

Biološka i molekularna karakterizacija izolata virusa pjegavosti i venuća rajčice

Pul, Patrik

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:622243>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-27**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Patrik Pul

**Biološka i molekularna karakterizacija izolata
virusa pjegavosti i venuća rajčice**

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Patrik Pul

**Biological and molecular characterization of
tomato spotted wilt virus isolates**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka 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 molekularne biologije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Biološka i molekularna karakterizacija izolata virusa pjegavosti i venuća rajčice

Patrik Pul

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Virus pjegavosti i venuća rajčice (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) identificiran je prvi put 1930. godine u Australiji kao uzročnik bolesti pjegavosti i venuća rajčice (*Solanum lycopersicum* L.). Tijekom 2021. i 2022. godine su u Hrvatskoj zabilježeni simptomi TSWV-a na kultivarima rajčica koji se reklamiraju kao rezistentni od strane proizvođača sjemena. Cilj ovog rada bio je potvrditi TSWV kao uzročnika infekcije različitih biljaka s terena i odrediti biološke i molekularne karakteristike virusnih izolata. Infekcija TSWV-om potvrđena je kod tri uzorka metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR). Filogenetskim analizama amplikona pokazano je da se radi o izolatima virusa koji potječu iz regionalne virusne populacije. Analizom aminokiselinskog slijeda za nestrukturani virusni protein NSm kod jednog izolata pokazano je da se radi o varijanti virusa koja ne sadrži mutacije povezane s probijanjem rezistencije kod rajčice. Biološki test kojim se nastojalo istražiti biološke značajke (krug domaćina, simptomatologija i probijanje rezistencije kod rajčice) izolata TSWV-a nije bio uspješan zbog termolabilnosti virusa i gubitka infektivnosti biljnog materijala uslijed neadekvatnih uvjeta pohrane.

Ključne riječi: TSWV, rajčica, RT-PCR
(55 stranica, 13 slika, 5 tablica, 53 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Dijana Škorić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dijana Škorić
izv. prof. dr. sc. Petra Korać
izv. prof. dr. sc. Tomislav Ivanković

Rad prihvaćen: 13.4.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus isolates

Patrik Pul

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Tomato spotted wilt virus (TSWV) was first identified in 1930. in Australia as the causative agent of the spotted wilt disease of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). In Croatia, during 2021. and 2022. symptoms of TSWV were observed on tomato cultivars marketed as resistant by seed suppliers. The aim of this study was to confirm TSWV as the agent infecting various field plants and to determine the biological and molecular characteristics of virus isolates. Infection with TSWV was confirmed in three isolates by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Phylogenetic analyses of amplicons have shown that the virus isolates originated from the regional viral population. The nonstructural protein NSm amino acid sequence analysis from one isolate revealed the absence of mutations linked to the resistance-breaking phenotype in tomato. The bioassays conducted to examine biological characteristics (host range, symptomatology, resistance-breaking phenotype in tomato) of TSWV isolates was unsuccessful due to thermal inactivation of the virus and the loss of infectivity in inadequately stored plant material.

Keywords: TSWV, tomato, RT-PCR
(55 pages, 13 figures, 5 tables, 53 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.

Reviewers: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.
Assoc. Prof. Petra Korać, Ph.D.
Assoc. Prof. Tomislav Ivanković, Ph.D.

Thesis accepted: 13.4.2023.

Popis kratica

TSWV – eng. *tomato spotted wilt virus*, virus pjegavosti i venuća rajčice

RNP – ribonukleoproteinski kompleks

ORF – eng. *open reading frame*, otvoreni okvir čitanja

vRNA – virusni (genomski) lanac RNA

vcRNA – virusni (genomu) komplementarni lanac RNA

nt – nukleotid

bp – bazni par

RdRP – eng. *RNA dependent RNA polymerase*, RNA-ovisna RNA-polimeraza

OEPP/EPPO – Europska i mediteranska organizacija za zaštitu bilja

RT-PCR – eng. *reverse transcription and polymerase chain reaction*, reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom

RB – eng. *resistance breaking*, virusni izolat koji probija rezistenciju

RI – eng. *resistance inducing*, virusni izolat koji inducira rezistenciju

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Tospovirusi i virus pjegavosti i venuća rajčice.....	1
1.2. Molekularna biologija TSWV-a.....	2
1.2.1. Građa virusne čestice TSWV-a.....	2
1.2.2. Organizacija genoma i funkcija proteina TSWV-a.....	3
1.2.3. Reprodukcijski ciklus TSWV-a.....	4
1.3. Prijenos TSWV-a i njegove interakcije s vektorom.....	5
1.4. Krug domaćina TSWV-a.....	6
1.5. Simptomi infekcije TSWV-om.....	7
1.6. Detekcija TSWV-a.....	7
1.7. Rezistencija rajčice na TSWV i probijanje rezistencije.....	8
1.8. TSWV u Republici Hrvatskoj.....	10
2. Ciljevi rada.....	11
3. Materijal i metode.....	12
3.1. Materijal.....	12
3.1.1. Biljni materijal i izolati RNA.....	12
3.1.2. Materijal za izolaciju nukleinskih kiselina.....	14
3.1.3. Materijal za mehaničku inokulaciju u biotestu.....	14
3.1.4. Materijal za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom (RT-PCR).....	15
3.1.5. Materijal za elektroforezu u agaroznom gelu.....	15
3.1.6. Nukleotidni sljedovi i računalni programi/alati za analizu nukleotidnih sljedova i filogenetsku analizu.....	16
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Biotest.....	18

3.2.2. Izolacija nukleinskih kiselina.....	19
3.2.3. Amplifikacija fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu TSWV-a metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR).....	20
3.2.4. Analiza RT-PCR-produkata metodom elektroforeze u agaroznom gelu.....	21
3.2.5. Sekvenciranje RT-PCR-produkata Sangerovom metodom.....	22
3.2.6. Analiza nukleotidnih sljedova dobivenih Sangerovim sekvenciranjem.....	22
3.2.7. Filogenetska analiza izolata TSWV-a na temelju fragmenta gena za RdRP.....	23
3.2.8. Filogenetske analize izolata 104DOT22S na temelju otvorenog okvira čitanja gena za nukleokapsidni protein N i nestrukturni protein NSm.....	23
3.2.9. Analiza aminokiselinskog slijeda proteina NSm izolata 104DOT22S.....	25
4. Rezultati.....	26
4.1. Biotest.....	26
4.2. Amplifikacija fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu TSWV-a metodom RT-PCR i analiza produkata metodom elektroforeze u agaroznom gelu.....	33
4.3. Analiza nukleotidnih sljedova dobivenih Sangerovim sekvenciranjem.....	36
4.4. Filogenetska analiza izolata TSWV-a na temelju fragmenta gena za RdRP.....	36
4.5. Filogenetske analize izolata 104DOT22S na temelju otvorenog okvira čitanja gena za nukleokapsidni protein N i nestrukturni protein NSm.....	38
4.6. Analiza aminokiselinskog slijeda proteina NSm izolata 104DOT22S.....	42
5. Rasprava.....	43
6. Zaključak.....	49
7. Literatura.....	50
8. Prilozi.....	55

1.Uvod

1.1. Tospovirusi i virus pjegavosti i venuća rajčice

Tospovirusi (*Tospoviridae*) su porodica virusa iz reda *Bunyavirales* čiji pripadnici inficiraju biljke i kukce-vektore. Imaju tripartitni genom kojeg čine jednolančane molekule RNA (ICTV, 2021). Prema starijoj literaturi unutar porodice tospovirusa postoji samo jedan rod, *Orthotospovirus*, a njegovim najpoznatijim predstavnikom može se smatrati virus pjegavosti i venuća rajčice (tomato spotted wilt virus, TSWV) (Goldbach i Peters 1994). Bolest pjegavosti i venuća rajčice (eng. *spotted wilt of tomato*) prvi je put opisana 1915. godine u Australiji na rajčici (*Solanum lycopersicum*, L.), a TSWV kao uzročnik tamo je i identificiran, ali tek petnaest godina kasnije (Samuel i sur. 1930).

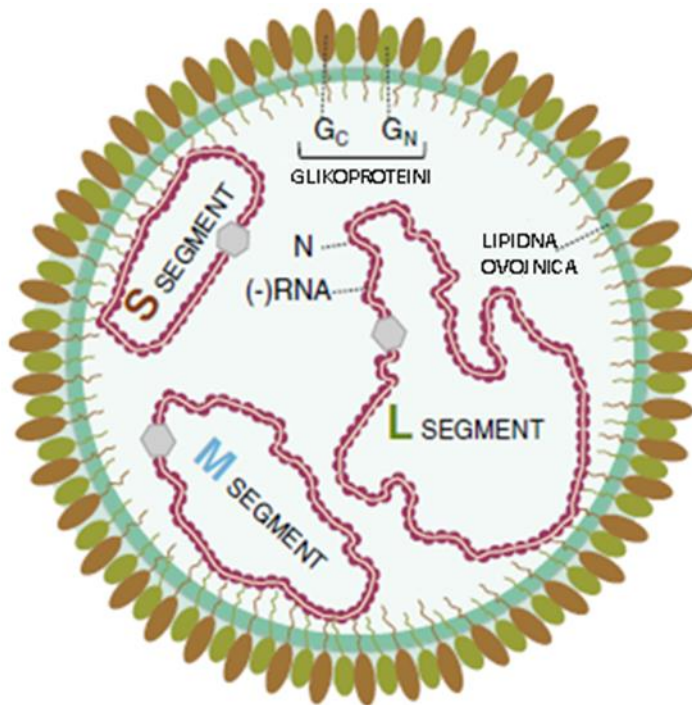
Tospovirusi nanose ogromnu ekonomsku štetu i procjenjuje se da na globalnoj razini uzrokuju gubitke veće od jedne milijarde američkih dolara godišnje, a najveći udio štete uzrokuje upravo TSWV. On je globalno rasprostranjen, lako se prenosi, posjeduje širok krug domaćina i može izazvati teške simptome na inficiranim biljkama (Pappu i sur. 2009; Qi i sur. 2021; OEPP/EPPO 2020). Smatra se da je TSWV trenutno jedan od najštetnijih biljnih virusa na Zemlji. Tospovirusi su arbovirusi što znači da se primarno prenose i umnožavaju u različitim člankonošcima. Tospoviruse prenose kukci iz reda *Thysanoptera* (resičari ili tripsi). Do sada je zabilježeno petnaest vrsta tripsa u ulozi vektora koji pripadaju rodovima *Frankliniella* i *Thrips* (Rotenberg i sur. 2015).

Recentne filogenetske analize bazirane na cjelogenomskim nukleotidnim sljedovima predviđaju postojanje najmanje četiri ili pet odvojenih filogrupa unutar roda *Orthotospovirus*. Prema mišljenju Butković i suradnika (2021), rod *Orthotospovirus* bi se mogao podijeliti na četiri do pet novih rodova. TSWV pripada filogrupi A, koja vjerojatno potječe iz Azije, te je njegova evolucijska povijest obilježena višestrukim rekombinacijskim događajima u svim genomskim segmentima (Butković i sur. 2021).

1.2. Molekularna biologija TSWV-a

1.2.1. Građa virusne čestice TSWV-a

Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da su virusne čestice TSWV-a sferičnog oblika i promjera između 80 i 120 nm te da sadrže “zrnato” središte obavijeno ovojnicom s izbojcima (Best i Palk, 1964). To “zrnato” središte zapravo čine molekule RNA u kompleksu s proteinima (ribonukleoproteinski kompleks, RNP) koji još sadrži nukleokapsidni protein N i virusnu RNA-ovisnu RNA-polimerazu odnosno protein L (Slika 1.). Ovojnicu tvori lipidna membrana u kojoj se nalaze glikoproteinski šiljci ili peplomere koje tvore proteini Gn i Gc (Riberio i sur. 2009).



Slika 1. Shematski prikaz čestice virusa pjegavosti i venuća rajčice (tomato spotted wilt virus, TSWV)(Preuzeto i prilagođeno prema Butković i sur. 2021).

1.2.2. Organizacija genoma i funkcija proteina TSWV-a

Kao i ostali tospovirusi TSWV je (-) RNA-virus što znači da njegova genomska RNA nije translacijski kompetentna, već služi kao kalup za sintezu mRNA (tj. RNA pozitivnog smisla). Kod RNA-virusa negativnog smisla postoje primjeri takozvanih “dvosmislenih” (eng. *ambisense*) virusa. Kod njih različiti dijelovi genoma mogu biti pozitivnog ili negativnog smisla što je upravo i slučaj kod TSWV-a. Kod takvih virusa neki otvoreni okviri čitanja (eng. *open reading frame*, ORF) nalaze se u virusnom lancu RNA (eng. *viral strand RNA*, vRNA) koji se pakiraju u virusnu česticu kao genom, dok se drugi nalaze u komplementarnim lancima RNA (eng. *viral-complementary strand RNA*, vcRNA) koji se sintetiziraju nakon ulaska genoma u domaćinsku stanicu (Turina i sur. 2016).

Genom TSWV-a je tripartitan, odnosno sadrži tri segmenta jednolančane genomske RNA: veliki (eng. *large*, L), srednji (eng. *medium*, M) i mali (eng. *small*, S) (Slika 1.). Sva tri segmenta na svojim krajevima sadrže terminalne djelomično komplementarne nukleotidne sljedove duge oko 65 nukleotida (nt) od kojih je zadnjih osam na oba kraja potpuno komplementarno i evolucijski očuvano. Komplementarnost navedenih sljedova omogućuje stvaranje pseudocirkularnih formi genomskih segmenata te oni sudjeluju u regulaciji transkripcije i replikacije (Kulshrestha i sur. 2013; Turina i sur. 2016).

Segment L (duljine oko 8900 nt) je negativnog smisla i sadrži jedan ORF u vcRNA koji kodira virusnu RNA-ovisnu RNA-polimerazu (eng. *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRP) veličine 330 kDa. Ona katalizira replikaciju virusnog genoma, sintezu virusnih mRNA i transkripcijskih RNA-intermedijera (Kulshrestha i sur. 2013; Turina i sur. 2016). Segment M (oko 4800 nt) u vRNA kodira nestrukturani protein NSm veličine 34 kDa za koji se smatra da sudjeluje u vezanju i pokretanju virusnih ribonukleoproteinskih kompleksa između domaćinskih stanica. VcRNA segmenta M kodira prekursor membranskih glikoproteina koji se nakon translacije cijepa na Gc (78 kDa) i Gn (58 kDa). Ova dva proteina zajedno tvore tzv. šiljke koji su nužni za infekciju virusnog vektora i za sastavljanje novih virusnih čestica u biljnim domaćinima (Kulshrestha i sur. 2013; Turina i sur. 2016). Segment S (oko 2900 nt) u vRNA lancu kodira nestrukturani protein NSs koji suprimira antivirusne mehanizme vektorskih i biljnih stanica, a u vcRNA lancu kodira nukleokapsidni protein N. Kao što je već spomenuto, protein N dio je ribonukleoproteinskih kompleksa i sudjeluje u

njihovoj stabilizaciji unutar virusne čestice i tijekom transporta kroz citoplazmu stanica (Kulshrestha i sur. 2013; Turina i sur. 2016). Genomski segmenti M i S također sadrže intergenske regije između ORF-ova koje su duge 75-120 nt i bogate adenozinom i uracilom. Te intergenske regije tvore stabilne ukosnice koje igraju ulogu u terminaciji transkripcije (Kulshrestha i sur. 2013).

1.2.3. Reprodukcijski ciklus TSWV-a

TSWV u stanice biljnih domaćina ulazi kroz oštećenja stanične stijenke i membrane koja nastaju tijekom hranjenja vektora, najčešće na epidermi listova. Nakon ulaska TSWV-a u domaćinsku stanicu dolazi do transkripcije gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu koja katalizira sintezu novih genomskih i ostalih virusnih molekula RNA. Virusne molekule mRNA sadrže 7-metilgvanozinsku kapu (5'- kapu), ali ne i poli(A)-rep na 3'- kraju. Virusna polimeraza ne može sintetizirati 5'- kapu na virusnim molekulama mRNA jer ne posjeduje metiltransferaznu aktivnost. Zbog toga dolazi do tzv. procesa "krađe kape" (eng. *cap snatching*) u kojem polimeraza cijepa oligonukleotid s kapom na 5'- kraju domaćinskih mRNA molekula i koristi ga kao početnicu za sintezu virusnih mRNA. Ovaj proces je moguć jer RdRP posjeduje endonukleaznu aktivnost. Na taj način stvaraju se translacijski kompetentne virusne mRNA molekule koje prepoznaju eukariotski ribosomi (Kulshrestha i sur. 2013; Turina i sur. 2016).

Replikacija virusnog genoma odvija se u citoplazmi domaćinskih stanica u posebnim odjeljcima tzv. "virusnim tvornicama" ili viroplazmama. Nakon replikacije, novosintetizirani genomski RNA segmenti povezuju se s nukleokapsidnim proteinom i polimerazom u ribonukleoproteinske komplekse. Njih prepoznaje i veže protein NSm koji zatim formira tubularne agregate koji prolaze kroz plazmodezmije i omogućuje prolaz RNP-ova u susjedne stanice (Kulshrestha i sur. 2013; Turina i sur. 2016).

Navedeni procesi ponavljaju se u novoinficiranim stanicama i uz njih se također eksprimiraju Gc i Gn glikoproteini. Oba glikoproteina se nakon postranslacijskih modifikacija lokaliziraju u membrani Golgijevog aparata. S citosolne strane kolokaliziraju RNP-ovi i dolazi do stvaranja virusnih čestica omotanih dvostrukim membranama koje fuzioniraju međusobno, ali i s komadima membrane endoplazmatskog retikuluma. U konačnici nastaju velike vezikule koje sadrže

pojedinačne virusne čestice obavijene jednom membranom i one u takvoj formi ostaju do infekcije vektora (Turina i sur. 2016).

Čestice TSWV-a u stanice vektora ulaze endocitozom nakon čega dolazi do fuzije virusne membrane s membranom endosoma i otpuštanja RNP-ova u citoplazmu. Proces fuzije posredovan je glikoproteinima Gc i Gn. Virus se zatim trajno reproducira u vektoru i iz njega može inficirati novog biljnog domaćina (Kulshrestha i sur. 2013; Gupta i sur. 2018).

1.3. Prijenos TSWV-a i njegove interakcije s vektorom

Horizontalni prijenos putem vektora predstavlja najzastupljeniji način prijenosa TSWV-a, iako se može prenijeti i vegetativnim razmnožavanjem inficiranih biljnih domaćina. Istraživanja su dala oprečne rezultate po pitanju prijenosa putem sjemena i trenutni konsenzus je da se takav način prijenosa u pravilu ne odvija ili se odvija u iznimno malom postotku (Derks i Lemmers 1996; Wang i sur. 2022). Kao i ostale tospoviruse, TSWV prenose kukci iz reda *Thysanoptera* (tripsi ili resičari) (Gupta i sur. 2018).

Tripsi su vrlo uspješni vektori zahvaljujući određenim karakteristikama. Neke od najvažnijih su visoki reprodukcijski potencijal, kratko generacijsko vrijeme, iznimna pokretljivost, polifagija, otpornost na insekticide i dr. Do sada je zabilježeno devet vrsta tripsa koji prenose TSWV, a među njima je najvažnija vrsta *Frankliniella occidentalis* Pergande (kalifornijski trips) (Kulshrestha i sur. 2013; Rotenberg i sur. 2015; Gupta i sur. 2018)

Interakcija TSWV-a i kalifornijskog tripsa je ujedno i najbolje proučen model interakcija tospovirusa s njihovim vektorima. Do infekcije tripsa virusom efikasno dolazi isključivo u stadiju larve prvog stupnja (L1) koja se hrani lisnim tkivom biljke, a puno teže u daljnjim fazama razvoja posebice u stadiju pupe u kojem izostaje prehrana. Jednom kada je vektor inficiran virus se u njemu može potencijalno doživotno replicirati te iz njega rasprostranjivati na biljne domaćine. Odrasli tripsi glavni su prenosioci virusa jer imaju potpuno razvijena krila i asimetrične usne organe za bodenje i sisanje kojima oštećuju tkivo lista (Rotenberg i sur. 2015; Gupta i sur. 2018).

Za TSWV je poznato da putuje kroz probavni sustav tripsa do srednjeg crijeva gdje inficira epitelne stanice u kojima se uspješno replicira. Nakon replikacije virus prelazi bazalnu membranu crijevnog epitela i putuje do glavnih slinskih žlijezda u čijim se stanicama replicira te u konačnici izlučuje kroz njihove sekrete. Kod većine biljnih virusa koji se prenose kukcima virus do glavnih slinskih žlijezda putuje kroz hemolimfu, ali to nije slučaj kod TSWV-a i tripsa (Kritzman i sur. 2002). U literaturi su predložena dva moguća puta. Prvi je kroz tubularne slinske žlijezde koje povezuju glavne slinske žlijezde s crijevima (Kritzman i sur. 2002). Drugi je posredovan direktnim kontaktom srednjeg crijeva i glavnih slinskih žlijezda u ranim razvojnim stadijima zbog zbijenosti unutarnjih organa. Daljnjim sazrijevanjem tijelo tripsa raste i navedeni organi se udaljavaju (Moritz i sur. 2004). Ovaj drugi put je i jedno od mogućih objašnjenja za nemogućnost uspostave prenosive infekcije kod odraslih tripsa. Kod odraslih jedinki koje prime virus on ne može doći do glavnih slinskih žlijezda i prenositi se dalje (Rotenberg i sur. 2015; Gupta i sur. 2018).

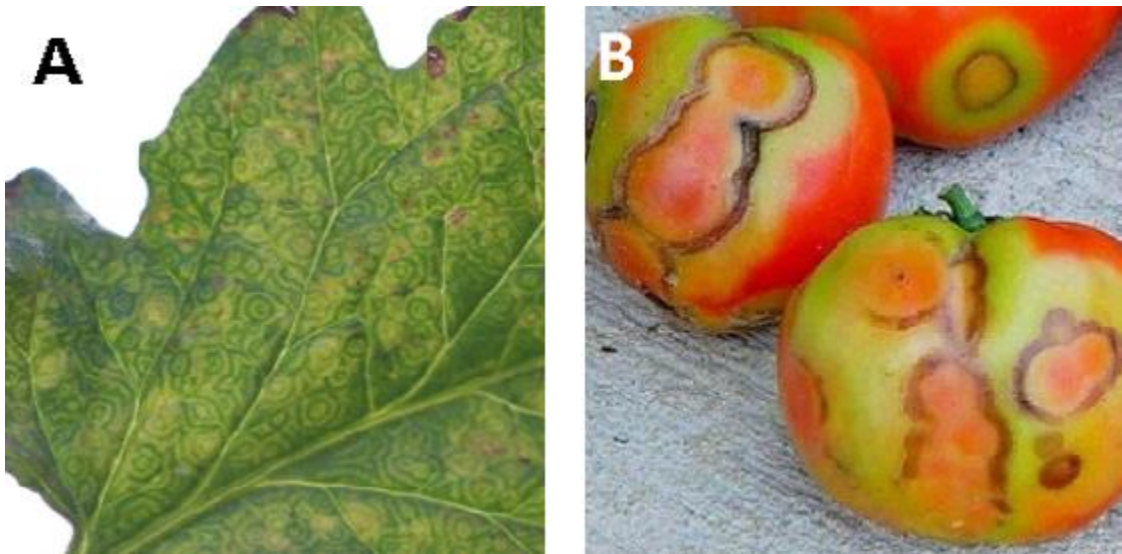
Osim reprodukcijskog ciklusa i kretanja TSWV-a unutar vektora, opažena je vrlo zanimljiva interakcija u kojoj infekcija virusom mijenja prehrambeno ponašanje vektora i/ili mu pruža neke pozitivne karakteristike poput boljeg preživljavanja, povećanog reprodukcijskog potencijala, bolje obrane od predatorskih grinja i bržeg razvoja. Ove interakcije u konačnici rezultiraju efikasnijom transmisijom virusa (Belliure i sur. 2008; Stafford i sur. 2011; Rotenberg i sur. 2015).

1.4. Krug domaćina TSWV-a

TSWV inficira više od 1300 biljnih vrsta uključujući jednosupnice i dvosupnice, a može biti posebice poguban za komercijalne ornamentalne i agronomski važne biljke zbog čega se danas nalazi na A2 listi Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (eng. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, OEPP/EPPO) (OEPP/EPPO 2004; OEPP/EPPO 2020; EFSA, 2012). Među glavnim agronomskim domaćinskim biljkama TSWV-a su rajčica (*Solanum lycopersicum*) i paprika (*Capsicum annum* L.) na kojima nanosi najviše štete, no mnoge druge biljke su također na popisu EPPO-a. Popis glavnih domaćina među ornamentalnim biljkama je poprilično dug. Osim navedenih biljaka, TSWV ima i širok spektar domaćina među korovima (OEPP/EPPO 2004).

1.5. Simptomi infekcije TSWV-om

TSWV može izazvati čitav niz simptoma na inficiranim biljnim domaćinima. Simptomi infekcije su uglavnom sistemični, a period inkubacije varijabilan. Simptomi se mogu pojaviti već 6-7 dana nakon inokulacije. Na listovima inficiranih biljaka mogu se pojaviti mozaik, pjegavost, šarenilo, prstenaste klorotične i nekrotične lezije i pruge (Slika 2.A). Također, može doći do ozbiljnog kržljanja, deformacije listova, nekroze stabljike i vršaka biljke te venuća posebice kod mladih biljaka. Na plodovima nerijetko dolazi do pojave žutih, narančastih ili nekrotičnih pjega i prstenova (Slika 2.B)(OEPP/EPPO 2004; Batuman i sur. 2020). Ekspresija simptoma u domaćina ovisi o mnogim faktorima poput izolata ili soja TSWV-a, biljnoj vrsti i njezinim kultivarima, te genetičkom profilu, razvojnom stadiju biljke i okolišnim uvjetima. Infekcije također mogu biti asimptomatske (OEPP/EPPO 2004; de Ronde i sur. 2019; Batuman i sur. 2020).



Slika 2. Simptomi infekcije TSWV-om. A) Na listovima i B) na plodovima rajčice *Solanum lycopersicum* (Preuzeto s <https://www.ipmimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=6903> - A i preuzeto s <https://www.syngenta.co.in/how-manage-virus-infections> - B).

Kod infekcije rajčice TSWV-om može doći do pojave šarenila, nekrotičnih pjegica i pruga, brončavosti na listovima te uvijanja istih. Na peteljka listova, stabljici i vršcima biljke mogu se pojaviti tamne ili smeđe pruge. Rast biljaka često je inhibiran i jednostran te dolazi do kržljanja i venuća. Na plodovima se često pojavljuju žutilo i nekrotični prstenovi (OEPP/EPPO 2004; Batuman i sur. 2020).

1.6. Detekcija TSWV-a

Postoji nekoliko metoda detekcije TSWV-a koje se razlikuju u svojoj specifičnosti i osjetljivosti. Kao i ostale biljne viruse, TSWV je moguće detektirati provođenjem biotestova u kojima se tzv. indikatorske biljke mehanički inokuliraju ekstraktima tkiva biljaka kod kojih je na temelju simptomatologije suspektna infekcija TSWV-om. Neke indikatorske biljke za TSWV su: *Solanum lycopersicum*, *Capsicum anuum*, *Datura stramonium*, *Nicotiana benthamina*, *Nicotiana occidentalis*, *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana tabacum*, *Impatiens sp.*, *Cucumis sativus*, *Gomphrena globosa* i *Chenopodium quinoa*. Radi se o vrstama koje su vrlo osjetljive na infekciju TSWV-om te razvijaju uočljive simptome. Biotest nije dovoljno specifična metoda jer i ostali tospovirusi mogu dovesti do razvoja sličnih simptoma (OEPP/EPPO 2004; Pourrahim i sur. 2001).

Prisutnost TSWV-a u biljnom tkivu moguće je potvrditi serološkim i molekularnim metodama. Serološke metode uključuju relativno brze testove kao što su ELISA i tzv. "lateral flow" antigenski test na trakici (eng. *Lateral Flow Devices*) kojima se detektira prisutnost nekog antigena TSWV-a. One su vrlo specifične iako uvijek postoji mala vjerojatnost križne reaktivnosti antiseruma s antigenima srodnih orthotospovirusa. Osjetljivost seroloških metoda je naravno ograničena i u slučaju niskog titra virusa u uzorkovanom tkivu mogući su lažno negativni rezultati. (OEPP/EPPO 2004; Wang i Gonsalves 1990; Adkins i sur. 2013.)

Molekularne metode su osjetljivije i specifičnije od seroloških i najčešća takva metoda koja se koristi za detekciju TSWV-a je reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (eng. *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR). Ovom metodom se korištenjem specifičnih početnica amplificiraju određene regije virusnog genoma, a to su najčešće dijelovi gena koji kodiraju L ili N protein u slučaju TSWV-a. Osim metode RT-PCR, TSWV je moguće vrlo specifično detektirati sekvenciranjem čitavog genoma, njegovih dijelova ili produkata metode RT-PCR (OEPP/EPPO 2004; Mumford i sur. 1994).

1.7. Rezistencija rajčice na TSWV i probijanje rezistencije

Potruga za prirodnim izvorima rezistencije na bolest pjegavosti i venuća rajčice koju uzrokuje TSWV počela je gotovo odmah nakon njezine identifikacije u prvoj polovici 20. stoljeća. Kroz povijest je identificiran niz divljih vrsta rajčice i njihovih kultivara koji posjeduju određenu razinu rezistencije na bolesti uzrokovane tospovirusima (Qi i sur. 2021). Genetičkim istraživanjima se kasnije ustanovilo da postoji sedam porodica tzv. gena Sw (Sw1-7) kod različitih vrsta i kultivara rajčica čiji su paraziti i ortolozi odgovorni za rezistenciju na tospoviruse. Za većinu Sw-gena se kroz iskustvo u uzgoju i znanstvena istraživanja pokazalo da pružaju rezistenciju samo na neke sojeve TSWV-a, pa hibridizacija s kultivarima rajčice koji ih posjeduju nije postala posebno popularna (Turina i sur. 2016). Jedan gen se doduše pokazao kao iznimka, a to je Sw-5b iz porodice Sw5 koji pruža otpornost na širok spektar sojeva TSWV-a (Qi i sur. 2021). Taj gen je introgresijom iz jedne vrste divlje rajčice *Solanum peruvianum* L. uveden u mnoge komercijalne kultivare *S. lycopersicum* koji se danas uzgajaju (Stevens i sur. 1991). Uzgoj rezistentnih kultivara rajčice koje posjeduju gen Sw-5b doveo je prirodnom selekcijom do razvoja sojeva TSWV-a koji probijaju rezistenciju. Izolati virusa s fenotipom probijanja rezistencije (eng. *resistance breaking*, RB), su prvi put zabilježeni u Južnoafričkoj Republici (Thompson and Van Zijl 1996). Vrlo brzo su zabilježeni u Europi, SAD-u i Australiji (Ferrand i sur. 2019). Unatoč sve većem broju opisanih izolata RB-fenotipa, samo ih je nekolicina istražena molekularno, a broj nukleotidnih sljedova određenih dijelova genoma takvih izolata TSWV-a u bazi GenBank je malen. Većina nukleotidnih sljedova dolazi iz izolata divljeg tipa s fenotipom induciranja rezistencije (eng. *resistance inducing*, RI).

Mehanizam kojim gen Sw-5b daje rezistenciju rajčici na TSWV još uvijek nije u potpunosti razjašnjen. Poznato je da Sw-5b (kao i ostali Sw-geni) kodira jedan tip proteina koji sudjeluje u obrani biljke od patogena (van der Biezen i Jones 1998). Slični proteini kodirani drugim genima mogu se naći u mnogim drugim biljkama. To su tzv. obrambeni proteini NLR-tipa kojima je zajedničko da sadrže domene CC (eng. *coiled-coil*, CC) ili TIR (eng. *Toll and interleukin-1 receptor*, TIR) na N-terminusu, centralnu domenu NB (eng. *nucleotide-binding*, NB) i C-terminalnu domenu LRR (eng. *leucine-rich repeat*, LRR). Takvi proteini uglavnom prepoznaju određene komponente patogena i aktiviraju neke obrambene mehanizme kojima se blokira njihova invazija (Meyers i sur.

2003). Kod biljaka te komponentne patogena se još nazivaju faktorima avirulencije (de Ronde i sur. 2014). Protein Sw-5b kod rajčice uz domene CC, NB i LRR na svom N-terminusu sadrži dodatnu domenu SD (eng. *Solanaceae domain*, SD) koja je karakteristična za ovaj tip proteina u porodici biljaka Solanaceae (De Oliveira i sur. 2018). Potvrđeno je da kod infekcije rajčice TSWV-om virusni protein NSm predstavlja faktor avirulencije (Peiró i sur. 2014). Protein Sw-5b je u odnosu na ostale Sw-proteine specifičan po tome što jedini može prepoznati protein NSm TSWV-a. On prepoznaje jedan očuvani epitop od 21 aminokiseline na proteinu NSm i pokreće signalnu kaskadu koja rezultira tzv. hipersenzitivnim odgovorom (eng. *hypersensitive response*, HR) u kojem se inducira stanična smrt inficiranih i susjednih stanica. Kod HR-odgovora simptomi ostaju lokalizirani i ne dolazi do sistemske infekcije (De Oliveira i sur. 2018). Istraživanja funkcije pojedinih domena proteina Sw-5b i njegove interakcije s virusnim proteinom NSm pokazala su da indukcija HR-odgovora ne pruža nužno i rezistenciju na TSWV što je dovelo do zaključka da se radi o dva odvojena procesa, odnosno da HR-odgovor nije mehanizam rezistencije i da postoji neki drugi signalni put koji Sw-5b aktivira nakon prepoznavanja proteina NSm (De Oliveira i sur. 2018). Kroz molekularnu karakterizaciju izolata RB-fenotipa i eksperimentalnu mutagenezu gena NSm otkrivene su dvije mutacije koje dovode do pojave RB-fenotipa. Te mutacije su aminokiselinske supstitucije C118Y i T120N u proteinu NSm (Huang i sur. 2022). Svi izolati TSWV-a RI-fenotipa objavljeni u bazi GenBank u proteinu NSm na pozicijama 118 i 120 imaju cistein odnosno treonin. Samo izolati RB-fenotipa imaju tirozin na poziciji 118 ili asparagin na poziciji 120 (Huang i sur. 2022). Ova saznanja temeljena su na relativno malom broju istraživanja pa je moguće da će se u budućnosti otkriti ili pojaviti neke nove mutacije koje rezultiraju RB-fenotipom. Budući da je TSWV virus koji se teško kontrolira, pojava i potencijalno rasprostranjivanje varijanti s RB-fenotipom predstavlja ozbiljan problem za lokalni i globalni uzgoj rajčice pogotovo jer bolji izvori rezistencije još nisu identificirani.

1.8. TSWV u Republici Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj TSWV je prvi put opisan na duhanu 1978. godine. U posljednjih desetak godina zabilježeno je nekoliko ozbiljnih epifitocija TSWV-a koji su uzrokovali velike štete (Ivić i sur. 2016.). Velik broj povrćara u Hrvatskoj počeo je zbog toga koristiti rezistentne kultivare rajčica. U 2021. i 2022. godini opaženi su jaki simptomi karakteristični za infekciju TSWV-om i na kultivarima rajčica koji se reklamiraju kao rezistentni od strane proizvođača sjemena što je izazvalo sumnju u pojavu varijanti TSWV-a s fenotipom probijanja rezistencije. Biološka i molekularna karakterizacija tih izolata TSWV-a predmet je istraživanja u ovom diplomskom radu.

2. Ciljevi rada

Cilj mog diplomskog rada bio je potvrditi TSWV kao uzročnika infekcije različitih biljaka prikupljenih s terena od strane mentorice 2021. i 2022. godine (Bilateralni hrvatsko-slovenski istraživački HRZZ projekt „Visokoprotlačno Nanopore sekvenciranje mikrobnih genoma u rješavanju problema dijagnostike i epidemiologije biljnih patogena“ (NanoPhyto), broj HRZZ IPS-2020-01-2960) kod kojih se na temelju simptomatologije i preliminarnih antigenskih testova na trakicama sumnjalo na infekciju TSWV-om te biološkim i molekularnim metodama okarakterizirati izolate. Pojava simptoma na kultivarima rajčica koji se reklamiraju kao rezistentni na TSWV dovela je do formiranja hipoteze da se radi o varijanti TSWV-a s RB-fenotipom.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

3.1.1. Biljni materijal i izolati RNA

Prije izrade ovog diplomskog rada niz biljnih uzoraka prikupljen je s terena od strane mentorice. Biljke su prikupljene tijekom 2021. i 2022. godine na području Vidovca, Sedlarice, Domašince i Biograda na Moru. Među prikupljenim uzorcima su razne simptomatične biljke, a dominiraju rajčice (*Solanum lycopersicum*). Za izradu diplomskog rada koristio sam uzorke koji su pokazivali simptome koji su ukazivali infekciju TSWV-om (Slika 3., Tablica 1.)

Tablica 1. Popis biljnih uzoraka s terena korištenih u izradi ovog diplomskog rada. Crvenom bojom označeni su kultivari rajčice koji se reklamiraju kao rezistentni na infekciju TSWV-om.

Šifra uzorka	Vrsta i opis uzorka	Lokacija i godina prikupljanja
46SEW21S	<i>Amaranthus sp.</i> L., simptomatski	Sedlarica, 2021.
52STT21S	<i>Solanum lycopersicum</i> , simptomatski	Biograd na Moru, 2021.
65SET21S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2021.
71SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
72SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
76SEP22S	<i>Capsicum anuum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
77SEB22S	<i>Phaseolus vulgaris</i> L., simptomatski	Sedlarica, 2022.
79VIT22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Vidovec, 2022.
84VIPt22S	<i>Solanum tuberosum</i> L., simptomatski	Vidovec, 2022.
102SEC22S	<i>Cucumis sativus</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
104DOT22S	<i>S. lycopersicum</i>, simptomatski	Domašinec, 2022.
105DOT22S	<i>S. lycopersicum</i>, simptomatski	Domašinec, 2022.
107DOT22S	<i>S. lycopersicum</i>, simptomatski	Domašinec, 2022.
108DOT22S	<i>S. lycopersicum</i>, simptomatski	Domašinec, 2022.
109DOP22S	<i>C. anuum</i> , simptomatski	Domašinec, 2022.
110SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
111SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
113SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
114SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
116SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.
117SET22S	<i>S. lycopersicum</i> , simptomatski	Sedlarica, 2022.

Za prva tri uzorka u Tablici 1. (46SEW21S, 52STT21S i 65SET21S) već su prethodno pripremljeni izolati RNA tretirani DNazom koji su čuvani na -20 °C, a ostale sam koristio u obliku smrznutog tkiva (-80 °C ili -20 °C). Uzorci koji su crvenom bojom označeni u Tablici 1. predstavljaju kultivare rajčica rezistentne na TSWV prema navodima nekih proizvođača sjemena. Uzorci 104DOT22S, 105DOT22S i 107DOT22S pripadaju kultivaru 'Signora F1', a 108DOT22S kultivaru 'Ricciolo F1'. Kultivar je nepoznat ili nije zabilježen kod ostalih uzoraka rajčica. Uzorak 104DOT22S je u izradi ovog diplomskog rada ujedno poslužio i kao pozitivna kontrola jer je u njemu prethodno potvrđena prisutnost TSWV-a antigenskim testom i visokoprotočnim sekvenciranjem (Škorić, osobno priopćenje). U ovom poglavlju priložio sam fotografije uzoraka rajčica s karakterističnim simptomima infekcije TSWV-om koji su opisani u Uvodu ovog diplomskog rada (Slika 3.)



Slika 3. Fotografije pojedinih uzoraka rajčice (*Solanum lycopersicum*) s terena koji pokazuju karakteristične simptome infekcije TSWV-om. Na plodovima svih uzoraka vide se velike nekrotične i klorotične prstenaste lezije. Na uzorku 52STT21S (A) je također došlo do nekroze i uvijanja listova te nekroze i kržljanja vršaka biljke. Kod uzorka 108DOT22S (B) mogu se zapaziti i žućkaste klorotične pjege te difuzno žutilo na nezrelim plodovima. Na blago uvijenim listovima uzorka 104DOT22S (C) vidi se i velik broj klorotičnih i nekrotičnih lezija. Na zrelijem plodu 104DOT22S velike lezije su žućkaste i unutar njih se nalaze nekrotični prstenovi. (fotografirala i ustupila profesorica Dijana Škorić).

Za provođenje biotesta koristio sam sadnice različitih indikatorskih biljaka koje su uzgojene iz sjemena u stakleniku. Vrste koje sam koristio su: kvinoja (*Chenopodium quinoa*), kuglasti šćir (*Gomphrena globosa*), krastavac (*Cucumis sativus*) 'Delikates', dva kultivara paprike (*Capsicum annum*) 'Soroksari' i 'Feferona' te rajčice (*Solanum lycopersicum*) 'Moneymaker' i 'Rutgers'. Kultivar 'Moneymaker' odabran je zbog rezistencije na TSWV, dok je 'Rutgers' osjetljiv na infekciju (Škorić, osobno priopćenje).

3.1.2. Materijal za izolaciju nukleinskih kiselina

- CTAB-pufer za izolaciju nukleinskih kiselina:
 - 3% CTAB-a (heksadecil trimetil-amonijev bromid)
 - 0,1 M TrisHCl, pH 8,0
 - 20 mM EDTA
 - 1,4 M NaCl
 - 1% PVP-40 (polivinilpirolidon)
- Tekući dušik
- Kloroform: izoamil-alkohol (24:1)
- 2-propanol
- 70 %-tni etanol
- Voda bez RNaza i DNaza
- Lisno tkivo uzoraka iz Tablice 1. i eksperimentalnih biljaka iz biotesta

3.1.3. Materijal za mehaničku inokulaciju u biotestu

- Karborundum (SiC) u prahu
- Pufer za inokulaciju:
 - 0,01 M fosfatni pufer, pH 7,0
 - 1% natrijev sulfit
- Ekstrakti listova uzoraka 52STT21S, 104DOT22S, 108DOT22S, 109DOT22S

3.1.4. Materijal za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom (RT-PCR)

- Komercijalni set za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom: SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase, Invitrogen, SAD:
 - SuperScript III RT/Platinum Taq Mix- smjesa enzima reverzne transkriptaze SuperScript™ III RT i DNA-polimeraze Platinum™ Taq
 - 2x koncentrirani reakcijski pufer
- Inhibitor RNAza - RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen, SAD
- Komercijalni set za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom: 1 Step RT PCR Kit, highQu GmbH, Njemačka:
 - RT2 Mix – smjesa reverzne transkriptaze i inhibitora RNaze
 - 2x koncentrirani 1Step RT PCR Mastermix
- SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.1.5. Materijal za elektroforezu u agaroznom gelu

- 10x koncentrirani TBE-pufer, pH 8,3
- Agarozna- Agarose (low EEO), SigmaAldrich, SAD
- StainIN™ GREEN Nucleic Acid Stain, highQu GmbH, Njemačka
- Gel Loading Dye, Purple (6X), New England Biolabs, SAD
- 50 bp DNA Ladder, New England Biolabs, SAD

3.1.6. Nukleotidni sljedovi i računalni programi/alati za analizu nukleotidnih sljedova i filogenetsku analizu

- BLAST[®] (Altschul i sur. 1990), <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> - online alat za pretragu i analizu nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova koji su pohranjeni u GenBank bazi podataka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) i dr.
- Geneious Prime, verzija 2022.1, <https://www.geneious.com/prime/> - program za poravnavanje i analizu nukleotidnih i aminokiselinskih ljedova, izradu filogenetskih stabala, simulaciju molekularnog kloniranja i dr.
- MEGA 11 (Tamura, Stecher i Kumar 2021.), verzija 11.0.13, <https://www.megasoftware.net/> - program za poravnavanje nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova i filogenetsku analizu i dr.
- AliView (Larsson 2014), verzija 1.28, <https://ormbunkar.se/aliview/> - program za poravnavnje, analizu i uređivanje nukleotidnih i aminokiselinskih sljedova i dr.
- ORFfinder-NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/> - online alat za pretragu otvorenih okvira čitanja i translacijskih produkata

U Tablici 2. popisani su GenBank pristupni brojevi nukleotidnih sljedova korištenih u filogenetskoj analizi na temelju fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RdRP) TSWV-a. Svakom slijedu iz baze GenBank dodijelio sam oznake korištene u izradi filogenetskog stabla. Oznake sadrže GenBank pristupni broj i državu porijekla izolata.

Nukleotidni sljedovi korišteni u molekularnoj karakterizaciji izolata 104DOT22S nalaze se u poglavlju Prilozi. Prilog 1. sadrži kompletne nukleotidne sljedove genomskih segmenata S i M navedenog izolata TSWV-a (sljedovi su dobiveni visokoprotočnim sekvenciranjem koje je prethodno provela mentorica). U tom poglavlju se također nalaze pristupni brojevi sljedova iz baze GenBank koji su korišteni u filogenetskoj analizi na temelju ORF-ova gena N (Prilog 2.) i NSm (Prilog 3.)

Tablica 2. Potpuni ili parcijalni nukleotidni sljedovi genomskog segmenta L TSWV-a korišteni u filogenetskoj analizi na temelju fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu TSWV-a.

GenBank pristupni broj	Oznaka
MK628564	MK628564 Turska
MF806381	MF806381 Venecuela
KM365064	KM365064 Australija
KC261950	KC261950 Južna Koreja
KP008130	KP008130 Španjolska
KP008128	KP008128 Španjolska
KJ575620	KJ575620 Italija
KT160280	KT160280 SAD
KJ575619	KJ575619 Italija
MK792774	MK792774 Francuska
MT682292	MT682292 Njemačka
MK487998	MK487998 Indija
MW854271	MW854271 Bugarska
KY437075	KY437075 Bosna
GQ279732	GQ279732 Srbija
KY923207	KY923207 Iran
MK348942	MK348942 Italija
MK348943	MK348943 Italija
KM657122	KM657122 I Kina
LC652640	LC652640 Japan
OL471961	OL471961 Slovenija
OL471946	OL471946 Slovenija
DQ425094	DQ425094 INSV

3.2. Metode

3.2.1. Biotest

Kako bih istražio biološke karakteristike izolata TSWV-a (krug domaćina, simptomatologiju i probijanje rezistencije kod rajčice) proveo sam biotest u kojem sam mehanički inokulirao razne eksperimentalne biljke ekstraktima tkiva (pohranjenog na -20 °C) biljaka s terena kod kojih je na temelju simptoma pretpostavljena infekcija TSWV-om (odabrani su najreprezentativniji uzorci).

Eksperimentalne biljke razvrstao sam u pet grupa. U svakoj grupi bilo je 17 biljaka: po jedna *Ch. quinoa* i *G. globosa* te rajčice, paprike i krastavci u triplikatima. Kao što je navedeno ranije, kultivar rajčice 'Moneymaker' odabran je zbog rezistencije na TSWV, a 'Rutgers' zbog osjetljivosti na infekciju (Škorić, osobno priopćenje). Jednu grupu sam koristio kao negativnu kontrolu i u njoj sam biljke inokulirao čistim puferom za inokulaciju (bez ekstrakta biljaka). Ostale grupe sam inokulirao ekstraktima različitih izvornih uzoraka: 52STT21S, 108DOT22S, 109DOP22S i 104DOT22S. Grupu inokuliranu ekstraktom uzorka 104DOT22S koristio sam istovremeno kao pozitivnu kontrolu, ali i za samu karakterizaciju tog izolata.

Inokulaciju sam izvršio mehaničkim putem. Po 1 gram lisnog tkiva izvornih simptomatskih biljaka homogenirao sam u sterlinom tarioniku s tučkom u 5 mL hladnog pufera za inokulaciju. Kotiledone i po jedan pravi list svake biljke posuo sam prahom od karborunduma te sam zatim koristeći tučak pažljivo protrljao homogenat po posutim listovima. Nakon inokulacije biljke sam isprao destiliranom vodom kako bih uklonio preostali karborundum. Biljke su održavane na temperaturi od 25 °C u uvjetima dugog dana (16h svjetla i 8h tame).

Sve grupe eksperimentalnih biljaka pratio sam kroz više od mjesec dana (uz detaljne inspekcije 10. i 23. dan nakon inokulacije) i ako su biljke razvile simptome prikupio sam njihovo simptomatično lisno tkivo (uglavnom 1-2 simptomatična lista) i pohranio ga na -20 °C. Iz prikupljenog tkiva sam kasnije izolirao nukleinske kiseline te proveo RT-PCR i elektroforezu na agaroznom gelu kako bih potvrdio prisutnost RNA TSWV-a odnosno infekciju.

3.2.2. Izolacija nukleinskih kiselina

Prvi korak u postupku potvrde infekcije je izolacija nukleinskih kiselina. Izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina proveo sam prema modificarnom CTAB-protokolu (Murray i Thompson 1980.) koji se pokazao dobrim za njihovu izolaciju iz biljnog tkiva. Također, CTAB-protokol za izolaciju nukleinskih kiselina u svrhu detekcije TSWV-a preporučuje EPPO u svom dijagnostičkom protokolu (OEPP/EPPO 2004). Nukleinske kiseline izolirao sam iz lisnog tkiva uzoraka s terena (Tablica 1.) i simptomatičnih eksperimentalnih biljaka koje sam koristio u biotestu.

Sterilnim skalpelom odrezao sam po 500 mg lisnog tkiva svakog uzorka i prenio u tarionik gdje sam ga zamrznuo tekućim dušikom. Zamrznutom tkivu sam kapaljkom dodao po 5 mL pufera CTAB i usitnio ga koristeći keramički tučak. Po 1,5 mL dobivenog homogenata prenio sam u Eppendorf-epruvetu od 2 mL i uzorke stavio u termoblok kako bi se zagrijavali 30 minuta na 65 °C. Zagrijane uzorke sam centrifugirao 5 minuta pri 14000 rpm. Nakon toga sam prenio po 1 mL supernatanta u nove 2 mL – Eppendorf-epruvete, dodao 1 mL smjese kloroform: izoamil alkohol (24:1) i lagano promiješao uzorke okretanjem. Smjesa kloroforma i izoamil alkohola dovodi do stvaranja organske i vodene faze (nakon idućeg koraka) u kojima se otapaju različite hidrofobne odnosno hidrofilne molekule. Nukleinske kiseline nalaze se u vodenoj fazi. Uzorke sam zatim centrifugirao 10 minuta pri 13000 rpm kako bi došlo do odvajanja organske i vodene faze. Nakon centrifugiranja prenio sam po 750 µL supernatanta (vodene faze) u novu 1,5 ml – Eppendorf-epruvetu, dodao 450 µL hladnog 2-propanola i uzorke promiješao okretanjem. Hladni 2-propanol uzrokuje precipitaciju nukleinskih kiselina. Uzorke sam zatim inkubirao 20 minuta na -20 °C. Nakon inkubacije uzorke sam centrifugirao 20 minuta pri 13000 rpm i dekantirao supernatant jer se nukleinske kiseline nalaze u dobivenom talogu. Taloge sam isprao s 1 mL 70%-tnog etanola. Nakon ispiranja uzorke sam centrifugirao 10 minuta pri 13000 rpm i dekantirao 70%-tni etanol. Uzorke sam stavio na sušenje kako bi isparile zaostale kapljice etanola. Nakon što je sav etanol ispario, talog sam resuspendirao u 100 µL vode bez DNaza i RNaza. Koncentraciju i čistoću izoliranih nukleinskih kiselina izmjerio sam spektrofotometrijski koristeći uređaj NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.2.3. Amplifikacija fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu TSWV-a metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR)

Potvrdu infekcije TSWV-om proveo sam metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u jednom koraku (RT-PCR). Iz izolata nukleinskih kiselina izvornih uzoraka s terena (Tablica 1.) i simptomatskih eksperimentalnih biljaka korištenih u biotestu amplificirao sam dio gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RdRP) TSWV-a. Za specifičnu amplifikaciju koristio sam početnice L2 TSWVF (5'-ATC AGT CGA AAT GGT CGG CA-3') i L1 TSWVR (5'-AAT TGC CTT GCA ACC AAT TC-3') koje su dizajnirane za amplifikaciju fragmenta od 276 parova baza (OEPP/EPPO 2004). Zbog ograničene količine reagensa koristio sam dva različita komercijalna seta za provedbu metode RT-PCR: SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, SAD) i 1 Step RT PCR Kit (highQu GmbH, Njemačka). Reakcijske smjese pripremao sam prema podacima navedenima u Tablici 3.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese ovisno o korištenom komercijalnom setu za RT-PCR.

SuperScript III Kit		1 Step RT PCR Kit	
Reagens	Volumen (μL)	Reagens	Volumen (μL)
2x reakcijski pufer	12,5	2x Mastermix	12,5
L1 TSWVR (10 μM)	2	L1 TSWVR (10 μM)	2
L2 TSWVF (10 μM)	2	L2 TSWVF (10 μM)	2
RT-Taq Mix	1	RT2 Mix	1,25
RNaseOUT	0,5		
Voda	6	Voda	6,25
Kalup	1	Kalup	1
Ukupno	25	Ukupno	25

Kod svake provedbe metode koristio sam negativnu kontrolu sastava reakcijske smjese u Tablici 3. uz dodatak 1 μL vode umjesto kalupa. Izolat uzorka 104DOT22S koristio sam kao pozitivnu kontrolu. Metodu RT-PCR provodio sam u uređaju SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, SAD), a protokol za amplifikaciju ovisi o korištenom komercijalnom setu. Za SuperScript III Kit (Invitrogen, SAD) koristio sam sljedeći protokol: reverzna transkripcija 20 minuta na 50 °C pa denaturacija 2 minute na 94 °C. Nakon toga slijedi 40 ciklusa koje čine koraci denaturacije (15 sekundi na 94 °C), vezanja početnica (1 minuta na 37 °C) i sinteza novih lanaca (30 sekundi na 68 °C). Na samom kraju slijedi konačna sinteza lanaca od 10 minuta na 68 °C. Za 1 Step RT PCR Kit (highQu GmbH, Njemačka) koristio sam nešto drugačiji protokol: reverzna transkripcija 20 minuta na 50 °C pa denaturacija 2 minute na 95 °C. Slijedi 29 ciklusa koje čine denaturacija (15 sekundi na 95 °C), vezanje početnica (1 minuta na 55 °C) i sinteza novih lanaca (30 sekundi na 72 °C). Na kraju slijedi konačna sinteza u trajanju od 10 minuta na 72 °C.

3.2.4. Analiza RT-PCR-produkata metodom elektroforeze u agaroznom gelu

Produce metode RT-PCR analizirao sam metodom elektroforeze u agaroznom gelu. Metodu sam provodio koristeći 1,8 %-tni agarozni gel volumena 30 mL. Agarozni gel sam pripremio otapanjem 540 mg agaroze u 30 mL 1X koncentriranog TBE pufera (pH=8,3) koristeći mikrovalnu pećnicu. Nakon potpunog otapanja agaroze ostavio sam gel da se kratko hladi i zatim dodao 0,7 μL boje za vizualizaciju DNA StainIN™ GREEN Nucleic Acid Stain (highQu GmbH, Njemačka). Nakon što se gel u potpunosti polimerizirao uronio sam ga u kadicu za elektroforezu napunjenu 1X koncentriranim TBE puferom (pH=8,3). U prvu jažicu gela dodao sam 5 μL markera 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs, SAD) prethodno pomiješanog s 1 μL boje za nanošenje uzoraka Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England Biolabs, SAD). U ostale jažice dodavao sam po 5 μL RT-PCR produkta pomiješanog s 1 μL boje za nanošenje uzoraka Gel Loading Dye, Purple (6X) (New England Biolabs, SAD). Elektroforezu sam provodio 45 min pri naponu od 110 V. Nakon završetka elektroforeze, agarozni gel sam fotografirao na uređaju ImageQuant 800 (Cytiva, SAD).

3.2.5. Sekvenciranje RT-PCR-produkata Sangerovom metodom

RT-PCR-produnkte izvornih uzoraka s terena u kojima je došlo do amplifikacije fragmenta gena za virusnu polimerazu pripremio sam za Sangerovo sekvenciranje (MacroGen Europe, Nizozemska) prema uputama dobavljača usluge. Od svakog RT-PCR-produkta pripremio sam po dva alikvota volumena 10 μL konačne koncentracije DNA 10-15 ng/ μL (prema uputama za pripremanje nepročišćenog PCR-produkta gdje su amplikoni kraći od 300 parova baza). Duplikati su pripremani kako bi se mogle odviti reakcije sekvenciranja u oba smjera tj. s jednom i drugom početnicom (L1 TSWVR i L2 TSWVF). Uz to sam pripremio i alikvote svake početnice konačne koncentracije 5 pmol/ μL (prema uputama da se početnice pripreme u volumenu od 2 μL po svakoj reakciji sekvenciranja).

3.2.6. Analiza nukleotidnih sljedova dobivenih Sangerovim sekvenciranjem

Nakon sekvenciranja RT-PCR-produkata dobio sam nukleotidne sljedove i pripadne elektroferograme. Prvo sam identitet svakog dobivenog slijeda provjerio koristeći online alat BLAST (Altschul i sur. 1990) kako bih potvrdio da sljedovi odgovaraju fragmentu gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu TSWV-a. Nukleotidne sljedove sam dalje uređivao u programu Geneious Prime (verzija 2022.1). Na temelju elektroferograma uredio sam nukleotidne sljedove na način da sam uklonio dijelove niskog intenziteta signala s oba kraja. Nakon usporedbe dobivenih sljedova sa signalima na elektroferogramu popravio sam eventualne nepravilnosti (nepoklapanje određenog nukleotida sa signalom). Zatim sam poravnao sljedove dobivene svakom početnicom kako bih vidio koliko se dobro poklapaju te sam odrezao stršeće krajeve koji odgovaraju početnicama i ostale nepreklapajuće segmente (nukleotidni slijed dobiven jednom početnicom i reverzni komplement nukleotidnog slijeda dobiven drugom početnicom). Usporedbom uređenih sljedova odredio sam konsenzus-sljedove koje sam koristio dalje u filogenetskoj analizi. Za dobivene konsenzus-sljedove sam također podnio zahtjev za dostavu pristupnog broja (eng. *accession number*) u bazi GenBank. Kasnije sam dobio pristupne brojeve za svaki slijed u toj bazi.

3.2.7. Filogenetska analiza izolata TSWV-a na temelju fragmenta gena za RdRP

Kako bih odredio evolucijsko srodstvo izolata TSWV-a potvrđenih u ovom diplomskom radu proveo sam filogenetsku analizu na temelju fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu TSWV-a. Osim uređenih konsenzus-sljedova dobivenih Sangerovim sekvenciranjem u analizu sam uključio i nukleotidne sljedove različitih izolata TSWV-a porijeklom iz drugih država koje sam pronašao u bazi GenBank (Tablica 2.). Odabrao sam širok spektar država kako bih pokrio velik broj geografskih regija. Uz navedene sljedove dodao sam i jedan ekvivalentni nukleotidni slijed koji pripada virusu nekrotične pjegavosti vodenike (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) koji sam koristio za stvaranje vanjske grupe (eng. *outgroup*) u izradi filogenetskog stabla. Neki od sljedova uključuju i čitav L-segment genoma TSWV-a pa sam ih prvo morao urediti. Sve sljedove korištene u analizi sam poravnao u programu Geneious Prime (verzija 2022.1). Odrezao sam sve dijelove koji ne odgovaraju slijedu dobivenom Sangerovim sekvenciranjem kako bi dužina svih sljedova bila identična. Ovako poravnate i uređene sljedove ubacio sam u program MEGA 11 (Tamura, Stecher i Kumar 2021.) i konstruirao filogenetsko stablo. Za konstrukciju stabla koristio sam metodu maksimalne vjerojatnosti (eng. *Maximum Likelihood*, ML) i supstitucijski model Tamura-3 (T92) te metodu samoučitavanja (eng. *bootstrap*) s 500 ponavljanja.

3.2.8. Filogenetske analize izolata 104DOT22S na temelju otvorenog okvira čitanja gena za nukleokapsidni protein N i nestrukturani protein NSm

Kako bih detaljnije proveo molekularnu karakterizaciju 104DOT22S izolata TSWV-a proveo sam filogenetske analize na temelju ORF-ova gena za nukleokapsidni protein N i nestrukturani protein NSm. Za to sam koristio nukleotidne sljedove genomskih segmenata S i M (Prilog 1.) izolata 104DOT22S koji su prethodno od strane mentorice dobiveni visokoprotlačnim sekvenciranjem. U filogenetsku analizu baziranu na nukleotidnom slijedu ORF-a gena N uključio sam i ekvivalentne sljedove drugih izolata iz baze GenBank koji su korišteni u sličnim analizama koje se mogu pronaći u znanstvenoj literaturi. Gen za protein N se vrlo često koristi u filogenetskim analizama u sklopu molekularne karakterizacije izolata TSWV-a (López i sur. 2010, Ferrand i sur. 2019, Petrović i sur.

2021). Pristupni brojevi sljedova izolata iz baze GenBank nalaze se u Prilogu 2. ovog diplomskog rada. Prije provedbe filogenetske analize sam iz kompletnog slijeda segmenta S izolata 104DOT22S izvukao nukleotidni slijed ORF-a gena N koristeći online alat ORFfinder-NCBI. Neki sljedovi iz baze GenBank odgovaraju čitavom genomskom segmentu S na kojem se nalazi gen za protein N, a neki samo parcijalnim sljedovima tog gena. U programu Geneious Prime poravnao sam sve odabrane sljedove i odrezao određene dijelove kako bi svi slijedovi bili jednake duljine. Konačni produkti koje sam uključio u analizu bili su parcijalni nukleotidni sljedovi ORF-a gena N duljine 546 nukleotida. Poravnate nukleotidne sljedove sam ubacio u program MEGA11 i izradio filogenetsko stablo metodom ML koristeći supstitucijski model T92+G i 500 “bootstrap” ponavljanja. Za izradu vanjske grupe koristio sam ekvivalentni nukleotidni slijed ORF-a gena N izolata virusa klorotične pjegavosti rajčice (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV).

Filogenetsku analizu na temelju ORF-a gena za nestrukturirani protein NSm proveo sam kako bih odredio evolucijsko srodstvo izolata 104DOT22S u odnosu na druge izolate u bazi GenBank. Analiza na temelju gena NSm je iznimno važna jer je upravo protein NSm prepoznat kao faktor koji određuje fenotip u kontekstu probijanja rezistencije kod rajčice (Peiró i sur. 2014). U tu svrhu odabrao sam izolate TSWV-a poznatog fenotipa (Prilog 3.) koji su bili uključeni u slične analize koje sam pronašao u znanstvenoj literaturi (López i sur. 2010, Ferrand i sur. 2019, Petrović i sur. 2021). Prije analize sam iz kompletnog slijeda segmenta M izolata 104DOT22S izvukao nukleotidni slijed ORF-a gena NSm također koristeći ORFfinder-NCBI. Sljedovi iz baze GenBank uključuju kompletne sljedove cijelog genomskog segmenta M ili samo gena NSm. Odabrane sljedove poravnao sam u programu Geneious Prime i odrezao nepotrebne dijelove kako bi svi sljedovi odgovarali samo kompletnom slijedu otvorenog okvira čitanja gena NSm dužine 909 nukleotida. Iz poravnatih sljedova sam koristeći program MEGA 11 izradio filogenetsko stablo koristeći istu metodu koju sam koristio za izradu stabla na temelju ORF-a gena N. Ekvivalentni nukleotidni slijed ORF-a gena NSm izolata TCSV-a koristio sam za izradu vanjske grupe .

3.2.9. Analiza aminokiselinskog slijeda proteina NSm izolata 104DOT22S

Kako bih potvrdio postojanje mutacija koje su povezane s fenotipom probijanja rezistencije kod rajčice analizirao sam aminokiselinski slijed proteina NSm izolata 104DOT22S. Taj slijed sam također usporedio s ekvivalentnim aminokiselinskim sljedovima odabranih izolata TSWV-a. Za analizu nisam koristio aminokiselinske sljedove proteina NSm određene odgovarajućim metodama poput masene spektrometrije, već one koji su predviđeni iz nukleotidnih sljedova gena NSm koji se nalaze u bazi GenBank. Za predviđanje aminokiselinskih sljedova proteina NSm koristio sam alat ORFfinder-NCBI. U analizu sam uključio nekoliko izolata s fenotipom probijanja rezistencije kod rajčice (RB) i nekoliko izolata divljeg tipa s fenotipom inducirana rezistencije (RI) koje sam pronašao pretraživanjem znanstvene literature (López i sur. 2010, Ferrand i sur. 2019, Petrović i sur. 2021). Koristio sam sljedeće izolate TSWV-a (u zagradi je naveden GenBank pristupni broj) RI-fenotipa: Cr1NL2 iz Španjolske (HM015511), LL-N.05 iz Španjolske (FM163372), Gr1NL2 iz Španjolske (HM015513), p202/3WT iz Italije (HQ830188), Pepper2 CY-CN iz Južne Koreje (HM581941), CA-5 iz SAD-a (AY744483), izolat iz Južne Koreje (AB190818) te izolate RB-fenotipa Regular2A iz SAD-a (AF208498), GRAU iz Španjolske (FM163370), Gr5TL1 iz Španjolske (HM015523), Pujol1TL3 iz Španjolske (HM015520) i D191 iz Australije (HM015516). Uz navedene izolate uključio sam još tri izolata iz Slovenije RI-fenotipa. Podatak o njihovom fenotipu nije još objavljen u znanstvenoj literaturi nego sam ga dobio od mentorice koja je u kontaktu s autorima (Škorić, osobno priopćenje). Ti izolati su: TUR20ST1 (OL471953), PLE20ST2 (OL471947) i PLE20ST3 (OL471950). Predviđene aminokiselinske sljedove navedenih izolata poravnao sam u programu AliView (Larsson 2014) i analizirao prisutnost mutacija C118Y i T20N koje su do sada u znanstvenoj literaturi povezane s RB-fenotipom odnosno probijanjem rezistencije kod rajčice (Huang i sur. 2022).

4. Rezultati

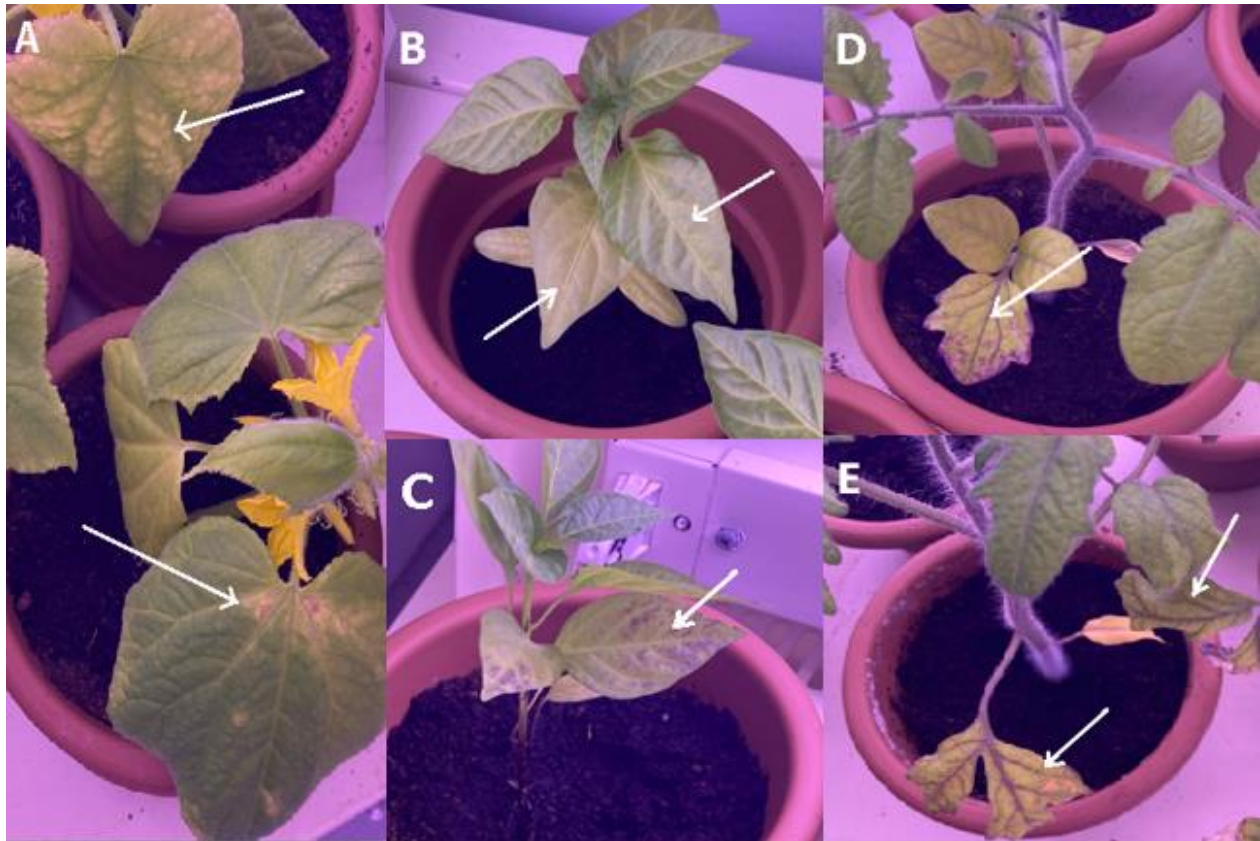
4.1. Biotest

Biljke korištene u biotestu praćene su kroz vremenski period dulji od jednog mjeseca. Detaljnija inspekcija eksperimentalnih biljaka provedena je 10. i 23. dan nakon inokulacije (eng. *days post inoculation*, dpi). Kod većine biljaka koje su razvile simptome oni su zapaženi već u prvih 10 dana nakon inokulacije. *C. sativus* 'Delikates', *C. anuum* 'Soroksari', *C. anuum* 'Feferona', *S. lycopersicum* 'Rutgers' i *S. lycopersicum* 'Moneymaker' razvili su simptome u svim grupama dok je *Ch. quinoa* razvila simptome u svim grupama osim u prvoj. Kod vrste *Ch. quinoa* došlo je do pojave nekrotičnih lezija na listovima (nije prikazano). Kod *G. globosa* nije došlo do razvoja simptoma u 23 dana nakon inokulacije (Tablica 4.). Kod svih simptomatičnih eksperimentalnih biljaka simptome su razvile sve biljke u triplikovima, međutim kod većine oni nisu bili jako izraženi.

U prvoj grupi koja je korištena kao negativna kontrola došlo je do razvoja simptoma kod svih biljaka osim *Ch quinoa* i *G. globosa*. Simptoma nije bilo 10. dan nakon inokulacije, već su zapaženi tek tijekom druge inspekcije 23. dan nakon inokulacije (Slika 4.). Kod *C. sativus* došlo je do pojave sistemskih simptoma na listovima s velikim varijacijama između pojedinačnih listova (Slika 4.A). Mogu se zapaziti pojedinačne nekrotične pjege te blago žuto ili izraženije blijedo šarenilo. Na nekim listovima je došlo i do crnjenja veće površine lisne plojke. Na listovima 'Soroksari' kultivara *C. anuum* pojavila se blaža kloroza (Slika 4.B) dok je kod kultivara 'Feferona' uz klorozu došlo i do razvoja velikog broja nekrotičnih pjegica (Slika 4.C). Kod 'Feferona' je došlo i do pojave nekrotičnih pruga na stabljici i peteljka listova. Kod oba kultivara *S. lycopersicum* došlo je do blaže deformacije i kloroze listova te pojave većih nekrotičnih lezija ili manjih pjegica (Slika 4.D i 4.E).

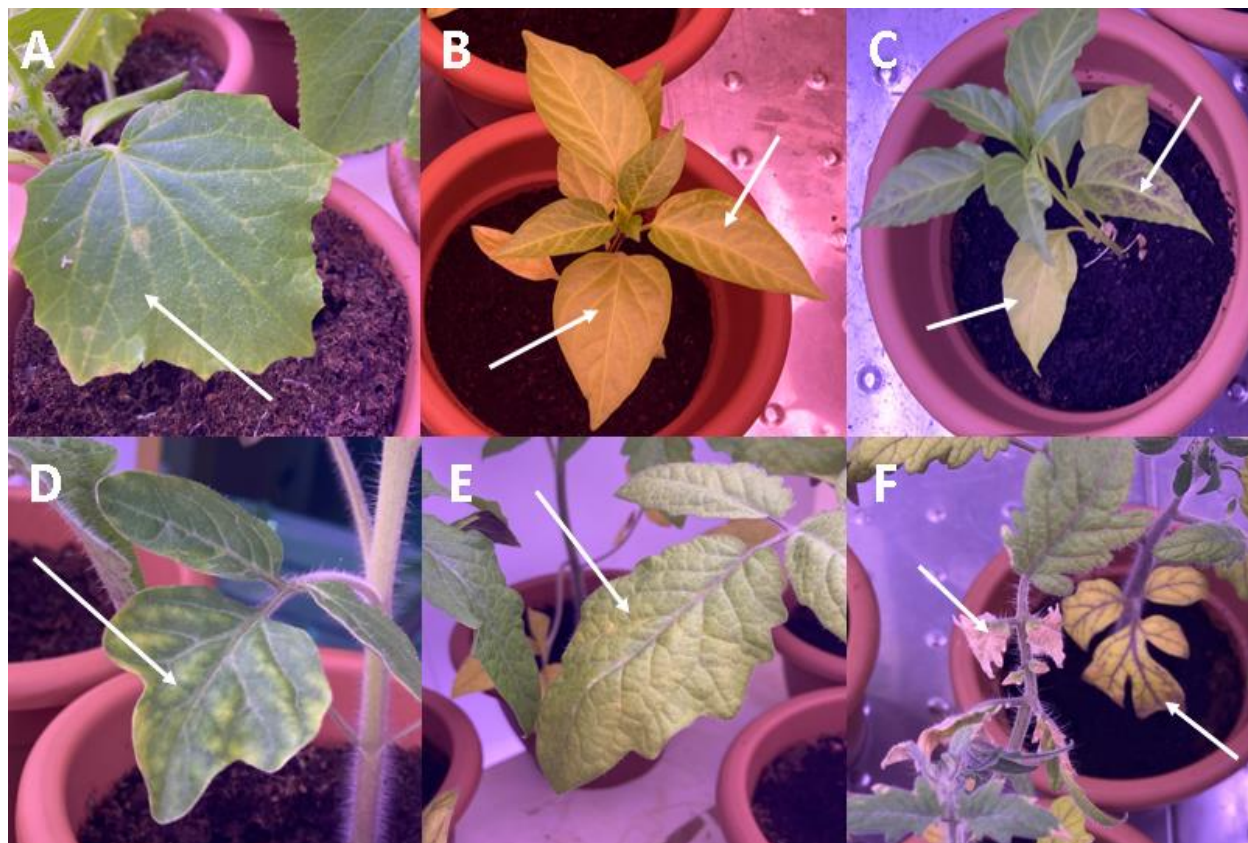
Tablica 4. Rezultati biotesta po grupama različitih potencijalnih izolata TSWV-a, 23 dpi.

Vrsta i kultivar	Broj biljaka	Simptomi +/-
Grupa 1 (negativna kontrola)		
<i>Ch.quinoa</i>	1	-
<i>G. globosa</i>	1	-
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	3	+
<i>C. annum</i> 'Feferona'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	3	+
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	3	+
Grupa 2 (52STT21S)		
<i>Ch.quinoa</i>	1	+
<i>G. globosa</i>	1	-
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	3	+
<i>C. annum</i> 'Feferona'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	3	+
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	3	+
Grupa 3 (108DOT22S)		
<i>Ch.quinoa</i>	1	+
<i>G. globosa</i>	1	-
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	3	+
<i>C. annum</i> 'Feferona'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	3	+
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	3	+
Grupa 4 (109DOP22S)		
<i>Ch.quinoa</i>	1	+
<i>G. globosa</i>	1	-
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	3	+
<i>C. annum</i> 'Feferona'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	3	+
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	3	+
Grupa 5 (104DOT22S, pozitivna kontrola)		
<i>Ch.quinoa</i>	1	+
<i>G. globosa</i>	1	-
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	3	+
<i>C. annum</i> 'Feferona'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	3	+
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	3	+
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	3	+



Slika 4. Simptomi biljaka u prvoj grupi biotesta (negativna kontrola) 23 dpi: (A) *C. sativus* 'Delikates', (B) *C. anuum* 'Soroksari', (C) *C. anuum* 'Feferona', (D) *S. lycopersicum* 'Rutgers', (E) *S. lycopersicum* 'Moneymaker'. Simptomi su označeni strelicama.

Drugu grupu čine eksperimentalne biljke inokulirane ekstraktom lista uzorka 52STT21S. Na listovima *C. sativus* pojavile su se nekrotične lezije uz blažu klorozu u prvih 10 dana nakon inokulacije (Slika 5.A). Kod oba kultivara *C. anuum* došlo je do pojave identičnih simptoma kao i u prvoj grupi kroz 23 dana (Slika 5.B i 5.C). Na listovima kultivara 'Rutgers' vrste *S. lycopersicum* 10. dan nakon inokulacije mogle su se vidjeti klorotične pjegice i šarenilo (Slika 5.D) dok je kasnije došlo do razvoja identičnih simptoma kao i u prvoj grupi kod oba kultivara (Slika 5.E i 5.F.)



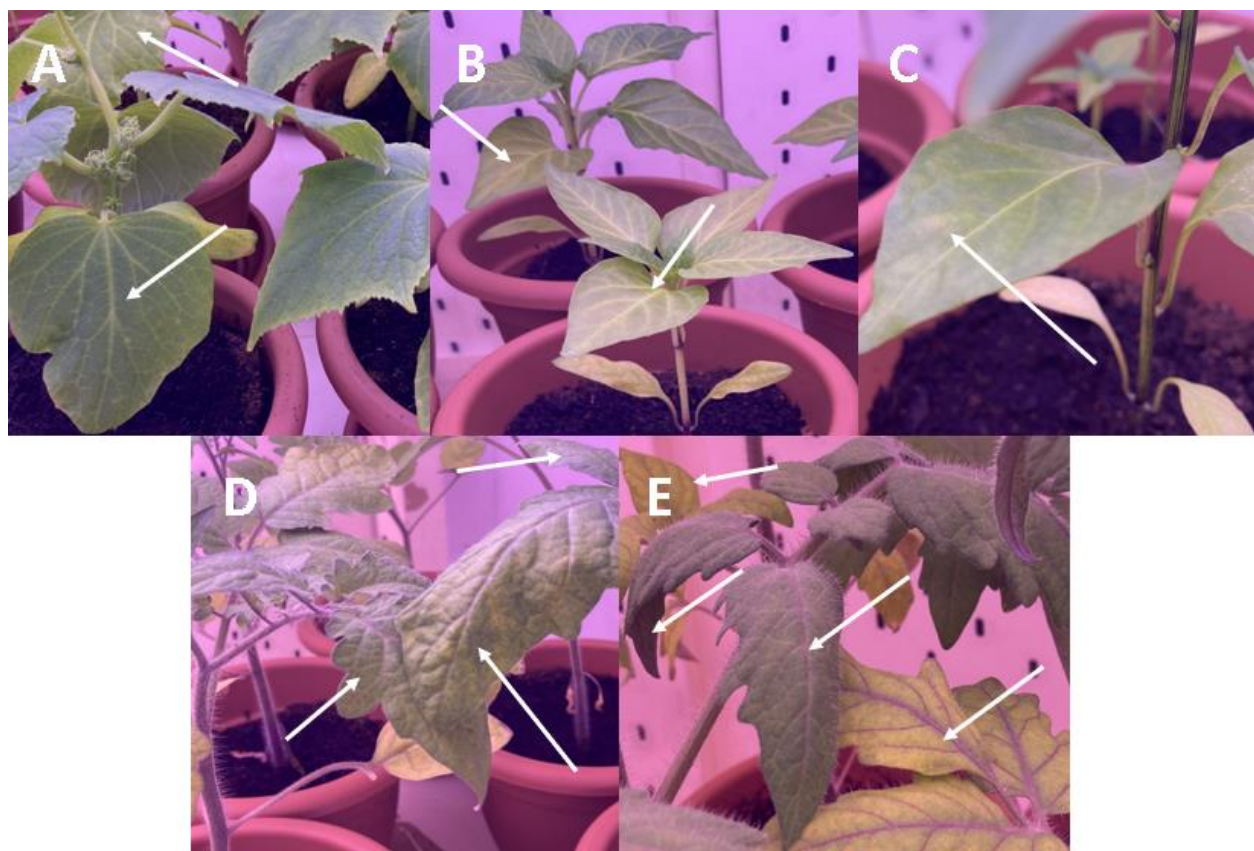
Slika 5. Simptomi biljaka u drugoj grupi biotesta (52STT21S). (A) *C. sativus* 'Delikates', 10 dpi. (B) *C. anuum* 'Soroksari', 23 dpi. (C) *C. anuum* 'Feferona', 23 dpi. (D) *S. lycopersicum* 'Rutgers', 10 dpi. (E) *S. lycopersicum* 'Rutgers', 23 dpi. (F) *S. lycopersicum* 'Moneymaker' 23 dpi. Simptomi su označeni strelicama.

U trećoj grupi su eksperimentalne biljke inokulirane ekstraktom lista uzorka 108DOT22S. Kod *C. sativus* su se u prvih 10 dana nakon inokulacije pojavile nekrotične lezije i blaža kloroza bez znantog pogoršanja simptoma kroz 23 dana nakon inokulacije (Slika 6.A). Također je vidljiva blaža kloroza lisnih žila. Na listovima oba kultivara *C. anuum* razvili su se identični simptomi kao i u prethodnim grupama, ali bez nekrotičnih pjegica kod 'Feferona' (Slika 6.B i 6.C). Kod *S. lycopersicum* simptomi su se razvijali kao i u drugoj grupi (Slika 6.D, 6.E i 6.F).



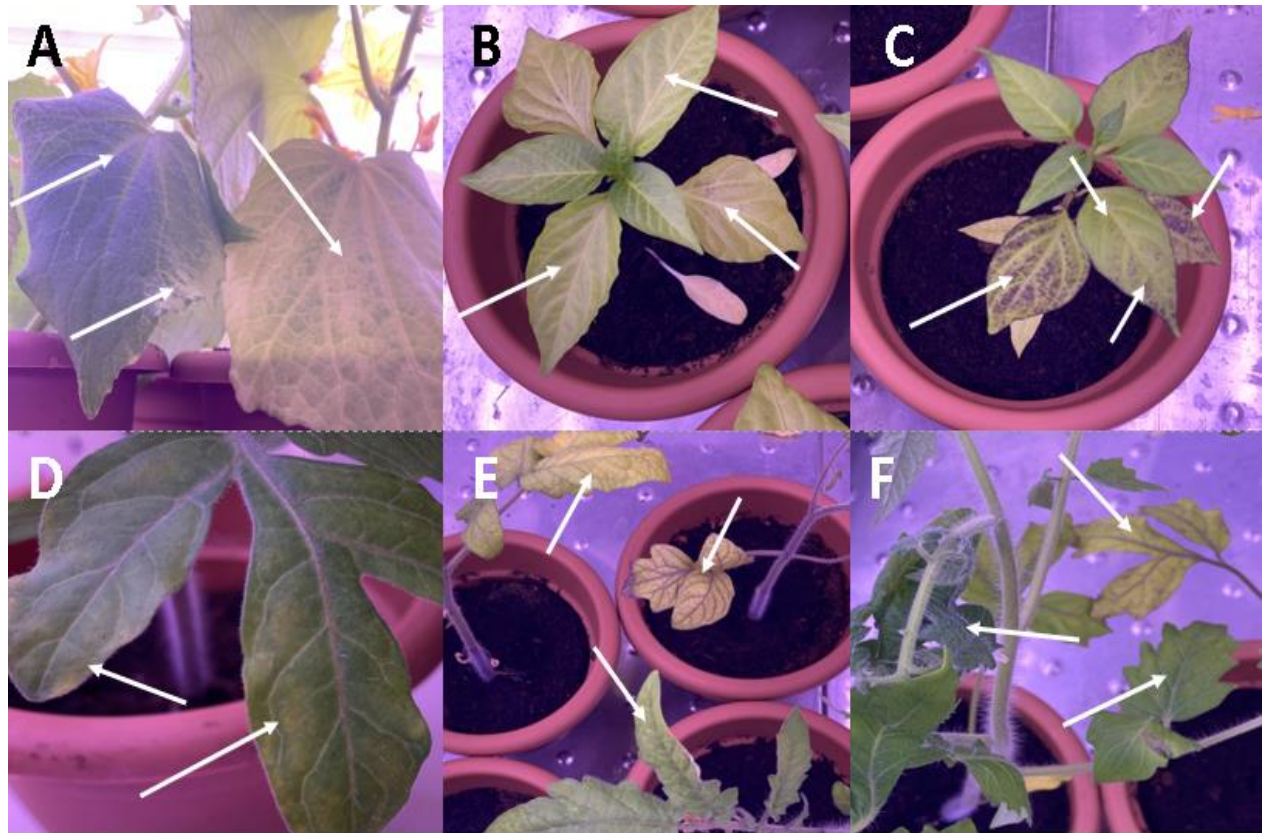
Slika 6. Simptomi biljaka u trećoj grupi biotesta (108DOT22S). (A) *C. sativus* 'Delikates', 23 dpi. (B) *C. anuum* 'Soroksari', 23 dpi. (C) *C. anuum* 'Feferona', 23 dpi. (D) *S. lycopersicum* 'Rutgers', 10 dpi. (E) *S. lycopersicum* 'Rutgers', 23 dpi. (F) *S. lycopersicum* 'Moneymaker' 23 dpi. Simptomi su označeni strelicama.

Biljke u četvrtoj grupi inokulirane su ekstraktom lista uzorka 109DOP22S. Na listovima *C. sativus* već 10. dan nakon inokulacije bile su vidljive nekrotične lezije i kloroza lisnih žila (Slika 7.A). Na *C. anuum* su se pojavili identični simptomi kao i u prethodnim grupama, ali su pjegice kod 'Feferona' bile klorotične (Slika 7.B i 7.C). Kod *S. lycopersicum* simptomi su bili identični onima iz prve grupe (Slika 7.D, 7.E i 7.F.)



Slika 7. Simptomi biljaka u četvrtoj grupi biotesta (109DOP22S). (A) *C. sativus* 'Delikates', 10 dpi. (B) *C. anuum* 'Soroksari', 23 dpi. (C) *C. anuum* 'Feferona', 23 dpi. (D) *S. lycopersicum* 'Rutgers', 23 dpi. (E) *S. lycopersicum* 'Moneymaker' 23 dpi. Simptomi su označeni strelicama.

U petoj grupi nalaze se biljke inokulirane ekstraktom lista uzorka 104DOT22S u kojem je prethodno potvrđena prisutnost TSWV-a. Ova grupa je osim za karakterizaciju navedenog izolata služila i kao pozitivna kontrola. Kod *C. sativus* je 10. dan nakon inokulacije bila vidljiva jaka kloroza žila na pojedinim listovima, a do 23. dana došlo je i do blaže deformacije, jakog blijeđenja i početka venuća pojedinih listova. Na nekim listovima vidljive su i nekrotične pjegice (Slika 8.A). Na listovima oba kultivara *C. anuum* pojavili su se isti simptomi kao i u prvoj grupi, ali ovdje su se i kod 'Soroksari' pojavile nekrotične pjegice. Simptomi su bili znatno izraženiji kod kultivara 'Feferona' (Slika 8.B i 8.C). Kod oba kultivara *S. lycopersicum* simptomi su se razvijali kao u drugoj i trećoj grupi (Slika 8.D, 8.E i 8.F). Simptomi su bili slabije izraženi kod kultivara 'Moneymaker'.



Slika 8. Simptomi biljaka u petoj grupi biotesta (104DOT22S, pozitivna kontrola). (A) *C. sativus* 'Delikates', 23 dpi. (B) *C. anuum* 'Soroksari', 23 dpi. (C) *C. anuum* 'Feferona', 23 dpi. (D) *S. lycopersicum* 'Moneymaker', 10 dpi. (E) *S. lycopersicum* 'Rutgers', 23 dpi. (F) *S. lycopersicum* 'Moneymaker' 23 dpi. Simptomi su označeni strelicama.

4.2. Amplifikacija fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu TSWV-a metodom RT-PCR i analiza produkata metodom elektroforeze u agaroznom gelu

Sve izolate nukleinskih kiselina koje sam dobio iz izvornih uzoraka (Tablica 1.) i simptomatičnih eksperimentalnih biljaka iz biotesta (Tablica 4.) testirao sam na prisutnost RNA TSWV-a koristeći metode RT-PCR i elektroforezu u agaroznom gelu. Elektroforezom su očekivani amplikoni detektirani samo kod uzoraka simptomatičnih rajčica s terena 52STT21S, 107DOT22S i 104DOT22S (Tablica 5.). 52STT21S je simptomatska rajčica prikupljena u okolini Biograda na Moru 2021. godine koja je pokazivala karakteristične simptome infekcije TSWV-om, a ostale su rajčice prikupljene u Domašincu 2022. godine. One su također pokazivale simptome karakteristične za TSWV. Uzorak 104DOT22S je služio kao pozitivna kontrola jer je kod njega prethodno potvrđena prisutnost TSWV-a antigenskim testom i visokoprotočnim sekvenciranjem. Kod simptomatičnih biljaka iz biotesta nije detektirana RNA TSWV-a. Amplikoni detektirani na agaroznom gelu nalaze se na visini između 250 i 300 parova baza u odnosu na molekularni standard (marker) što odgovara veličini fragmenta gena za RdRP TSWV-a (276 parova baza) koji je amplificiran koristeći L1 TSWVR i L2TSWVF početnice. (Slika 9.). Prikazani su samo reprezentativni odnosno pozitivni rezultati. Gelovi kod kojih nije bilo pozitivnih rezultata nisu prikazani.

Tablica 5. Prisutnost amplikona na agaroznom gelu nakon amplifikacije fragmenta gena za RdRP TSWV-a. Popisani su svi testirani izvorni uzorci s terena i eksperimentalne biljke iz biotesta po grupama. Asimptomatične biljke iz biotesta nisu testirane (označeno s NT).

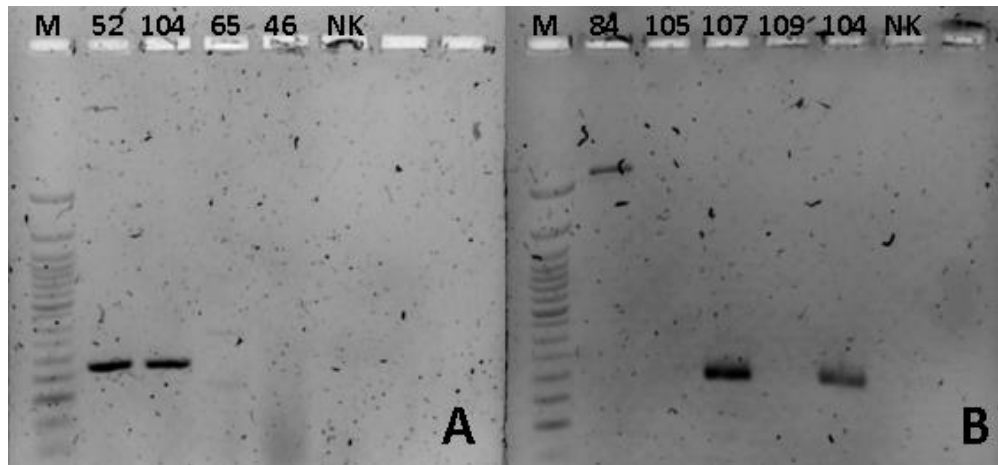
Uzorak s terena (šifra) ili biotest	Prisutnost amplikona (+/-)
46SEW21S	-
52STT21S	+
65SET21S	-
71SET22S	-
72SET22S	-
76SEP22S	-
77SEB22S	-
79VIT22S	-
84VIPt22S	-

Tablica 5. Nastavak.

Uzorak s terena (šifra) ili biotest	Prisutnost amplikona (+/-)
102SEC22S	-
104DOT22S (pozitivna kontrola)	+
105DOT22S	-
107DOT22S	+
108DOT22S	-
109DOP22S	-
110SET22S	-
111SET22S	-
113SET22S	-
114SET22S	-
116SET22S	-
117SET22S	-
Grupa 1 (negativna kontrola)	
<i>Ch.quinoa</i>	NT
<i>G. globosa</i>	NT
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	-
<i>C. annum</i> 'Feferona'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	-
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	-
Grupa 2 (52STT21S)	
<i>Ch.quinoa</i>	-
<i>G. globosa</i>	NT
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	-
<i>C. annum</i> 'Feferona'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	-
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	-
Grupa 3 (108DOT22S)	
<i>Ch.quinoa</i>	-
<i>G. globosa</i>	NT
<i>C. annum</i> 'Soroksari'	-
<i>C. annum</i> 'Feferona'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	-
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	-

Tablica 5. Nastavak.

Uzorak s terena (šifra)/biotest	Prisutnost amplikona (+/-)
Grupa 4 (109DOP22S)	
<i>Ch. quinoa</i>	-
<i>G. globosa</i>	NT
<i>C. anuum</i> 'Soroksari'	-
<i>C. anuum</i> 'Feferona'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	-
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	-
Grupa 5 (104DOT22S, pozitivna kontrola)	
<i>Ch. quinoa</i>	-
<i>G. globosa</i>	NT
<i>C. anuum</i> 'Soroksari'	-
<i>C. anuum</i> 'Feferona'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Rutgers'	-
<i>S. lycopersicum</i> 'Moneymaker'	-
<i>C. sativus</i> 'Delikates'	-



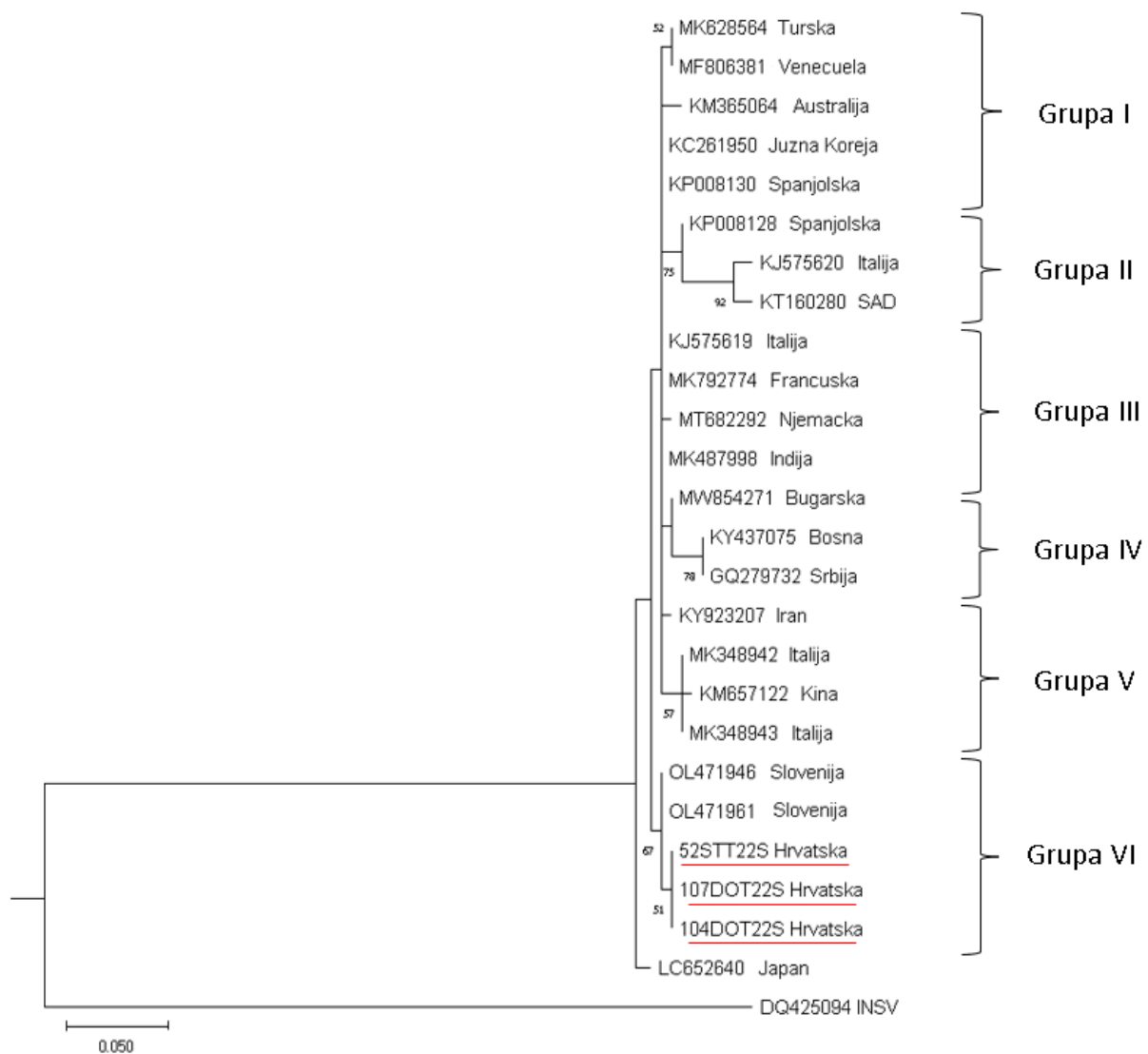
Slika 9. Rezultati elektroforeze u agaroznom gelu. Izdvojene su fotografije gelova na kojima se nalaze reprezentativni pozitivni rezultati odnosno amplikoni fragmenta gena za RdRP TSWV-a. U prvoj jažici oba gela nalazi se molekularni standard (M) 50 bp DNA Ladder, (New England Biolabs, SAD), a u ostalima pojedinačni uzorci. Uzorci su označeni samo početnim brojevima šifre radi preglednosti (Tablica 1.). Amplikoni se nalaze na visini između 250 i 300 parova baza u odnosu na standard. NK je negativna kontrola, a 104 pozitivna kontrola.

4.3. Analiza nukleotidnih sljedova dobivenih Sangerovim sekvenciranjem

Amplikoni dobiveni iz uzoraka 104DOT22S (pozitivna kontrola), 52STT21S i 107DOT22S poslani su na Sangerovo sekvenciranje u tvrtku Macrogen Europe (Nizozemska). Korištenjem alata BLAST potvrđeno je da dobiveni nukleotidni sljedovi odgovaraju fragmentu gena za RdRP TSWV-a te su najbližiji (99,56%) izolatu PLE20ST2 (OL471946) iz Slovenije. Nukleotidni sljedovi dobiveni sekvenciranjem uređeni su prema opisu u poglavlju 3.2.6 te su na kraju dobiveni konsenzus-sljedovi (Prilog 4.). Konsenzus-sljedovi za svaki uzorak bili su sljedećih veličina: 228 nukleotida za 104DOT22S, 214 nukleotida za 52STT21S i 226 nukleotida za 107DOT22S. Za navedene sljedove dobio sam i pristupne brojeve u bazi GenBank. Pristupni brojevi su sljedeći: OP728767 za 52STT21S, OP728768 za 104DOT22S i OP728769 za 107DOT22S.

4.4. Filogenetska analiza izolata TSWV-a na temelju fragmenta gena za RdRP

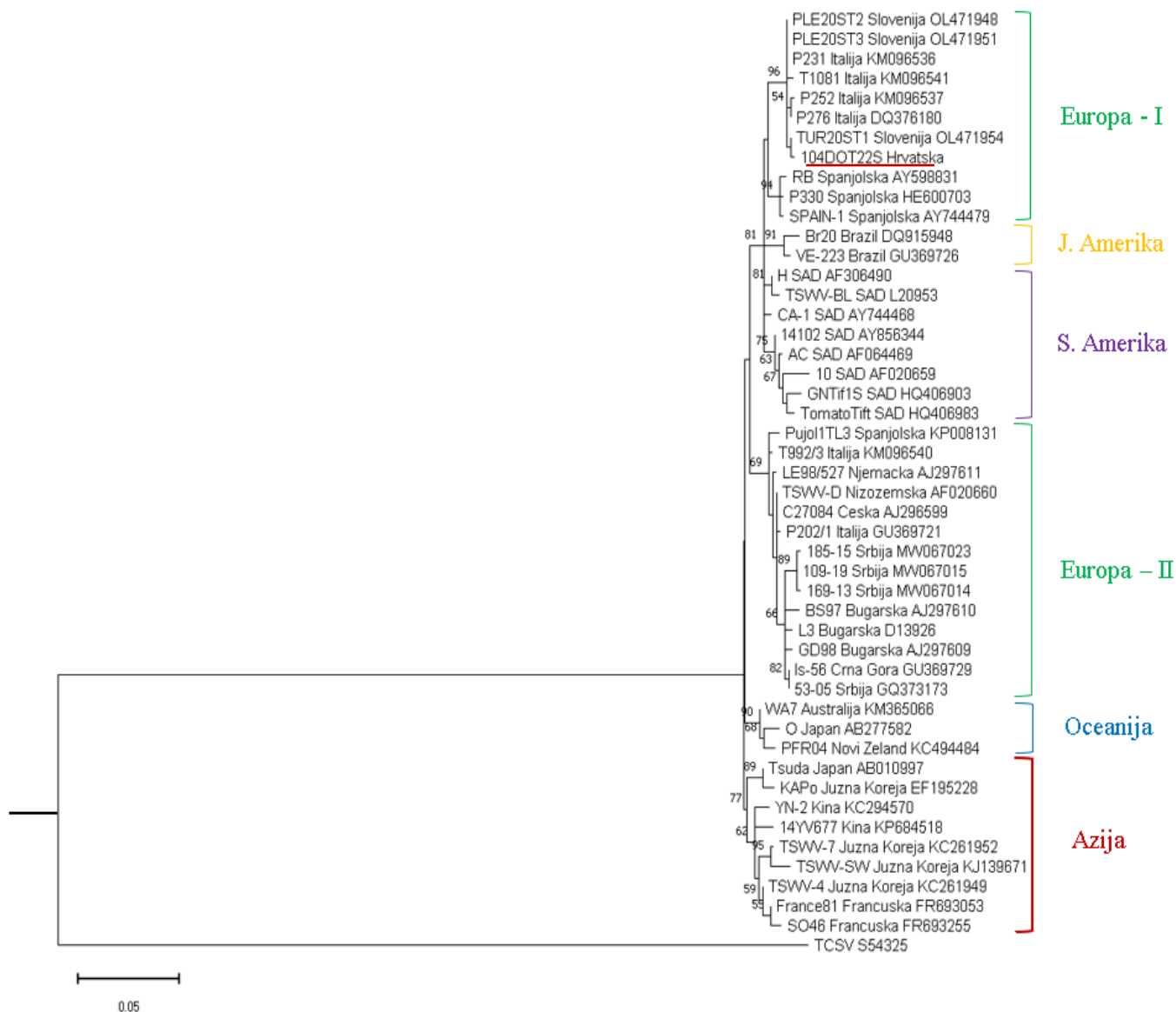
Na filogenetskom stablu izolata TSWV-a na temelju fragmenta gena za RdRP izdvojilo se sedam grupa (Slika 10.). Prvo se odvaja vanjska grupa koju čini izolat orthospovirusa nekrotične pjegavosti vodenike (INSV) pomoću kojeg je stablo ukorijenjeno. Ostalih šest grupa čine izolati TSWV-a. Izolati iz Hrvatske karakterizirani u ovom radu grupiraju se s ostalim izolatima TSWV-a što je dodatna potvrda da se radi o TSWV-u. Oni se također međusobno grupiraju i nalaze se na istoj grani što pokazuje da su im parcijalni nukleotidni sljedovi gena za RdRP identični. Hrvatski izolati nalaze se u grupi VI zajedno s izolatima iz Slovenije. U grupi I nalaze se izolati iz različitih geografskih regija: Australije, Južne Amerike, Europe i Azije. Isto vrijedi za izolate u grupi II gdje se nalaze izolati iz Španjolske, Italije i SAD-a. Grupa III se sastoji od većinom europskih izolata uz iznimku jednog izolata iz Indije. U grupi IV nalaze se izolati iz Srbije, Bugarske te Bosne i Hercegovine, odnosno izolati s Balkanskog poluotoka. U grupi V nalaze se izolati iz Italije i Kine. Izolat TSWV-a iz Japana koji se prvi izdvaja na stablu od ostalih izolata TSWV-a nije grupiran odnosno nema oznaku grupe. Na stablu nisu prikazane "bootstrap" vrijednosti manje od 50%, a one koje jesu variraju od 51% do 92%. S obzirom na niske "bootstrap" vrijednosti topologija stabla nije vrlo pouzdana.



Slika 10. Filogenetsko stablo izolata TSWV-a generirano na temelju parcijalnog nukleotidnog slijeda gena za protein RdRP TSWV-a. Stablo je izrađeno metodom ML uz supstitucijski model T92 i 500 ponavljanja. “Bootstrap” vrijednosti manje od 50% nisu prikazane. Hrvatski izolati karakterizirani u ovom radu su podcrtani crveno.

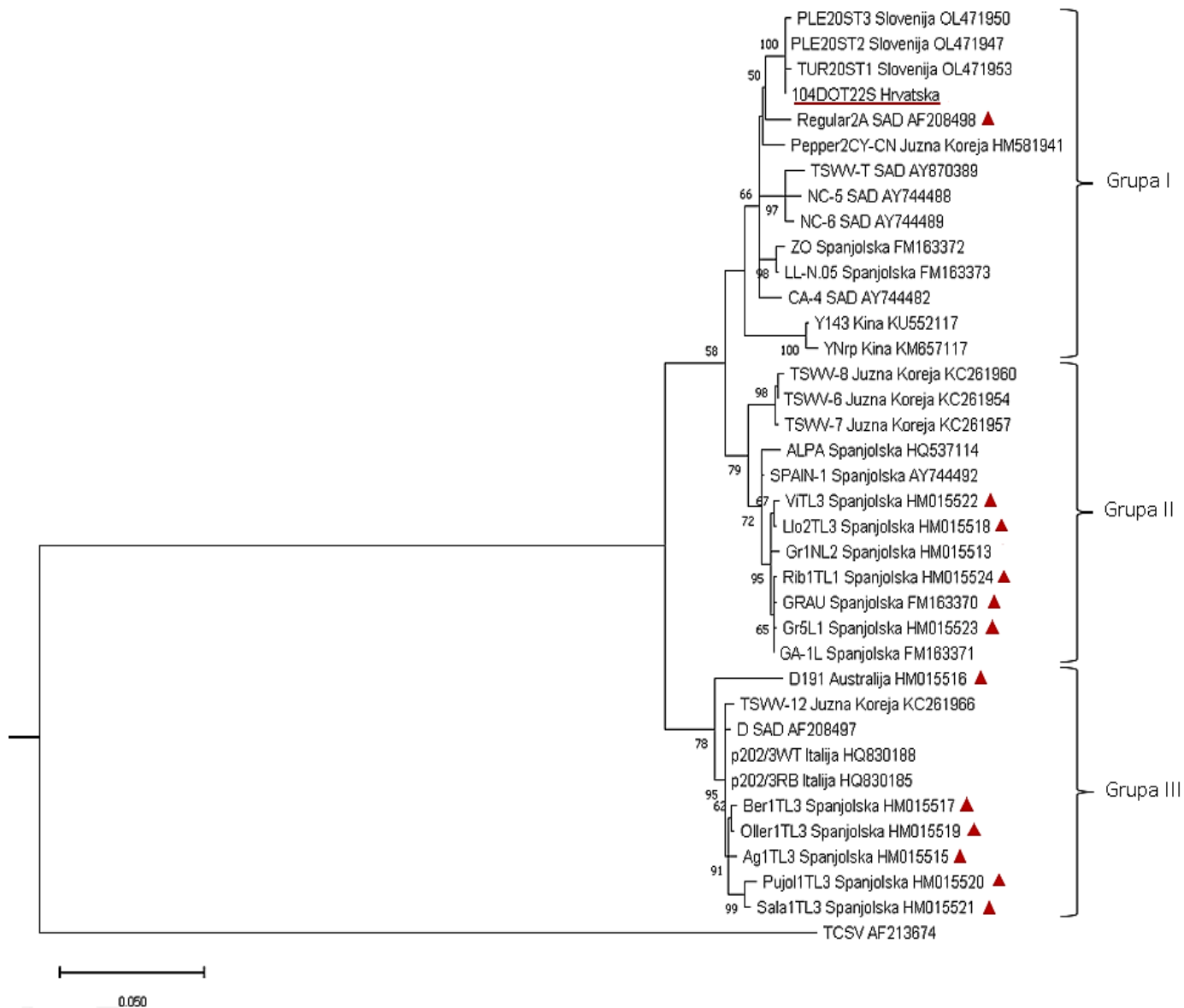
4.5. Filogenetske analize izolata 104DOT22S na temelju otvorenog okvira čitanja gena za nukleokapsidni protein N i nestrukturirani protein NSm

Na filogenetskom stablu izolata TSWV-a generiranom na temelju parcijalnih nukleotidnih sljedova ORF-a gena za protein N (546 nukleotida) izdvojilo se šest glavnih grupa (Slika 11). Na stablu se prvenstveno na jednoj grani odvaja vanjska grupa koju čini izolat orthotospovirusa TCSV-a dok se na drugoj grani odvajaju izolati TSWV-a među kojima se nalazi i 104DOT22S. Prema porijeklu izolata se vidi da svaka od šest grupa odgovara određenoj geografskoj regiji. Izdvojile su se dvije odvojene europske grupe, južnoamerička, sjevernoamerička, oceanijska i azijska grupa. U azijskoj se nalaze i dva izolata iz Francuske koja su vrlo srodna ostalim izolatima u grupi. Isto tako se u oceanijskoj grupi nalazi i jedan izolat iz Japana. Hrvatski izolat 104DOT22S se u prvoj europskoj grupi grupirao sa slovenskim i nekim talijanskim te španjolskim izolatima, a najrodniji mu je slovenski izolat TUR20ST1. Iz stabla se također vidi da su izolati iz prve europske grupe srodniji izolatima iz Južne i Sjeverne Amerike, nego onima iz druge europske grupe u kojoj se između ostalog nalaze i izolati porijeklom iz država Balkanskog poluotoka (Crna Gora, Srbija i Bugarska). Relativno visoke "bootstrap" vrijednosti podržavaju topologiju generiranog stabla (vrijednosti manje od 50% nisu prikazane). Svi izolati TSWV-a na stablu imaju specifičnu oznaku. Oznaka svakog izolata prikazanog na stablu sadrži redom: naziv izolata u bazi GenBank, državu porijekla izolata i pristupni broj za nukleotidni slijed u bazi GenBank.



Slika 11. Filogenetsko stablo izolata TSWV-a generirano na temelju parcijalnog nukleotidnog slijeda ORF-a za nukleokapsidni protein N TSWV-a. Stablo je izrađeno metodom ML uz supstitucijski model T92+G i 500 ponavljanja. “Bootstrap” vrijednosti manje od 50% nisu prikazane. Hrvatski izolat 104DOT22S karakteriziran u ovom radu podcrtan je crveno.

U filogenetskoj analizi temeljenoj na potpunom nukleotidnom slijedu ORF-a gena za protein NSm TSWV-a izdvojile su se tri grupe izolata TSWV-a (Slika 12.). U svakoj grupi izolati su porijeklom iz različitih geografskih regija. Hrvatski izolat 104DOT22S nalazi se u prvoj grupi s izolatima iz Slovenije, SAD-a, Južne Koreje, Španjolske i Kine. 104DOT22S usko se grupira s izolatima iz Slovenije, a najsrodniji mu je izolat TUR20ST1. U ovu filogenetsku analizu uključen je disproporcionalno velik broj španjolskih izolata iz razloga što je najviše izolata RB-fenotipa sekvencirano upravo u Španjolskoj. Izolati RB-fenotipa su na filogenetskom stablu označeni crvenim trokutom. Izolat 104DOT22S se nije grupirao sa španjolskim izolatima RB- fenotipa, ali se zato grupirao s jednim takvim izolatom iz SAD-a Regular2A. Većina izolata RB- fenotipa nalazi se u drugoj i trećoj grupi. Na stablu se također prvo odvaja jedan izolat TCSV-a koji služi kao vanjska grupa. "Bootstrap" vrijednosti su relativno visoke i podržavaju topologiju generiranog filogenetskog stabla. Kao i na ostalim filogenetskim stablima u ovom radu "bootstrap" vrijednosti manje od 50% nisu prikazane. Oznake analiziranih izolata na filogenetskom stablu označavaju naziv izolata u bazi GenBank, državu porijekla izolata i pristupni broj nukleotidnog slijeda u bazi GenBank.



Slika 12. Filogenetsko stablo izolata TSWV-a generirano na temelju potpunog nukleotidnog slijeda ORF-a za nestrukturani protein NSm TSWV-a. Stablo je izrađeno metodom ML uz supstitucijski model T92+G i 500 ponavljanja. “Bootstrap” vrijednosti manje od 50% nisu prikazane. Hrvatski izolat 104DOT22S karakteriziran u ovom radu podcrtan je crveno. Izolati RB-fenotipa označeni su crvenim trokutom.

4.6. Analiza aminokiselinskog slijeda proteina NSm izolata 104DOT22S

Iz poravnanja aminokiselinskih sljedova proteina NSm odabranih izolata vidi se da je 104DOT22S najrodniji slovenskim izolatima. Iz poravnanja se također vidi da svi izolati RB-fenotipa sadrže jednu od dvije ključne mutacije koje su povezane s takvim fenotipom (Slika 13.). Te mutacije su supstitucije na pozicijama 118 i 120. Na poziciji 118 se kod izolata RB-fenotipa umjesto cisteina (C) nalazi tirozin (Y) dok je na poziciji 120 došlo do promjene treonina (T) u asparagin (N). Kod svih prikazanih izolata RB-fenotipa prisutna je samo jedna od dvije navedene mutacije. Kod hrvatskog izolata 104DOT22S na poziciji 118 se nalazi cistein, a na poziciji 120 treonin. Iste mutacije nisu prisutne ni kod usko srodnih izolata iz Slovenije.

Position	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	Accession
104DOT22S_Hrvatska	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
Cr1NL2_Spanjolska_RI_HM015511	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
LL-N.05_Spanjolska_RI_FM163372	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
Gr1NL2_Spanjolska_RI_HM015513	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	V	
p202/3WT_Italija_RI_HQ830188	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
Pepper2CY-CN_Juzna_Koreja_RI_HM581941	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
CA-5_SAD_RI_AY744483	T	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
Juzna_Koreja_RI_AB190818	N	A	S	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
Regular2A_SAD_RB_AF208498	N	A	N	K	V	I	K	I	Y	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
GRAU_Spanjolska_RB_FM163370	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	N	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
Gr5TL1_Spanjolska_RB_HM015523	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	N	W	D	S	R	K	Q	H	M	M	I	
Pujol1TL3_Spanjolska_RB_HM015520	N	A	N	K	V	I	R	I	Y	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
D191_Australija_RB_HM015516	N	A	N	K	V	I	K	I	Y	P	T	W	G	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
111-19_Srbija_RB_MW039615	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	N	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
TUR20ST1_Slovenija_RI_OL471953	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
PLE20ST2_Slovenija_RI_OL471947	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	
PLE20ST3_Slovenija_RI_OL471950	N	A	N	K	V	I	K	I	C	P	T	W	D	S	R	K	Q	Y	M	M	I	

Slika 13. Višestruko poravnanje aminokiselinskih sljedova proteina NSm TSWV-a u programu AliView. Prikazane su pozicije 110-130. Ključne pozicije za RB-fenotip virusa su 118 i 120 i označene su crvenim pravokutnikom. U oznakama izolata nalaze se naziv izolata u bazi GenBank, država porijekla izolata, fenotip RB/RI i pristupni broj za nukleotidne sljedove u bazi GenBank iz kojih su predviđeni aminokiselinski sljedovi proteina NSm.

5. Rasprava

Iako pojava izolata TSWV-a koji probijaju rezistenciju kod rajčice predstavlja rastući problem na globalnoj razini, znanstvena literatura je još uvijek relativno siromašna istraživanjima koja se bave karakterizacijom (posebice molekularnom) takvih izolata. U Hrvatskoj izolati TSWV-a s RB-fenotipom nisu do sada zabilježeni. U posljednje dvije godine (2021. i 2022.) na određenim lokacijama u Hrvatskoj zabilježeni su jaki simptomi infekcije TSWV-om i na kultivarima rajčica koji se reklamiraju kao rezistentni od strane nekih proizvođača sjemena poput Signora F1 i Ricciolo F1 (Slika 3.). Nažalost, ne postoji potvrda da navedeni kultivari posjeduju gen Sw-5b koji daje rezistenciju na TSWV (Qi i sur. 2021) jer taj podatak proizvođači sjemena često ne navode. Može se pretpostaviti da je u slučaju tih kultivara rezistencija pretpostavljena ili utvrđena kroz iskustvo njihovog uzgoja. Pojava simptoma na tim kultivarima je pobudila sumnju u emergenciju varijante TSWV-a RB-fenotipa te je upravo i hipoteza ovoga rada da se radi o takvim izolatima. Biološkom i molekularnom karakterizacijom izolata TSWV-a nastojalo se dokazati ili opovrgnuti tu hipotezu. U slučaju potvrde hipoteze to bi bio prvi put da su izolati RB-fenotipa zabilježeni u Hrvatskoj. Osim toga, biološka i molekularna karakterizacija takvih izolata bila bi dodatni doprinos relativno siromašnoj znanstvenoj literaturi.

Kod interpretacije rezultata biotesta treba odmah na početku spomenuti da pojava simptoma u grupi koja je služila kao negativna kontrola čini te rezultate nevažecima (Slika 4.). Eksperimentalne biljke u negativnoj kontroli inokulirane su samo puferom i nisu trebale razviti simptome. Simptoma nije bilo kod inspekcije 10. dan nakon inokulacije kao što je to bio slučaj s nekim biljkama u ostalim grupama uključujući i pozitivnu kontrolu. Čak i ako je došlo do kontaminacije, sve simptomatične biljke su testirane molekularnim metodama (RT-PCR) na TSWV i bile su negativne uključujući i biljke u pozitivnoj kontroli. Ovakav rezultat ukazuje na to da biljke nisu bile inficirane TSWV-om i da su zabilježeni simptomi posljedica nekih drugih faktora poput nedostatka određenih nutrijenata poput magnezija, željeza, fosfora ili kalija (McCauley i sur. 2009). Klorotično šarenilo koje se pojavilo na nekim biljkama poput rajčica već 10. dan nakon inokulacije također može biti posljedica nedostatka cinka (Rudani i sur. 2018.). Nekrotične lezije posebice one na listovima rajčica koje su uglavnom koncentrirane na rubovima listova mogu nastati zbog

nedostatka kalija (Prajapati i Modi 2012). Neki simptomi poput pojedinačnih nekrotičnih lezija na raznim biljkama i nekrotične pjege na paprikama mogu biti uzrokovane nekim gljivičnim i bakterijskim biljnim patogenima (Agrios 2005), ali bez dodatnih testiranja nije moguće utvrditi njihove uzroke. Kombinacija deficijencije nutrijenata i prisutnost nekog drugog patogena su najvjerojatnije objašnjenje za opažene simptome.

Jedno od objašnjenja za neuspješnu inokulaciju TSWV-om je razgradnja virusa zbog neispravne pohrane biljnog materijala koji je korišten za inokulaciju. Čestice TSWV-a su termolabilne i materijal treba biti čuvan u hladnom lancu nakon branja i pohranjen na temperaturi od -80 °C sve do njegova korištenja u svrhe biotesta (Petrović i sur. 2021, Škorić, osobno priopćenje). To nije uvijek bio slučaj prije i tijekom izrade ovog diplomskog rada. Tkivo je bilo pohranjivano na -20 °C i -80 °C te je višestruko odmrzavano i zamrzavano za neke druge potrebe. Uvijek postoji mogućnost da su rezultati metode RT-PCR bili lažno negativni. U tom slučaju je možda titar virusa u tkivu inficiranih eksperimentalnih biljaka bio izrazito nizak i nedovoljan za uspješno vezanje početnica zbog niske koncentracije kalupa. Vjerojatnost da je došlo do greške prilikom izvođenja same metode je vrlo mala s obzirom da je pozitivna kontrola u RT-PCR-u uspješno umnožena (Slika 9.). Najizgledniji zaključak koji se može izvući je da eksperimentalne biljke jednostavno nisu uspješno inokulirane i da su opaženi simptomi uzrokovani drugim faktorima. Zbog neuspješnog biotesta nisu dobiveni biološki podaci o krugu domaćina, ekspresiji simptoma i sposobnosti probijanja rezistencije kod rajčice.

Od svih uzoraka s terena samo tri su bila pozitivna na TSWV (Slika 9.). Uvijek postoji mogućnost da su neki uzorci na RT-PCR-u bili lažno negativni i da je ukupan broj inficiranih uzoraka prikupljenih na terenu veći. Mala količina virusne RNA u izvornom tkivu, njezina degradacija tijekom dugoročne pohrane i gubici tijekom izolacije bili bi najvjerojatniji uzroci potencijalnih lažno negativnih rezultata. Degradacija početnica je znatno manje vjerojatna (Lorenz 2012) jer je u svakom RT-PCR-u pozitivna kontrola uspješno umnožena. Kod uzoraka s potencijalno vrlo niskom koncentracijom kvalitetne virusne RNA uspješna amplifikacija bi se možda mogla dobiti povećanjem broja ciklusa, međutim tijekom izrade ovoga rada provedena je i optimizacija protokola kod koje se pokazalo da povećani broj ciklusa dovodi do velikog broja nespecifičnih amplifikacija.

Nukleotidni sljedovi fragmenta gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RdRP) TSWV-a su najbliži ekvivalentnim sljedovima nekih slovenskih izolata, što je također potvrđeno i filogenetskom analizom (Slika 10.). U tom filogenetskom stablu se sva tri hrvatska izolata grupiraju s izolatima iz Slovenije. Zbog vrlo niskih vrijednosti na čvorovima stabla koje su nakon metode samoučitanja pokazatelji pouzdanosti tog grananja, nije moguće detaljnije analizirati evolucijske odnose između svih uključenih izolata. Najvjerojatniji uzrok niskih "bootstrap" vrijednosti je nedostatak informativnih mjesta jer su korišteni vrlo kratki parcijalni nukleotidni sljedovi gena za RdRP (oko 200 nt) koji su evolucijski izrazito očuvani (Mumford i sur. 1994). Nukleotidni sljedovi su u potpunosti identični kod tri hrvatska izolata što ukazuje na to da oni potječu iz iste populacije unutar Hrvatske. Izolati 104DOT22S i 107DOT22S s iste lokacije se prema tome mogu smatrati jednim izolatom. Osim toga, sličnost sa slovenskim izolatima vjerojatno ukazuje na porijeklo iz iste virusne populacije. Vjerojatnije je da svi ti prostorno bliski hrvatski i slovenski izolati potječu iz iste populacije virusa koji cirkulira na ovim prostorima nego da su uvezeni iz inozemstva preko npr. inficiranih sadnica. Kod interpretacije treba imati na umu da se radi o vrlo očuvanom nukleotidnom slijedu i da izolati koji potječu iz različitih i čak vrlo udaljenih geografskih regija mogu imati vrlo slične nukleotidne sljedove što se vidi iz pojedinih grupacija na filogenetskom stablu. Velika sličnost nukleotidnih sljedova između izolata porijeklom iz međusobno vrlo udaljenih geografskih regija može jednostavno biti odraz visoke evolucijske očuvanosti i ne mora nužno ukazivati na introdukciju iz inozemstva.

Filogenetska analiza izolata 104DOT22S na temelju parcijalnog nukleotidnog slijeda ORF-a za nukleokapsidni protein N TSWV-a dodatno potvrđuje da navedeni izolat najvjerojatnije potječe iz regionalne populacije virusa odnosno regije koja obuhvaća Hrvatsku i Sloveniju, te možda Italiju (Slika 11.). Zanimljivo je da su izolati iz susjedne Srbije svrstani u sasvim drugu grupu. Ovakvo grupiranje moglo bi ukazivati na izostanak ili minimalnu sezonsku cirkulaciju virusa između Hrvatske i Srbije. Filogenetska analiza izolata 104DOT22S na temelju nukleotidnog slijeda ORF-a za protein NSm dodatno podupire zaključak o porijeklu jer se hrvatski izolat također grupira s izolatima iz Slovenije. Ova analiza je pokazala da se 104DOT22S ne grupira s izolatima RB-fenotipa s iznimkom jednog izolata iz SAD-a. Izolati iz Slovenije s kojima je usko grupiran imaju RI-fenotip. Nedavno su u literaturi opisani izolati RB-fenotipa u Srbiji koji zbog nepotpunog nukleotidnog

slijeda za gen NSm nisu uključeni u filogenetsku analizu (Petrović i sur. 2021). U filogenetskoj analizi na temelju parcijalnog slijeda gena NSm koju su proveli Petrović i suradnici (2021) srbijanski izolati RB-fenotipa grupirani su s nekim izolatima iz Španjolske koji se u filogenetskom stablu (Slika 12.) u ovom diplomskom radu nalaze u posve drugoj grupi od hrvatskih. Ovo upućuje na različito porijeklo 104DOT22S i srbijanskih izolata RB-fenotipa odnosno da dolaze iz različitih populacija. Iz provedenih filogenetskih analiza može se zaključiti da hrvatski izolati potječu iz europske populacije TSWV-a u kojoj nije zabilježen fenotip probijanja rezistencije kod rajčice te bi potvrda takvog fenotipa ukazivala na njegovu neovisnu emergenciju. Treba napomenuti da su provedene filogenetske analize ograničene brojem korištenih izolata (posebice onih s RB-fenotipom) i da se kod analize nukleotidnih sljedova pojedinačnih gena ne uzimaju u obzir rekombinacijski događaji te izmjene genomskih segmenata do kojih može doći kod virusa sa segmentiranim genomom kao što je TSWV (Lian i sur. 2013, Margaria i sur. 2015).

Analiza aminokiselinskog slijeda proteina NSm TSWV-a za izolat 104DOT22S (Slika 13.) pokazala je da izolat 104DOT22S ne posjeduje mutacije povezane s nastankom RB-fenotipa koje su opisane u literaturi što upućuje na to da se radi o izolatu divljeg tipa.

Unatoč neuspješnom biotestu, rezultati molekularnih analiza hrvatskih izolata TSWV-a pokazuju da se najvjerojatnije radi o izolatima divljeg tipa u slučaju 104DOT22S i 107DOT22S, odnosno izolatima koji ne probijaju rezistenciju kod rajčice. Ovime je hipoteza postavljena na početku istraživanja opovrgnuta. Činjenica da se radi o izolatima divljeg tipa je na prvi pogled u sukobu sa situacijom na terenu gdje su simptomi infekcije TSWV-om zabilježeni i kod kultivara rajčica koji se reklamiraju kao rezistentni. Na početku ove rasprave navedeno je da se ti kultivari reklamiraju kao rezistentni od strane proizvođača sjemena i da ne postoji potvrda o tome da sadrže gen Sw-5b koji pruža rezistenciju na TSWV (Qi i sur. 2021). Može se zaključiti da ti kultivari rajčica najvjerojatnije nisu toliko rezistentni kao što se reklamiraju. Alternativno objašnjenje za simptome opažene na terenu jest sposobnost varijanti TSWV-a divljeg tipa da izazovu simptome na rezistentnim kultivarima rajčice uslijed infekcije kasnije u sezoni (Škorić, osobno priopćenje) ili da kod formiranja simptoma sudjeluje cijeli virom tih biljaka, uz okolišne faktore. Potonje je i najvjerojatnije objašnjenje jer je visokoprotočnim sekvenciranjem uzoraka svih izrazito simptomatičnih rajčica pronađen i virus krumpira Y (potato virus Y, PVY) (Grbin i sur. 2022). PVY

(rod *Potyvirus*) je virus s vrlo velikim krugom domaćina, a osim u krumpiru, poznat je i kao uzročnik ozbiljnih bolesti rajčica. Štoviše, dosadašnji rezultati u okviru projekta u kojem se visokoprotočnim sekvenciranjem analiziraju viromi rajčica u Hrvatskoj ukazuju na to da su u rajčicama prisutni vrlo patogeni nekrogeni sojevi PVY-NTN (Cox i Jones 2010; Grbin i sur. 2022).

Činjenica da kod hrvatskih izolata opisanih u ovom diplomskom radu nije potvrđena sposobnost probijanja rezistencije kod rajčice je dobra vijest za povrćare koji se bave njezinim uzgojem. Unatoč tome, situacija na terenu pokazuje da i uobičajene varijante TSWV-a, vjerojatno u sprezi s ostalim uobičajenim virusima rajčice poput PVY, mogu izazvati značajnu štetu pa se preporučuje uzgoj rezistentnih kultivara kao trenutno najučinkovitija mjera prevencije. Također, bilo bi poželjno da proizvođači sjemena testiraju svoje kultivare na prisutnost gena Sw-5b, odnosno da jasno daju do znanja da na temelju tog podatka oglašavaju rezistentnost svojih proizvoda na TSWV.

6. Zaključak

1. Infekcija TSWV-om potvrđena je molekularnim metodama i korištenjem bioinformatičkih alata kod tri uzorka rajčice prikupljenih na području Biograda na Moru i Domašincea tijekom 2021. i 2022. godine.

2. Biološka karakterizacija suspektih izolata TSWV-a provedena u obliku biotesta nije bila uspješna. Eksperimentalne biljke najvjerojatnije nisu uspješno inokulirane TSWV-om zbog gubitka infektivnosti uslijed termolabilnosti virusa, odnosno neadekvatne pohrane inficiranog biljnog tkiva korištenog za inokulaciju. Simptomi opaženi na eksperimentalnim biljkama su najvjerojatnije uzrokovani kombinacijom deficijencije pojedinih nutrijenata i/ili infekcijom s nekim patogenom koji nije virusni. Zbog neuspješnog biotesta nije bilo moguće istražiti biološke karakteristike suspektih izolata TSWV-a poput kruga domaćina, ekspresije simptoma i sposobnost probijanja rezistencije kod rajčice.

3. Analiza nukleotidnih sljedova amplikona i filogenetska analiza na temelju fragmenta regije gena za RNA-ovisnu RNA-polimerazu pokazala je da su amplificirani nukleotidni sljedovi identični i da sva tri izolata najvjerojatnije potječu iz iste populacije unutar Hrvatske. Na temelju rezultata, dva izolata porijeklom iz Domašincea mogu se smatrati istim odnosno jednim izolatom.

4. Provedene filogenetske analize pokazuju da se hrvatski izolati usko grupiraju s izolatima iz Slovenije i Italije što najvjerojatnije ukazuje na njihovo porijeklo iz iste populacije unutar regije koja obuhvaća Hrvatsku, Sloveniju i Italiju. Filogenetska analiza jednog izolata iz Domašincea na temelju gena za nestrukturani protein NSm TSWV-a pokazala je da izolat dolazi iz populacije u kojoj pretežito nisu zabilježeni europski izolati s fenotipom probijanja rezistencije kod rajčice.

5. Analiza aminokiselinskog slijeda proteina NSm TSWV-a kod jednog izolata iz Domašincea pokazala je da nisu prisutne mutacije povezane s fenotipom probijanja rezistencije kod rajčice.

7.Literatura

Adkins, S., Webster, C.G., Mellinger, H.C., Frantz, G., Turechek, W.W., McAvoy, E., Reitz, S.R., & Funderburk, J.E. (2013). Detection and characterization of tomato viruses: A case study of emerging tospoviruses in Florida. IV International Symposium on Tomato Diseases, ISHS, Orlando, str. 83-85.

Agrios, G.N. (2005). Plant pathology. Elsevier.

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.

Batuman, O., Turini, T.A., LeStrange, M., Stoddard, S., Miyao, G., Aegerter, B.J., Chen, L.F., McRoberts, N., Ullman, D.E., & Gilbertson, R.L. (2020). Development of an IPM Strategy for Thrips and Tomato spotted wilt virus in Processing Tomatoes in the Central Valley of California. *Pathogens*, 9(8), 636.

Belliure, B., Janssen, A., & Sabelis, M.W. (2008). Herbivore benefits from vectoring plant virus through reduction of period of vulnerability to predation. *Oecologia*, 156, 797-806.

Best, R.J., & Palk, B.A. (1964). Electron microscopy of strain E of tomato spotted wilt virus and comments on its probable biosynthesis. *Virology*, 23(4), 445-460.

Butković, A., González, R., & Elena, S.F. (2021). Revisiting Orthotospovirus phylogeny using full-genome data and testing the contribution of selection, recombination and segment reassortment in the origin of members of new species. *Archives of Virology*, 166(2), 491-499.

Cox, B.A., & Jones, R.A. (2010). Genetic variability in the coat protein gene of Potato virus S isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Archives of virology*, 155, 1163-1169.

Derks, A.F.L.M., & Lemmers, M.E.C. (1996). Detection of tospoviruses in bulbous crops and transmissibility by vegetative propagation. IX International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants, ISHS, Herzliya, str. 132-139.

De Oliveira, A.S., Boiteux, L.S., Kormelink, R., & Resende, R.O. (2018). The Sw-5 gene cluster: Tomato breeding and research toward orthotospovirus disease control. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1055.

de Ronde, D., Butterbach, P., & Kormelink, R. (2014). Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in Plant science*, 5, 307.

de Ronde, D., Lohuis, D., & Kormelink, R. (2019). Identification and characterisation of a new class of temperature-dependent Tsw-based Tomato spotted wilt virus resistance breaking isolates. *Plant Pathology*, 68, 60-71.

EFSA Panel on Plant Health (PLH); Scientific Opinion on the risk to plant health posed by Tomato spotted wilt virus to the EU territory with identification and evaluation of risk reduction options. *EFSA Journal* 2012;10(12):3029.,str. 64.

Ferrand, L., Almeida, M.M.S., Orílio, A.F., Dal Bó, E., Resende, R.O., & García, M.L. (2019). Biological and molecular characterization of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance-breaking isolates from Argentina. *Plant Pathology*, 68(9), 1587-1601.

Goldbach, R., & Peters, D. (1994). Possible causes of the emergence of tospovirus diseases. *Seminars in virology*, 5(2), 113-120.

Grbin, D., Pecman, A., Musić, M.Š., Kutnjak, D., & Škorić, D.(2023). First report of potato virus S and potato virus Y in tomatoes from Croatia. *Plant Disease*, PDIS-06.

Gupta, R., Kwon, S.Y., & Kim, S.T. (2018). An insight into the tomato spotted wilt virus (TSWV), tomato and thrips interaction. *Plant Biotechnology Reports*, 12, 157-163.

Huang, H., Zuo, C., Zhao, Y., Huang, S., Wang, T., Zhu, M., Li, J., & Tao, X. (2022). Determination of key residues in tospoviral NSm required for Sw-5b recognition, their potential ability to overcome resistance, and the effective resistance provided by improved Sw-5b mutants. *Molecular Plant Pathology*, 23(5), 622-633.

Ivić, D., Milanović, J., Čajkulić, A.M., & Novak, A. (2016). Virus pjegavosti i venuća rajčice (tomato spotted wilt virus) na krizantemi. *Glasilo biljne zaštite*, 16(6), 539-543.

Kritzman, A., Gera, A., Raccach, B., Van Lent, J.W.M., & Peters, D. (2002). The route of tomato spotted wilt virus inside the thrips body in relation to transmission efficiency. *Archives of virology*, 147, 2143-2156.

Kulshrestha, S., Sharma, A., & Seth, C.A. (2013). Molecular biology of Tomato spotted wilt virus: An update. *Journal of Applied Horticulture*, 15(2), 71-80.

Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276-3278.

- Lian, S., Lee, J.S., Cho, W.K., Yu, J., Kim, M.K., Choi, H.S., & Kim, K.H. (2013). Phylogenetic and recombination analysis of tomato spotted wilt virus. *PloS one*, 8(5), e63380.
- Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., & Rubio, L. (2011). Evolutionary analysis of tomato Sw-5 resistance-breaking isolates of Tomato spotted wilt virus. *Journal of General Virology*, 92(1), 210-215.
- Lorenz, T.C. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, e3998.
- Margaria, P., Ciuffo, M., Rosa, C., & Turina, M. (2015). Evidence of a tomato spotted wilt virus resistance-breaking strain originated through natural reassortment between two evolutionary-distinct isolates. *Virus research*, 196, 157-161.
- McCauley, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2009). Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms. *Nutrient management module*, 9, 1-16.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R.W., (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(4), 809-834.
- Moritz, G., Kumm, S., & Mound, L., (2004). Tospovirus transmission depends on thrips ontogeny. *Virus research*, 100(1), 143-149.
- Mumford, R.A., Barker, I., & Wood, K.R., (1994). The detection of tomato spotted wilt virus using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 46(3), 303-311.
- Murray, M.G. and Thompson, W. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19), 4321-4326.
- OEPP/EPPO (2004) Diagnostic protocols for regulated pests. Tomato spotted wilt tospovirus, Impatiens necrotic spot tospovirus and Watermelon silver mottle tospovirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34, 271-279
- OEPP/EPPO (2020) Tospoviruses (Genus *Orthotospovirus*). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 50, 217-240
- Pappu, H.R., Jones, R.A.C., & Jain, R.K. (2009). Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: successes achieved and challenges ahead. *Virus research*, 141(2), 219-236.

- Peiró, A., Cañizares, M.C., Rubio, L., López, C., Moriones, E., Aramburu, J., & Sánchez-Navarro, J. (2014). The movement protein (NSm) of Tomato spotted wilt virus is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance. *Molecular Plant Pathology*, 15(8), 802-813.
- Petrović, B., Vučurović, A., Zečević, K., Delibašić, G., Krstić, B., & Stanković, I. (2021). Resistance-breaking tomato spotted wilt orthotospovirus isolates on resistant tomato in Serbia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(5), 1327-1339.
- Pourrahim, R., Farzadfar, S., Moini, A.A., Shahraeen, N., & Ahoonmanesh, A. (2001). First report of Tomato spotted wilt virus on potatoes in Iran. *Plant Disease*, 85(4), 442-442.
- Prajapati, K. & Modi, H.A. (2012). The importance of potassium in plant growth—a review. *Indian Journal of Plant Sciences*, 1(02-03), 177-186.
- Qi, S., Zhang, S., Islam, M.M., El-Sappah, A.H., Zhang, F., & Liang, Y. (2021). Natural resources resistance to tomato spotted wilt virus (Tswv) in tomato (*Solanum lycopersicum*). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 10978.
- Ribeiro, D., Borst, J.W., Goldbach, R., & Kormelink, R. (2009). Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein interacts with both viral glycoproteins Gn and Gc in planta. *Virology*, 383(1), 121-130.
- Rotenberg, D., Jacobson, A.L., Schneeweis, D.J., & Whitfield, A.E. (2015). Thrips transmission of tospoviruses. *Current Opinion in Virology*, 15, 80-89.
- Rudani, L., Vishal, P., & Kalavati, P. (2018). The importance of zinc in plant growth—A review. *International research journal of natural and applied sciences*, 5(2), 38-48.
- Samuel, G., Bald, J.G., & Pittman, H.A. (1930). Investigations on " Spotted Wilt" of Tomatoes. *Bulletin of the Council for Scientific and Industrial Research, Australia*, (44).
- Stafford, C.A., Walker, G.P., & Ullman, D.E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9350-9355.
- Stevens, M.R., Scott, S.J. & Gergerich, R.C. (1991). Inheritance of a gene for resistance to tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Lycopersicon peruvianum* Mill. *Euphytica*, 59, 9-17.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.

Thompson, G.J. & Van Zijl, J.J.B. (1995). Control of tomato spotted wilt virus in tomatoes in South Africa. *Tospoviruses and Thrips of Floral and Vegetable Crops* 431, 379-384.

Turina, M., Kormelink, R., & Resende, R.O. (2016). Resistance to tospoviruses in vegetable crops: epidemiological and molecular aspects. *Annual review of phytopathology*, 54, 347-371.

van der Biezen, E.A., & Jones, J.D. (1998). The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. *Current Biology*, 8(7), 226-228.

Wang, H., Wu, X., Huang, X., Wei, S., Lu, Z., & Ye, J. (2022). Seed transmission of tomato spotted wilt orthotospovirus in peppers. *Viruses*, 14(9), 1873.

Wang, M. & Gonsalves, D. (1990). ELISA detection of various tomato spotted wilt virus isolates using specific antisera to structural proteins of the virus. *Plant Disease*, 74(2), 154-158.

Internetski izvori:

ICTV (2021) Virus Taxonomy: 2021 Release, <https://ictv.global/taxonomy> (pristupljeno 19.10.2022.)

Slika 2.A - <https://www.ipmimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=6903> (pristupljeno 24.4.2023.)

Slika 2.B. - <https://www.syngenta.co.in/how-manage-virus-infections> (pristupljeno 24. 4. 2023.)

8.Prilozi

Prilog 1. Nukleotidni sljedovi segmenata M i S TSVW-a izolata 104DOT22S

Prilog 2. GenBank pristupni brojevi sljedova korištenih u filogenetskoj analizi na temelju parcijalnog slijeda ORF-a gena za protein N

Prilog 3. GenBank pristupni brojevi sljedova korištenih u filogenetskoj analizi na temelju potpunog slijeda ORF-a gena za protein NSm

Prilog 4. Konsenzus-sljedovi fragmenta gena za RdRP TSWV-a.

Prilog 1. Nukleotidni sljedovi M i S segmenta TSVW-a izolata 104DOT22S

>104DOT22S_M_segment

AGAGCAATCAGTGCCTCAGAAATACCTATTATACACTTTGCTAAGAATCAATCAATTACATTACACAAGCTCCTACCTTAGGCTGTTGAAC
TCAAAATGTTGACTCTTTTCGGTAATAAGGGGTCTTCTAAGTCTGCCAGAAAGGATGAAGTCTTTAGTTTCACTTGCTAAACATAATGGTAA
TGTTGAAGTCTCTAAGCCATGGTCTTCTCTGATGAAAAGCTTGGTTGACTAAAGCTATGGATACATCCAAGGAAAGATACTGTTGAACACA
GAGGGGACATCTTCTTTGGAACTATGAATCTGATTCTATCAGAAATCAGAGGGTTATGATCTTTCTGCAAGAATGATAGTAGATACAAACC
ATCATATCTCAAACGGAAAAATGATCTTTTTGTTGGCAACGGGAAGCAAAACGCAAATAAGGTATCAAGATCTGTCCAACCTGGGACAGCA
GAAAAAATACATGATGATTTCCAGGATTGTGATATGGGTCTGCCACCACATACCAAACCTACAGGGAACTTGTGGTTGCCCTGGTTCGATC
CCAACATGCCATCTGAAAAGCAAGTATTCTGAAGGGTCAAGGGGACGATAACTGATCCTATATGTTTTGTCTTTTATCTGAACTGGTCTATTCC
GAAAAATGAATAACACTCCAGAAAACTGCTGTCAGCTGCATTTGATGTGCAGCCAAGAATAACAAGAAGGGGGTTCTTTCCGGTAGTGTATGTA
TTCTTGGACAAAGGAGTTTTGTGATTCACCCAGAGCTGATAAAGATAAAAGTTGCATGGTTATACCTTAAACAGAGCTATTAGAGCTAGATCT
CAAGCATTCATTGAGGCTTGAAGCTGATAATTCCTAAAGGGAACAGTGAGAAGCAGATTAAGAGCAGCTTAAAGAAATGAGCTCAATCTT
GAGAGATCAGTTGAAGAAGAAGAGGAAGGATTTCTGATAGTGTCTCAGTTATCTTTTGTGAAAATATAGTACTTTTAGTGTCACTTATTTA
AGCTTAAATTTCTGTTAATTTTGCATTTTAAATCAAAAACCAAAACCAAAAACAAAAAAGAAAAACAAAAAATCAAAACAAAAACAAAAACA
AATAAGGCTGAAAAGCCAAACTTTGGTCCGAAGACTCTTTTGTGTTTTTGTATTTTGTGTTTTTGTGTTTTTGTGTTTTTGTGTTTTTATATATAC
ATAATCTGACTAATGTAGAAGATTGAATCAAATTTAGCCTGTGATAAGCAGACTCAGACAAGGTGAGAGAAATCCATAGGTGGCCTTCGTCTT
GTCATTGTATCTTTCATTAACATAGGGGCTTTGATCTCAGAATCATCATCCTCTATCTTGGATCTAGATTTATAAGATTCGTTCTTGACATAT
CCTTTACAAATGGTTGTTAGAATAGAACAGAAATAAATCACAAGGAAAATGAATGCAATAAGCAATATCACTCTGATAGTATCAAAAAATGAG
CCAAAATAACTTGAATGAAATTGAATGGGCTTTAATAATAATCCAGAAAGCCCATGCTGAAGAATCAGAATTAATTTGTTGCTCTTCATGAG
CATACTCATTTTTGATCTATTATGTTCTCTGGTCTTCTACAATAACATTATTGACCAGAATCCACAGAAATATCCGGATTGCCTTCTGGAT
ACAATGTCATTTTCTTGTGAGGATTAGCAGAACAAAACATTGTTATGTTGATTTTATAGATCCTTTTTAACAGCCAGCTGATAAGTAGAT
AGAGAGCAAGCATCTATAGAAATTGCAGTAGAAAATGTCAAATCTGAGAAAAATCTAAAATGCAAGATAAACCTTGACCGCATAGAAAGACA
GCCGTTGCAATTAAGCTTGTGAAGTTATGGAAGGTTCTTAGGAGCAACTTTAAAAGATCAGATGGAAGATCAACGACAATTTTGTGTTT
CCCTAAACTGAAAGCTTTTCCAAAGAAAACTAGAGAAATTTGAAACTAACGGGAATATCTGATATTTGATCTAAACAGATCAAAATCTG
TATGTATCATATCCGCTGTTTTAATAGTGATTGTTTTTCCCTATTGCTGCACAATCCCAAGACATGTATCTCTCTAGAGTTTTCTTAGTAA
AAATAGGCACTCCATCATGAGTCAATTGTGGGTGACCAACATTTTACAGGATCATTAGGTTTGAATATTTCCAGAATAAATATGGCTGTC
AGGTCCATGAGCTATCAGTTCACCTATAGTGATACCATCATTGTGCAATCTGCTGTATATCAGCTTGAAACAAGGCAGTTTCATAAGGAACC
TCTTCAGTAATCCTTGAGCACTGACCTCCTAAAATACCAGAAATACAAACATCTGCCACTATAGTTGATTTTAGCACTGAATAAATCTGTATGA
TTTATCCATGTCATAGATATCCGACAGAATCCGCATGTGGCACCTTCATTAATTGCAAAACACCAAGCTTCTTCACATCCCAATAAGAAGTTG
GTGTTATACAAAAATCTGGAAACAGTTAAAGCTTGATTTTTCTGCAAGTGTACAGTTTCTGTACAAGTGGAAATAAAAAATCTGTGTGAGT
GCTTTGGATAGGAGCTGTTGTGATTTTTCTGACACTTCATAATGAATCCACACTTTTGTATATAAATCACAAATTTTTCTGCTGTTTCTGAGGT
CTTATCATTTAACATGAATATAGTCCCTCCTCCTAAAAGAGATTGTTCTATCATGTATCTATATTTCCATCCACAACAGAATCAAAGATCAA
TGACTGTCTAGGCAGAATGTTCTCTGGTATGCTTGTGTTCTGTTTGTAGAGAATCTCCTGCAATCATTCCAGAAATTTGTCTGTACGATTATA
AGAATCTATTATACCATCCTCAATCTTAGCCTCATACAGACCAACCGATGTTAACCTAAAGAGCTTCTGTATAATCTGAAAACCCATTAT
ATAAAGGTTTGTCCGAAATAAATCTAGGTAATCGCAACCCAGTCTGCATTTTATAAGATTATCAATAGATGGGTTTGCAGCACAATTTCTGGTT
CTCTATGCAATCATTAGGACCTTCTATAACAATGTTAGTGCCAAAGATACTTTCTATAATTTTATCTTCTTTTACATTACAGTAACATTGATCTTTT
TCTGGCATTTTTCAAATTTGCTTGTAAACCAAAAATGGACAGCTGGAACATAAAAACATCCACTCAAACATTGGGTAGTTTGGCCATAGACA
TGGGCATTTGAGACAAAATGATCAAACCTATTAAGATTTAGTCACAAATTTTCAAACTAAAGCTCAGCTTAGTGTACTATTAGATGGAA
CCATTCATGCTAGTCCACTGTGTTTGTGAGCCATGATCTGTTTCTTTGGACAATATGGGACACTCTGAAGAATGTTCTTTTGAAGCTTTGC
TTTTGTTGCAGATGCAAATTTTGTACATTATGTTGTTGATTATGCACAAATTTGCCACAGTTAGAACATTTAAATGGAAATATTTCCACAAGCAA
TTTATGAGCAACAAAATAGGGTATGTGATCAAGCCTATAAGATCATACCAGAGAAAGAGGGGTTGGTTGTCTTGTACTAACCACCGGATA
GGGAAATAGATCAACAAAGCTATCAATATTAATCTTCAAGAAAAATGATGCAGGCTGTTTGTATAAATGCTTTTTGAATATTTGATTAT
GCAATCTCTAACTCTTTGTTTGTGTTTGGTATTTTAGCTGATTTGTCACCGCACAAGAGATTGTGCTCACCATCTAACATTTCTTCAGTAAAAGT
GATGCTTGTCTGATCCAGAAAAGGATATGACCTTGTGTTCCACATTTTACCAGGCTTCTTTATCAAATAACCCATGATCTTCTCGGGGCTAGTGA
TGCTAACAGTATAGGGATTGGCAAAGTTCGATTTAGTTATTTGCGATCACCAGATAACTTTACAGTTTGTAAATGATACTGTTCCATTAGTAGG
GTAAGAGTTATAAGTTATAGGATAATTATCTTGCCTCAGGCTTTCTGAAATGAAGAATTTTGTCCAACCTGAAAAATGCCTTTTGTGTTCAAGTT
TGGTAATGGGAATAACCGGGACTTTGGAGAATCTTTTGGTAGATTTAAAGAATTTGCACATTTTCTAAACCTTCCGCTGAATCAGAAACACA
GGAATATATGACACCATTATTTCCACTTGATAATAAACATATAAGTGGATATCCCTTTTATCTCACATTTTAAAGAAGCAATTTCAAGCAT
TGTTAGGAAGATCTGAGACAGAGATTGTTTTTGCCTAGTTGACTCAGCAAAAATAGGGATGGTTGATCCCTCTCTCGTATCTGACGGGTTCC
AGGAGTCTGAGATTCTAGCATCAGATTAGTCAAAGTCTCAAGATAGCCTTGCCTGAAATCGATGCAGCAGTAGGTACTTCTCAGCAGA
ATCATATAAACCTCAGGATGGTCTCCACGAATTTTCTACTTTGGCATCTGTGGCTTTGAAGATCAAGAATGCCAACAGACAGAACTCAGG
GCAATTTGAAAAGACTCAATTTTACTAGTCTAGTATTTTAAAATTTCTCATCTTAGACGCTGCTCAGATTATAATGGTTATATGATTAAT
TTCAAGATGTCTGGATTAAGGTTTTTGTGCACTGATTGCTCT

>104DOT22S_S_segment

```
AGAGCAATTGTGTCATAATTTTATCTTAATCAAACCTCACTTAGAAAATCACAATACTGTAATAAGAACACAGTACCAATAACCATAATGTCTT
CAAGTATTTATGAGTCGATCATTAGACAAGAGCTTCAGTCTGGGGATCAACTGCATCTGGTAAAGCTGTTGTAGATTCTTACTGGATTCATGA
ACTTGGTACTGGTTCTCAACTAGTTCAGACCCAAGTATTTCTGATTCAAGAAGCAAAAGTAGCTTTGGCTATACTGCAAAAGTAGGGGATCTT
CCTTGTGAAGAAGAAGAGATTCTTCTCAGCATGTGTATATCCCTATTTTTGATGATATTGATTTTAGCATCAATATTGATGACTCTGTTCTGGC
ATTATCTGTTTGTCAAATACAGTCAATGCTAATGGAGTGAACATCAAGGTCATTTGAAGGTTTTGTCTCCTGCTCAGCTCCACTCTATTGGGT
CTATCATGAACAGATCTGATATTACGGATCGATTCCAGTCCAGGAAAAAGATATAATCCCAATGACAGATACATTGAAGCTGCAAAACAAAG
GCTCTTTGTCTTGTGTCAAAGAGCATACCTATAAGGTCGAGATGTGCTATAATCAAGCTTTAGGCAAAGTGAATGTTCTATCTCCTAATAGAAA
TGTCATGAATGGCTGTACAGTTTCAAGCCAAATTTCAATCAAGTTGAAAGCAACAACAGAACTGTGAATTCTTGCAGTGAATCTCTGCTC
ATGTCAGCAGAAAACAACATCATGCCTAACTCTAAGCTTTTGTCAAAGCTTCCACTGATTCTCATTTCAGGCTGAGCCTCTGGCTAAGGGTTC
AAAGGTTTTGAAGCAGATTTCCATTAGAAAATTGTTCAAGGTTGCAGGAGATGAAACAAAATAAACATTTTATTTATCTATTGCTGCATTCCA
AACTATAACAGTGTGAGACAGCTTAAACATTACTGTTATTTGCAAACATCAGCTCCCAATTCGTAATTTAAAGCTCCTTTTGAATTATCAAT
GATGTTTTCTGATTTAAAGGAGCCTTACAACATTGTTTCATGATCCTTCATATCCCAAAGGATTGTTTCATGCTCTGCTTGAAACTCACACATCTTT
TGACAAGCTCTTTGCAACAACTTGCAAGAAGATGTGATCATCTACACCTTGAACAACCATGAGCTAACTCCTGGAAAGTTAGATTTAGGTGAA
AAAACCTGAATTACAGTGAAGATGCCTACAAAAGGAAATATTTCTTTCAAAAACACTTGAATGTCTTCCATCTAACACAAAACTATGTCTTA
TTTAGACAGCATCCAAATCCCTTCTGGAAGGTAGACTTTGCCAGGGGAGAAATAAAATTTCTCCGCAATCTATTTAGTTGCAAAATCTTTGT
TAAAGCTTGATTTAAGCGGGATCAAAAAGAAAGAATCTAAGATTAAGGAAGCACAGGCTTCAGGATCAAAATGATCTTGTCTGTCCAGCTTT
TTCTAATTATGTTATGTTTATTTTCTCCTTACTTATAATTTTCTGTTTGTCAATTTCTTCAAATTCCTCCTGCTAGTAGAAACCATAAAAA
CAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAAATAAAA
ATCCCGAAAGGGACAATTTTGCCAAATTTGGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTGTTTT
TTATTTTATTTTATTTGTTTTATTTTATGTTTTTGTGGTTTTTATTATGTTATTTATTAAGCACAAACACAGAAAGCAAACTTTAATTA AAC
ACACTTATTTAAAATTAACACACTAAGCAAGCACAAGCAATAAAGATAAAGAAAGCTTTATATTTTATAGGTTTTTTTTATAGTTTAACTTAC
AGCTGCTTTAAGCAAGTCTGCGAGTTTTGCCTGTTTTTAAACCCAAACATTTATAGAACTTGTAAAGAGTTTCACTGTAATGTTCCATAGCA
ATACTTCTTTAGCATTAGGATTGCTGGAGCTAAGTATAGCAGCATACTTTTCCCCTTCTTACCTGATCTTCATTCAATGCTTTGCTTT
TCAGCACAGTGCAAACTTTCCCTAAGGCTTCCCTGGTGCATACTTTTGGGTCGATCCCAAGGTCCTTGTATTTGCATCCTGATATATAGCC
AAGACAACACTGATCATTTCAAAGCTATCAACTGAAGCAATAAGAGGTAAGCTACCTCCAGCATTATGGCAAGCCTCACAGACTTTGCATCAT
CAAGAGGTAATCCATAGGCTTGAATCAAAGGGTGGGAAGCAATCTTAGATTTGATAGTATTGAGATTCTCGGAATCCCAGTTTCTCAACAA
GCCTGACCTGATCAAGCTATCAAGCTTCTGAAGGTCATGTGAGTGGCTCCAATCCTGTCTGAAGTTTTCTTTATGGTAATTTTACAAAAAGTA
AAATCACTTTGCTTAATAACCTTCAATATGCTCTGACGATTCTCAGGAATGTCAGACATGAAATAACACTCATTTTTTGTCTGGTCAAGGTTT
TCCAGACAAAAGTCTTGAAGTTGAATGCTACCAGATTCTGATCTTCTCAAACCTCAAGGCTTTGCCTTGTGTCACAAAGCAACAATGCTTTC
CTTAGTGAGCTTAACTTAGACATGATGATCGTAGAAGTTGTTATATGCTTTGACCGTATGTAACCTCAAGGTGCAAAAGTACAACCTCTGTATCC
CGCAGTCGTTTCTTAGGGTTTTAATGTGATGATTTGTAAGACTGAGTGTTAAGGTTTGAATAAAATTTGACACAATTGCTCT
```

Prilog 2. GenBank pristupni brojevi sljedova korištenih u filogenetskoj analizi na temelju parcijalnog ORF-a gena za protein N

KM096536, KM096537, KM096541, AY856344, HQ406983, HQ406903, HE600703, AY598831, DQ915948, GU369726, KC261952, KJ139671, KC261949, KC294570, KP684518, AB010997, KM365066, KC494484, KP008131, KM096540, GU369721, GU369729, AJ297610, D13926, AJ297609, MW067015, MW067023, MW067014, GQ373173, AJ296599, AJ297611, AF020660, FR693053, FR693255, AB277582, EF195228, AY744468, AF064469, AF020659, AY744479, DQ376180, L20953, AF306490, OL471948, OL471951, OL471954, S54325.

Prilog 3. GenBank pristupni brojevi sljedova korištenih u filogenetskoj analizi na temelju potpunog slijeda ORF-a gena za protein NSm

HM015523, HM015524, FM163370, HM015518, HM015522, HM015513, FM163371, KC261954, KC261957, KC261960, AY744488, AY744489, AY870389, AY744482, AF208498, KU552117, KM657117, FM163372, FM163373, HM581941, KC261966, AF208497, HQ830188, HQ830185, HM015517, HM015519, HM015520, HM015521, HM015515, HM015516, OL471947, OL471950, OL471953, AF213674, HQ537114, AY744492.

Prilog 4. Konsenzus - sljedovi fragmenta gena za RdRP TSWV-a.

>104DOT22S

GTTTTAGCTATCATATTTAAATCCAATTTTAACTACTGGTGAAGCTAGTTTAAATGATAGAATGCATTTTAAATGTATGTT
AAATTGAAGAAGGTTTGTATACCAACAGATATTTTTTTGAATCTAAGAAAAGCTCAAGGAACTTTTGGGCAAATG
AAACTGCTATAGGACTTTTACTAAAGGTTTGACAACAAACACATACCCTGTTAGCATGAATTGGTTGCAAGGC

>107DOT22S

GCTATCATATTTAAATCCAATTTTAACTACTGGTGAAGCTAGTTTAAATGATAGAATGCATTTTAAATGTATGTTAAATTG
AAGAAGGTTTGTATACCAACAGATATTTTTTTGAATCTAAGAAAAGCTCAAGGAACTTTTGGGCAAATGAACTG
CTATAGGACTTTTACTAAAGGTTTGACAACAAACACATACCCTGTTAGCATGAATTGGTTGCAAAGGCAAT

>52STT21S

GCTATCATATTTAAATCCAATTTTAACTACTGGTGAAGCTAGTTTAAATGATAGAATGCATTTTAAATGTATGTTAAATTG
AAGAAGGTTTGTATACCAACAGATATTTTTTTGAATCTAAGAAAAGCTCAAGGAACTTTTGGGCAAATGAACTG
CTATAGGACTTTTACTAAAGGTTTGACAACAAACACATACCCTGTTAGCATGAATTGGT

Životopis

Rođen sam 25.9.1996. godine u gradu Karlsruhe u Njemačkoj. U Zaprešiću sam završio OŠ Ljudevita Gaja te sam nakon toga pohađao i završio Gimnaziju Lucijana Vranjanina u Zagrebu (prirodoslovno-matematički smjer). Tijekom osnovne i srednje škole pohađao sam tečajeve engleskog i njemačkog jezika u školi stranih jezika ANGLO u Zaprešiću. Nakon završene osnovne škole bio sam na putovanju u Ujedinjenom Kraljevstvu u sklopu opcionalnog programa škole stranih jezika Global Lingua (Zaprešić) te sam tamo pohađao školu engleskog jezika (North Devon School of English) u gradu Barnstapleu. U prvom razredu gimnazije položio sam ispit B2 First (Cambridge English: First). U četvrtom razredu gimnazije osvojio sam 5. mjesto na Državnom natjecanju iz filozofije. Nakon završetka gimnazije upisao sam i završio Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te sam nakon toga upisao Diplomski studij molekularne biologije. Tijekom studija bio sam demonstrator na kolegiju Zoologija, sudjelovao sam nekoliko puta na Noći biologije i odradio dvije Laboratorijske stručne prakse te Stručnu praksu na fakultetu, Klinici za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" i u Inovagenu (Animlabs).