kruga domaćina, iako ovaj izolat nije uspostavio infekciju u svim poznatim domaćinima.
3. Nove vrste nisu identificirane kao domaćini CVNV-a, a uvjeti potrebni za razvoj simptoma i oblik u kojem se simptomi javljaju potvrđen je u skladu s prijašnjim istraživanjima (Mollov i sur. 2007; Kraus i sur. 2008; Škorić i sur. 2018). Izolati iz ovog istraživanja C1.1 i C2.2 razlikovali su se u krugu domaćina, ali teško je reći postoji li ova razlika zbog bioloških karakteristika izolata ili zbog okolišnih uvjeta, posebno uvjeta kratkog dana, za vrijeme provođenja biotestova.
4. Provedena je molekularna karakterizacija metodom RT-PCR i sekvenciranjem regije gena za kapsidni protein iz uzoraka izolirane RNA inficiranih biljaka. Samo su 3 uzorka potvrđena kao pozitivna RT-PCR-om. Svi uzorci sjemena bili su negativni, što ne ukazuje na prijenos CVNV-a sjemenom, ali na temelju ovih malobrojnih rezultata ne možemo još donositi čvrste zaključke o prijenosu.
5. Filogenetska analiza genskog fragmenta za kapsidni protein iz tri pozitivna uzorka također je potvrdila da se radi o CVNV-u. Jedan od novih izolata, C2.2 vrlo je sličan izolatu iz Botaničkog vrta iz prijašnjih godina (Škorić i sur. 2018), dok se drugi novi izolat, C1.1 više razlikuje u nukleotidnom slijedu, ali i u nekim biološkim svojstvima. Uzroci ovih razlika mogu biti biološki, ali i metodološki. Za utvrđivanje točnih odnosa izolata potrebna su dodatna i detaljnija istraživanja.

7. Literatura

- Ali, A., Li, H., Schneider, W. L., Sherman, D. J., Gray, S., Smith, D., & Roossinck, M. J. (2006). Analysis of Genetic Bottlenecks during Horizontal Transmission of *Cucumber Mosaic Virus*. *Journal of Virology*, 80(17), 8345–8350. <https://doi.org/10.1128/JVI.00568-06>
- Ali, A., & Roossinck, M. J. (2010). Genetic bottlenecks during systemic movement of *Cucumber mosaic virus* vary in different host plants. *Virology*, 404(2), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.017>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Brunt, A. A., Atkey, P. T., & Woods, R. D. (1983). Intracellular Occurrence of *Cowpea Mild Mottle Virus* in Two Unrelated Plant Species. *Intervirology*, 20(2–3), 137–142. <https://doi.org/10.1159/000149382>
- Brunt, A. A., Stace-Smith, R., & Leung, E. (1976). Cytological Evidence Supporting the Inclusion of *Poplar Mosaic Virus* in the Carlavirus Group of Plant Viruses. *Intervirology*, 7(4–5), 303–308. <https://doi.org/10.1159/000149962>
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., & Schaad, M. C. (1996). Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *The Plant Cell*, 8(10), 1669–1681. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1669>
- Diaz, A., & Ahlquist, P. (2012). Role of host reticulon proteins in rearranging membranes for positive-strand RNA virus replication. *Current Opinion in Microbiology*, 15(4), 519–524. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.04.007>
- DPV (1982). Descriptions of Plant Viruses. *Carlavirus group*, <https://www.dpvweb.net/dpv/showdpv/?dpvno=259> Pristupljeno 21.7.2021.
- Edwardson, J. R., & Christie, R. G. (1978). Use of Virus-Induced Inclusions in Classification and Diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 16(1), 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.16.090178.000335>

- Fereres, A., & Raccah, B. (2015). Plant Virus Transmission by Insects. In *eLS* (pp. 1–12). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000760.pub3>
- Fletcher, J. T., & MacNeill, B. H. (1971). Influence of environment, cultivar and virus strain on the expression of *Tobacco Mosaic Virus* symptoms in tomato. *Canadian Journal of Plant Science*, 51(2), 101–107. <https://doi.org/10.4141/cjps71-022>
- Forster, R. L. S., & Milne, K. S. (1978). *Daphne virus S*: A carlavirus from daphne. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 21(1), 131–135. <https://doi.org/10.1080/00288233.1978.10427392>
- Foster, G. D. (1992). The structure and expression of the genome of carlaviruses. *Research in Virology*, 143(C), 103–112. [https://doi.org/10.1016/S0923-2516\(06\)80089-0](https://doi.org/10.1016/S0923-2516(06)80089-0)
- González-Garza, R. (2017). Evolution of diagnostic technics for plant viruses. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 591–610. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-1>
- Harlan, B. R., & Hausbeck, M. K. (2018). Diseases of Coleus. In *Handbook of Florists' Crops Diseases* (pp. 911–925). https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_32
- Jeyanandarajah, P., & Brunt, A. A. (1993). The Natural Occurrence, Transmission, Properties and Possible Affinities of *Cowpea Mild Mottle Virus*. *Journal of Phytopathology*, 137(2), 148–156. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1993.tb01334.x>
- Jin, X., Cao, X., Wang, X., Jiang, J., Wan, J., Laliberté, J.-F., & Zhang, Y. (2018). Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Plant Virus Replication. *Frontiers in Plant Science*, 9(January), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00057>
- Jones, R. A. C. (2018). Plant and Insect Viruses in Managed and Natural Environments: Novel and Neglected Transmission Pathways. In *Advances in Virus Research* (1st ed., Vol. 101, pp. 149–187). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.006>
- Jordan, R., Korolev, E., Grinstead, S., & Molloy, D. (2021). First complete genome sequence of carnation latent virus, the type member of the genus Carlavirus. *Archives of Virology*, 166(5), 1501–1505. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-04999-y>

- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B., & Lefkowitz, E. J. (Eds.). (2012). Family - *Betaflexiviridae*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (pp. 920–941). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00078-1>
- Kraus, J., Tzanetakis, I. E., Putnam, M. L., & Martin, R. R. (2008). Complete nucleotide sequence of an isolate of coleus vein necrosis virus from verbena. *Archives of Virology*, 153(2), 381–384. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-1068-0>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Laliberté, J.-F., & Sanfaçon, H. (2010). Cellular Remodeling During Plant Virus Infection. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), 69–91. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114239>
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Lebowitz, R. J. (1985). The Genetics and Breeding of Coleus. In *Plant Breeding Reviews* (pp. 343–360). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118061008.ch9>
- Li, H., & Roossinck, M. J. (2004). Genetic Bottlenecks Reduce Population Variation in an Experimental RNA Virus Population. *Journal of Virology*, 78(19), 10582–10587. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10582-10587.2004>
- Li, X., Bao, H., Wang, Z., Wang, M., Fan, B., Zhu, C., & Chen, Z. (2018). Biogenesis and Function of Multivesicular Bodies in Plant Immunity. *Frontiers in Plant Science*, 9(July), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00979>
- Mandadi, K. K., & Scholthof, K.-B. G. (2013). Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *The Plant Cell*, 25(5), 1489–1505. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>

- Mansour, A., Al-Musa, A., Vetten, H. J., & Lesemann, D.-E. (1998). Properties of a *Cowpea Mild Mottle Virus* (CPMMV) Isolate from Eggplant in Jordan and Evidence for Biological and Serological Differences Between CPMMV Isolates from Leguminons and Solanaceous Hosts. *Journal of Phytopathology*, 146(11–12), 539–547. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1998.tb04752.x>
- Mink, G. I. (1993). Pollen- and Seed-Transmitted Viruses and Viroids. *Annual Review of Phytopathology*, 31(1), 375–402. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.31.090193.002111>
- Missouri Botanical Garden (2018). Missouri Botanical Garden. *Plectranthus scutellarioides*, <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempcode=a547> Pristupljeno 20.7.2021.
- Mollov, D. S., Hayslett, M. C., Eichstaedt, K. A., Beckman, N. G., Daughtrey, M. L., & Lockhart, B. E. (2007). Identification and Characterization of a Carlavirus Causing Veinal Necrosis of Coleus. *Plant Disease*, 91(6), 754–757. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0754>
- Morozov, S. Y., Miroshnichenko, N. A., Solovyev, A. G., Zelenina, D. A., Fedorkin, O. N., Lukasheva, L. I., Grachev, S. A., & Chernov, B. K. (1991). In vitro membrane binding of the translation products of the carlavirus 7-kDa protein genes. *Virology*, 183(2), 782–785. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)91011-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)91011-5)
- Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology*, 84(6), 1351–1366. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18922-0>
- Moury, B., Fabre, F., & Senoussi, R. (2007). Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17891–17896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702739104>
- Movahed, N., Cabanillas, D. G., Wan, J., Vali, H., Laliberté, J.-F., & Zheng, H. (2019). *Turnip Mosaic Virus* Components Are Released into the Extracellular Space by Vesicles in Infected Leaves. *Plant Physiology*, 180(3), 1375–1388. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00381>

- Nault, L. R. (1997). Arthropod Transmission of Plant Viruses: a New Synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, 90(5), 521–541. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.5.521>
- N.C. Extension (2020). North Carolina Extension Gardener Plant Toolbox. *Coleus scutellarioides*, <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/coleus-scutellarioides/> Pristupljeno 16.5.2021.
- Pallas, V., & García, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *Journal of General Virology*, 92(12), 2691–2705. <https://doi.org/10.1099/vir.0.034603-0>
- Paton, A., Mwanyambo, M., & Culham, A. (2018). Phylogenetic study of *Plectranthus*, *Coleus* and allies (Lamiaceae): taxonomy, distribution and medicinal use. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188(4), 355–376. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy064>
- Paton, A. J., Mwanyambo, M., Govaerts, R. H. A., Smitha, K., Suddee, S., Phillipson, P. B., Wilson, T. C., Forster, P. I., & Culham, A. (2019). Nomenclatural changes in *Coleus* and *Plectranthus* (Lamiaceae): a tale of more than two genera. *PhytoKeys*, 129, 1–158. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.129.34988>
- Prasad, V., Gopal, D., Sreenivasulu, P., & Nayudu, M. (1990). Seed transmission of a carlavirus naturally infecting groundnut (*Arachis hypogaea* L.) in India. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 97(5), 548–550. <https://www.jstor.org/stable/43385859>
- Rambaut, A. (2018). *FigTree* (1.4.4). <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P., & Shaw, J. G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology*, 74(9), 1945–1949. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-9-1945>
- Roossinck, M. J. (2010). Lifestyles of plant viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1548), 1899–1905. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0057>

- Schneider, W. L., & Roossinck, M. J. (2000). Evolutionarily Related Sindbis-Like Plant Viruses Maintain Different Levels of Population Diversity in a Common Host. *Journal of Virology*, 74(7), 3130–3134. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.7.3130-3134.2000>
- Schneider, W. L., & Roossinck, M. J. (2001). Genetic Diversity in RNA Virus Quasispecies Is Controlled by Host-Virus Interactions. *Journal of Virology*, 75(14), 6566–6571. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6566-6571.2001>
- Škorić, D., Šeruga Musić, M., Černi, S., & Massart, S. (2018). The First Finding of *Coleus vein necrosis virus* in Europe. Power of Viruses Book of Abstracts, Poreč, May 16-18, 97-97. <http://hdl.handle.net/2268/232828>
- Škorić, D., Černi, S., Jezernik, K., & Butković, A. (2019). Molecular characterization of *Coleus blumei* viroids 1 and 3 in *Plectranthus scutellarioides* in Croatia. *European Journal of Plant Pathology*, 155(3), 731–742. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01801-3>
- Verchot, J. (2011). Wrapping membranes around plant virus infection. *Current Opinion in Virology*, 1(5), 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.09.009>
- Zanardo, L. G., & Carvalho, C. M. (2017). *Cowpea mild mottle virus* (Carlavirus, Betaflexiviridae): a review. *Tropical Plant Pathology*, 42(6), 417–430. <https://doi.org/10.1007/s40858-017-0168-y>
- Zwart, M. P., & Elena, S. F. (2015). Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their Potential Impact on Evolution. *Annual Review of Virology*, 2(1), 161–179. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055135>

Životopis

Rođen sam 2. rujna 1997. godine u Zagrebu gdje sam pohađao Osnovnu školu Augusta Šenoje (2004.-2012.) te zatim V. gimnaziju (2012.-2016.). U trećem razredu gimnazije, 2015. godine, sam zajedno s prijateljem osvojio 3. mjesto na državnom natjecanju iz biologije u izradi istraživačkih radova. Nakon završetka srednje škole, 2016. godine sam upisao preddiplomski sveučilišni studij biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji sam završio 2019. godine. Zatim sam upisao i diplomski sveučilišni studij eksperimentalne biologije (modul Fiziologija i imunobiologija) na istom fakultetu. Tijekom studija sam razvio interes za mikrobiologiju te posebno virologiju pa sam 2020. godine na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka PMF-a započeo s izradom ovog diplomskog rada pod voditeljstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić. Od 2021. godine sam član Američkog društva za mikrobiologiju (ASM) te nakon stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije planiram se nastaviti baviti virologijom upisom na doktorski studij. Izvrsno se služim engleskim jezikom (C2) u govoru i u pisanju.