

Identifikacija čekičastog viroida jabuke u retrospektivnoj studiji ekstrakata ukupnih nukleinskih kiselina iz jabuka

Matijević, Jana

Undergraduate thesis / Završni 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:217:186179>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jana Matijević

**Identifikacija čekićastog viroida jabuke u
retrospektivnoj studiji ekstrakata ukupnih
nukleinskih kiselina iz jabuka**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Jana Matijević

**Apple hammerhead viroid identification in
retrospective analysis of total nucleic acids
extracts from apples**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Biologije na Zavodu za Mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Identifikacija čekićastog viroida jabuke u retrospektivnoj studiji ekstrakata ukupnih nukleinskih kiselina iz jabuka

Jana Matijević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Čekićasti viroid jabuke (eng. *apple hammerhead viroid*, AHVd) pripada porodici *Avsunviroidae* i rodu *Pelamoviroid*. Primarno inficira jabuke (*Malus domestica* Borkh.), no njegova prisutnost je potvrđena i u nešpuli (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). Cilj rada bio je potvrditi prisutnost AHVd-a u prethodno istraživanim izolatima kultivara jabuka na području Hrvatske. Analizirano je 15 prethodno istraživanih izolata jabuka i tri izolata pripremljena za potrebe ovog rada. Iz ekstrakata ukupnih nukleinskih kiselina jabuka metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) uz primjenu početnica specifičnih za AHVd u elektroforetskom agaroznom gelu detektirana je prisutnost viroidnih amplikona u čak sedam uzoraka. Iz šest uzorka dobivene su konsenzus-sekvence parcijalnog AHVd-genoma. Viroid je pronađen u raznim sortama jabuka na različitim lokacijama, a njegova prisutnost u izolatima jabuka potvrđena je Sangerovim sekvenciranjem i filogenetskom analizom, te usporedbom sekundarnih struktura viroidnih genoma. Većina hrvatskih AHVd-varijanti se na filogenetskom stablu grupirala zajedno zbog blizine lokacija jabuka iz kojih su prikupljeni uzorci, dok su se dva uzorka izdvojila i grupirala sa sekvencama iz drugih država. Zbog blizine uzgojne lokacije jabuke Mađarskoj jedan je uzorak AHVd u skupini s uzorcima iz Mađarske i Češke, dok je drugi uzorak grupiran s kanadskim uzorcima vjerojatno zbog uvoznog porijekla te sorte jabuke.

Ključne riječi: AHVd, Hrvatska, *Pelamoviroid*, prvi nalazi

33 stranice, 9 slika, 8 tablica, 46 literaturnih navoda, jezik izvornika: Hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: prof. dr. sc. Dijana Škorić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Apple hammerhead viroid identification in retrospective analysis of total nucleic acids extracts from apples

Jana Matijević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Apple hammerhead viroid (AHVd) belongs to the family *Avsunviroidae* and the genus *Pelamoviroid*. It primarily infects apples (*Malus domestica* Borkh.). This research was conducted in order to confirm the presence of AHVd in the previously investigated isolates of apple cultivars in Croatia. In the scope of this study, 15 previously researched apple isolates and three samples isolated for the purpose of this work were analyzed. The presence of viroid amplicons in electrophoresis gels was detected in seven total nucleic acids extracts from apple after reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers specific for AHVd. Six consensus sequences of the partial AHVd genome were obtained. The viroid was found in various apple varieties in different locations and its presence was confirmed by phylogenetic analysis of Sanger sequences and the comparison of secondary structures. Most of the Croatian samples were grouped together on the phylogenetic tree due to the proximity of the apple cultivation sites, while two samples grouped with sequences from other countries. One isolate of AHVd from apple growing near the Hungarian border grouped with samples from Hungary and the Czech Republic, whereas the other was grouped with Canadian samples probably due to the origin of the apple variety that was most likely imported.

Keywords: AHVd, Croatia, *Pelamoviroid*, first report

33 pages, 9 figures, 8 tables, 46 references, original in: Croatian

Thesis is deposited in the Central Biological Library.

Mentor: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. OPĆENITO O VIROIDIMA	1
1.2. STRUKTURA VIROIDA	1
1.3. VIROIDNE PORODICE	2
1.4. REPLIKACIJA VIROIDA	4
1.5. VIROIDI JABUKA	6
1.6. APPLE HAMMERHEAD VIROID (AHVd)	6
1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA	7
2. MATERIJALI I METODE	9
2.1. MATERIJALI	9
2.1.1. Biljni materijali	9
2.1.2. Komplet za izolaciju ukupnih RNA iz biljnog tkiva Qiagen RNeasy Plant Mini Kit.....	10
2.1.3. Kompleti i kemikalije korištene u RT-PCR	10
2.1.4. Otopine i puferi korišteni u elektroforezi na agaroznom gelu	11
2.1.5. Molekularni DNA standardi	11
2.1.6. Računalni programi za analizu sekvenci	11
2.1.7. Računalni programi za filogeniju	12
2.2. METODE	12
2.2.1 Ekstrakcija ukupnih nukleinskih kiselina iz jabuka	12
2.2.2. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)	13
2.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu	17
2.2.4. Sekvenciranje	17
2.2.5. Analiza sekvenci i filogenija	18
3. REZULTATI	19
3.1. DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA AHVd	19
3.2. VIROIDNE SEKVENCE	21
3.3. OPTIMIZACIJA PCR-CIKLUSA	22
3.4. USPOREDBA SEKUNDARNIH STRUKTURI	22
3.5. FILOGENETSKA ANALIZA	23

4. RASPRAVA	26
5. ZAKLJUČAK	29
LITERATURA	30
ŽIVOTOPIS	33

1. UVOD

1.1. OPĆENITO O VIROIDIMA

Viroidi su gole, prstenaste, jednolančane molekule RNA koje ne sadrže protein-kodirajuće sekvence. Veličina im varira između 220 i 450 nukleotida; stoga se smatraju najmanjim autonomno replicirajućim nukleinskim kiselinama (Lee i Koonin, 2022). Prvi je viroid opisao Theodor Otto Diener (1971) kao uzročnika bolesti ušiljenosti gomolja krumpira te ga je shodno tome imenovao viroidom ušiljenih gomolja krumpira (eng. *potato spindle tuber viroid*, PSTVd). Diener je u kasnijem radu postavio temelje karakterizacije viroida: i) patogen postoji in vivo kao slobodna RNA-molekula; ii) virusne se čestice ne mogu detektirati u zaraženom tkivu; iii) infektivna RNA-molekula ima malu molekulsku masu; iv) infektivna RNA se autonomno replicira u stanicama domaćina; v) infektivna RNA se sastoji od samo jedne molekularne vrste (Diener, 1987). Domaćini viroida su biljke, i to kritosjemenjače, u čijim se stanicama umnažaju putem replikacije kotrljajućeg prstena. Primarno inficiraju dvosupnice, dok se u jednosupnicama mogu pronaći samo dvije vrste *coconut tinganaja viroid* (CTiVd) te *coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd). Simptomi viroidnih bolesti slični su simptomima virusnih infekcija te uključuju kloroze, nekroze, deformacije listova i plodova, epinastije (uvijanje listova prema naličju) te venuće i ugibanje cijele biljke ili njenih dijelova (Hammond i Owens, 2006). Česta je pojava asimptomatskih viroidnih zaraza. Takve biljke tijekom zaraze i cijelog svog životnog vijeka ne pokazuju simptome. Budući da viroidi inficiraju mnoge kultivirane biljne vrste, istraživanje viroida je važno u poljoprivrednoj proizvodnji, odnosno na gospodarskoj razini.

1.2. STRUKTURA VIROIDA

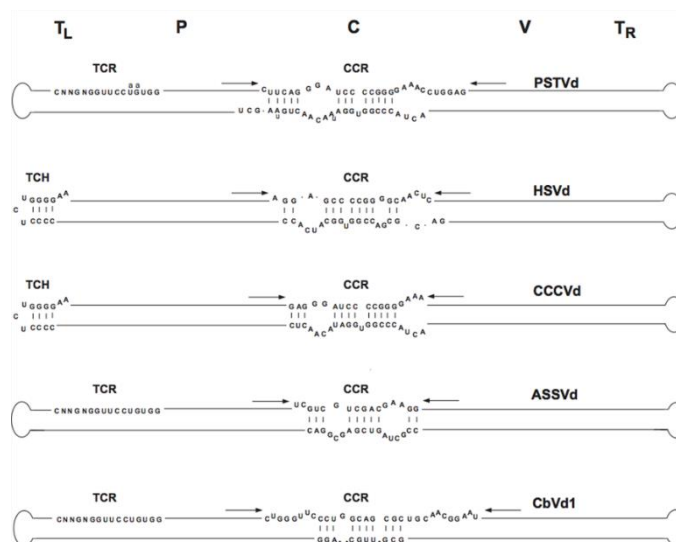
Prstenasta viroidna RNA, zbog visoke razine intramolekulske komplementarnosti nukleotida, zauzima razne sekundarne i tercijarne strukture koje su važne u replikacijskom ciklusu, odnosno za odvijanje svih viroidnih funkcija (Diener, 1979). Zbog nekodirajućeg genoma strukturni motivi zaslužni su i za interakcije s proteinima domaćina (Flores i sur., 2012). Interakcije sekundarnih i tercijarnih struktura viroidnih RNA s faktorima domaćina važne su za virulenciju odnosno patogenost viroida te im omogućuju kretanje kroz biljna tkiva (Flores i sur., 2015; Venkataraman

i sur., 2021). Dodatno, štapićasta struktura (Slika 1.) nastala zbog intramolekulskih sparivanja nukleotida sprječava degradaciju viroida od strane egzo- i endonukleaza domaćina (Moelling i Broecker, 2021). Manjem broju viroida posebno je značajna i čekićasta struktura koja ima ribozimsku aktivnost ključnu u replikaciji ovih viroida.

1.3. VIROIDNE PORODICE

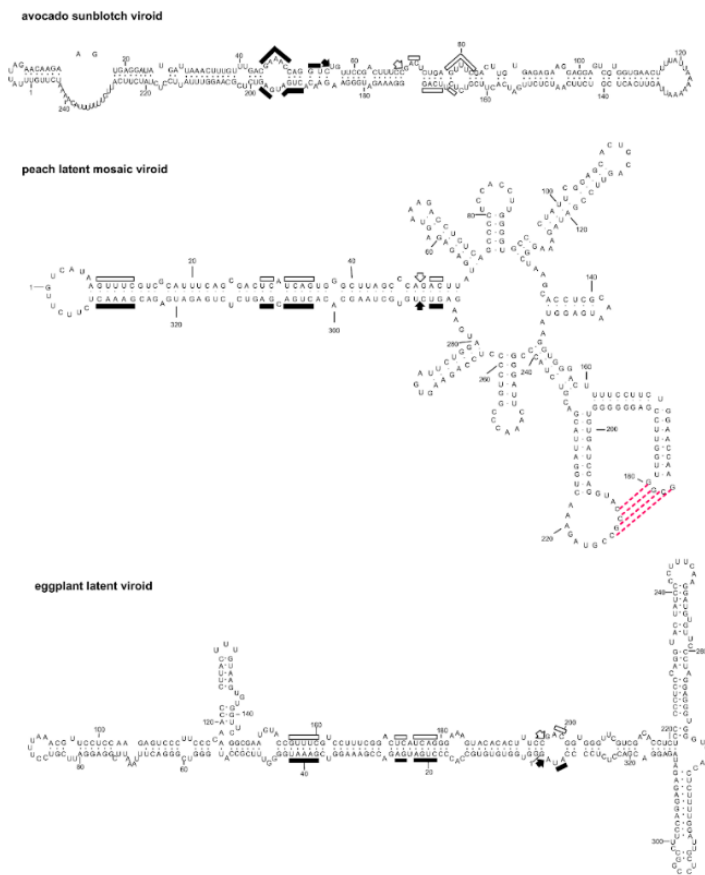
Viroidi su na temelju svojih molekularnih i bioloških značajki podijeljeni u dvije porodice *Pospiviroidae* i *Avsunviroidae*. One za sada sadrže 8 rodova i 33 viroidne vrste (Di Serio i sur., 2020).

Porodica *Pospiviroidae* je veća i uključuje 5 rodova: *Apscaviroid*, *Cocadviroid*, *Coleviroid*, *Hostuviroid* i *Pospiviroid*. Članovi porodice (Slika 1.) posjeduju središnju konzerviranu regiju ili domenu (eng. *central conserved region*, CCR) koja je značajna za replikaciju viroida (Gas i sur., 2007). Prstenasta RNA članova ove porodice poprima oblik štapića *in vitro* (Steger i Perreault, 2016), no postoje dokazi da se PSTVd nalazi u sličnoj konformaciji i *in vivo* (López-Carrasco i Flores, 2017). Osim CCR-domene, viroidi ove porodice imaju lijevu i desnu terminalnu domenu, domenu patogenosti te varijabilnu domenu (Giguère i Perreault, 2017). Članovi porodice *Pospiviroidae* repliciraju se asimetričnim putem unutar jezgre domaćina.



Slika 1. Struktura reprezentativnih članova porodice *Pospiviroidae*. Odozgo prema dolje prikazani su: potato spindle tuber viroid (PSTVd), hop stunt viroid (HSVd), coconut cadang-cadang viroid (CCCVd), apple scar skin viroid (ASSVd) i coleus blumei viroid 1 (CbVd-1). Navedeni viroidi su predstavnici svih rodova koji pripadaju porodici *Pospiviroidae*. U sekvenci viroida ističu se lijeva i desna terminalna domena (TL i TR), domena patogenosti (P), varijabilna domena (V) te središnja konzervirana regija ili domena (CCR). Istaknuti su i evolucijski očuvani oligonukleotidni sljedovi poput terminalne konzervirane ukosnice ili regije (eng. *terminal conserved hairpin/region*, TCH/R) (preuzeto iz Di Serio i sur., 2020).

Porodica *Avsunviroidae* trenutno obuhvaća 3 roda: *Avsunviroid*, *Elaviroid* i *Pelamoviroid*. Zbog nedostatka centralne konzervirane regije (Slika 2.) ovu je porodicu zahtjevnije identificirati od porodice *Pospiviroidae*. Ipak, postoje četiri niza konzerviranih nukleotida koji su komplementarni s nukleotidima na drugoj strani prstena (Di Serio i sur., 2018). Ta značajna karakteristika je dio čekićastog ribozima (eng. *hammerhead ribozyme*) koji je prisutan u strukturi svih članova ove porodice. Osim ribozimske domene, u porodici *Avsunviroidae* postoji niska razina očuvanosti primarne strukture i struktura višeg reda. Viroidi ove porodice poprimaju razgranjenu konformaciju u nativnom stanju, no mogu biti i štapićasti (Giguère i sur., 2014). Pripadnici porodice *Avsunviroidae* repliciraju se u kloroplastima stanica domaćina takozvanim simetričnim načinom (Di Serio i sur., 2018).

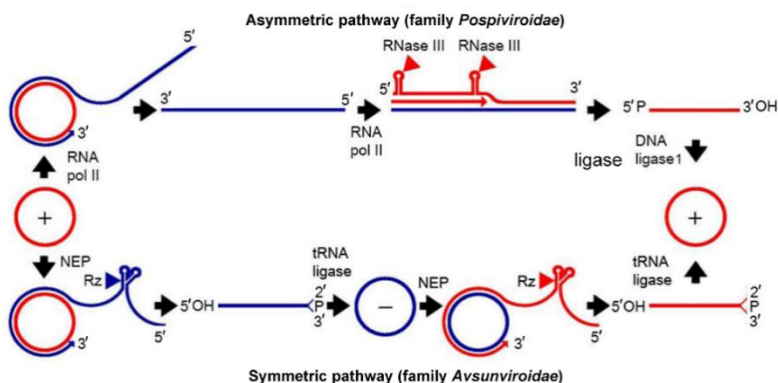


Slika 2. Struktura reprezentativnih članova porodice *Avsunviroidae*. Odozgo prema dolje prikazani su: avocado sunblotch viroid (ASBVd), peach latent mosaic viroid (PLMVd) i eggplant latent viroid (ELVd). Navedeni viroidi predstavnici su rodova koji pripadaju porodici *Avsunviroidae*. Najznačajnija struktura ove porodice, čekićasti ribozim, označena je bijelim (za tzv. plus-polarnost) i crnim pravokutnicima (za minus-polarnost), dok su mjesta samourezivanja označena strelicama. U strukturi PLMVd označena je terciarna interakcija *kissing-loop* (crvene isprekidane crte) značajna za replikaciju viroida roda *Pelamoviroid* (preuzeto iz Di Serio i sur., 2018).

1.4. REPLIKACIJA VIROIDA

Viroidna RNA je jednolančana te se replicira (Slika 3.) putem RNA-intermedijera (Grill i Semancik, 1978). U stanici domaćina postoje dvije polarnosti RNA-lanaca, pozitivna i negativna, odnosno oligomerni plus i minus lanac. Plus-lanac označava onu polarnost koju viroid ima prilikom ulaska i izlaska iz stanice, dok je minus lanac njegov komplement i služi kao kalup za sintezu lanca pozitivne polarnosti. Zbog prstenaste strukture viroidnih molekula (Slika 1.) ovakav se mehanizam replikacije naziva replikacija kotrljajućeg prstena. Mehanizam je podijeljen u tri glavna koraka:

transkripcija, cijepanje i ligacija (Wang, 2021). Budući da se viroidi porodice *Pospiviroidae* repliciraju asimetričnim putem, nakon transkripcije oligomernog plus-lanca odnosno sinteze oligomernog minus-lanca ne dolazi do cijepanja u monomere već se lanac negativne polarnosti odmah transkribira u lanac pozitivne polarnosti (Daròs i sur., 2006). Zatim dolazi do cijepanja oligomernog plus-lanca te ligacije kako bi nastala jednolančana prstenasta RNA pozitivne polarnosti (Slika 3.). S druge strane, viroidi porodice *Avsunviroidae* repliciraju svoj genom simetričnim putem jer se nakon transkripcije lanca pozitivne polarnosti oligomerni minus-lanac cijepa na monomere autokatalitički i cirkularizira. Zatim se ponavlja mehanizam kotrljajućeg prstena kako bi se sintetizirala prstenasta RNA plus-polarnosti. Drugim riječima, lanci obje polarnosti sintetiziraju se na isti način (Tsagris i sur., 2008). Zato što nemaju kodirajuće sekvence, viroidi koriste DNA-ovisnu RNA-polimerazu domaćina koju „prisile“ na transkripciju RNA s RNA-kalupa u svrhu replikacije vlastitog genoma (Dissanayaka Mudiyansele i sur., 2022). Viroidi porodice *Pospiviroidae* za replikaciju koriste staničnu RNA-polimerazu II jer se repliciraju u jezgri, dok se viroidi porodice *Avsunviroidae* repliciraju u kloroplastima gdje koriste RNA-polimerazu kloroplasta koja se kodira u jezgri (eng. *nuclear encoded polymerase*, NEP). Osim RNA-polimeraza, viroidi koriste mnoge druge enzime domaćina kao što su RNaza III koja služi za cijepanje oligomernih plus-lanaca pospiviroida i DNA-ligaza I koja stvara kovalentnu vezu između jednolančanih krajeva te zatvara viroidni prsten (Flores i sur., 2009; Nohales i sur., 2012). Viroidima porodice *Avsunviroidae* nije potrebna RNaza jer imaju sposobnost autokatalize koja proizlazi iz prisustva čekićastog ribozima unutar strukture viroida.



Slika 3. Replikacija viroida mehanizmom kotrljajućeg prstena simetričnim i asimetričnim putem. Prstenasta RNA viroida transkribira se pomoću RNA-polimeraze pri čemu nastaje minus-oligomerni lanac (plav) koji služi za sintezu

viroidne RNA pozitivne polarnosti. Transkripcijom minus-lanca nastaje oligomerna plus-RNA (crvena), a njenim cijepanjem i cirkularizacijom nastaje infektivni oblik viroida koji ima sposobnost izaći iz stanice domaćina (preuzeto iz Flores i sur., 2009).

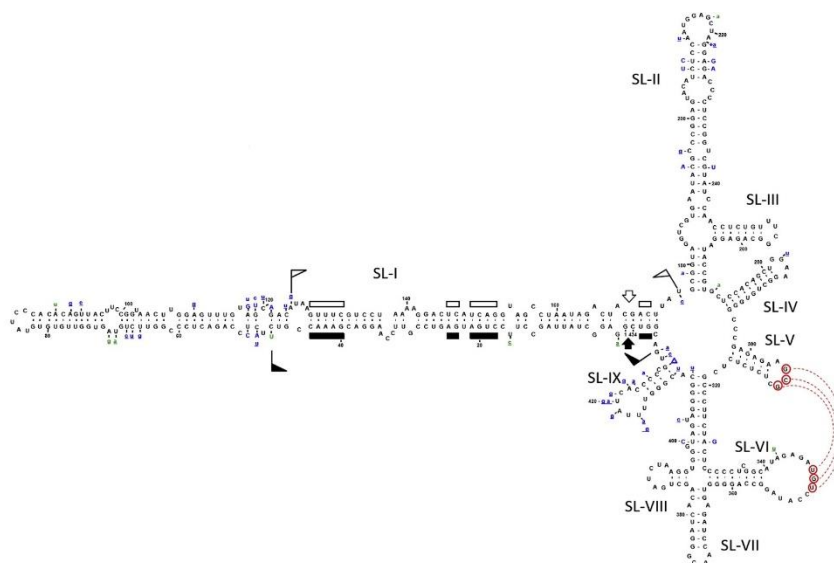
1.5. VIROIDI JABUKA

Jabuka (*Malus domestica* Borkh.) je dvosupnica koja se kultivira zbog sočnih plodova koji se koriste u prehrani. Prema Elzebroeku i Windu (2008) u svijetu postoji više od 7500 sorti jabuka koje se uzgajaju radi različitih upotreba njihovih plodova. U pravilu, kultivari jabuka se vegetativno razmnožavaju na način da se plemke, odnosno određene sorte, cijepe na odgovarajuće podloge. Podloge se koriste u svrhu kontrole brzine rasta i konačne veličine habitusa jabuke, prilagođenosti na uvjete, otpornosti na bolesti i sl. Zbog vegetativnog načina propagacije posebno se mora obratiti pozornost na potencijalne patogene koji mogu inficirati jabuke i time uzrokovati gospodarske gubitke. Među njima je mnogo virusa, a najmanji autonomni patogeni koji inficiraju jabuke su viroidi. Za sada se radi o pet viroidnih vrsta: apple dimple fruit viroid (ADFVd), apple scar skin viroid (ASSVd), apple fruit crinkle viroid (AFCVd), apple chlorotic fruit spot viroid (ACFSVd) i apple hammerhead viroid (AHVd). Prva četiri navedena viroida pripadaju porodici *Pospiviroidae*, a samo se AHVd nalazi u porodici *Avsunviroidae*. Česti simptomi viroidnih infekcija jabuka su rupice na plodovima te naboranost i pjegavost listova i plodova (Hadidi i sur., 2017; Leichtfried i sur., 2019). Jabuke zaražene navedenim viroidima mogu biti asimptomatične zbog čega se viroidi mogu nezamijećeno rasprostranjivati vegetativnim razmnožavanjem i uvozom različitih kultivara jabuka. Rasprostranjivanju viroida pridonosi i zaraženost podloga, a ne samo plemki jabuka. Dodatno, viroidi jabuka se rasprostranjuju korištenjem kontaminirane opreme tijekom cijepjenja i orezivanja. ASSVd se aktivno prenosi putem kukca vektora, štitastog moljca *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, 1856 (Walia i sur., 2015).

1.6. APPLE HAMMERHEAD VIROID (AHVd)

Apple hammerhead viroid (AHVd) pripada porodici *Avsunviroidae* i rodu *Pelamoviroid*. Zhang i suradnici (2014) isprva su opisali AHVd kao RNA-molekulu nalik viroidu zbog prisutstva čekićastog ribozima unutar native strukture viroida i nedostatka dokaza o autonomnoj replikaciji. Nekoliko godina kasnije, Serra i suradnici (2018) dokazali su da se AHVd doista autonomno replicira u zaraženim stanicama te su ga smjestili u rod *Pelamoviroid* zbog interakcije *kissing-loop*

koja stabilizira njegovu razgranatu konformaciju (Slika 4.). AHVd inficira jabuke te može uzokovati mozaičnost listova, pjegavost listova i plodova te odumiranje stabla (Hamdi i sur., 2021). Osim u jabuci, AHVd je pronađen i u nešpuli (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.) koja nije pokazivala simptome (Canales i sur., 2021).



Slika 4. Sekundarna struktura apple hammerhead viroida (AHVd). Zastavice označavaju ribozimske autokatalitičke domene, dok su mjesta cijepanja za molekule različite polarnosti označena bijelim i crnim strelicama. Konzervirane regije čekićastog ribozima označene su pravokutnicima različite boje (ovisno o polarnosti RNA-molekule), a interakcija *kissing-loop* označena je crvenim isprekidanim linijama (preuzeto iz Chiumenti i sur., 2019).

1.7. CILJ ISTRAŽIVANJA

Jabuka je najviše uzgajana voćka u Hrvatskoj s ukupno 47 892 tone ukupne proizvodnje u 2022. godini prema podacima Državnog zavoda za statistiku (Državni zavod za statistiku, <https://podaci.dzs.hr/2022/hr/29338>, pristupljeno 8.7.2023.). Zbog gospodarskih gubitaka koje viroidne infekcije jabuka mogu prouzročiti, važno je istraživati uzročnike bolesti jabuka.

Od njegovog otkrića, AHVd detektiran je u kultivarima jabuka na svim kontinentima osim Australije (CABI i EPPO, 2022). Na području Europe, AHVd je do sada zabilježen samo u Belgiji, Italiji, Češkoj, Mađarskoj i Španjolskoj (Fontdevila Pareta i sur., 2022; Chiumenti i sur., 2019;

Várallyay i sur., 2022; Zikeli i sur. 2021; Serra i sur., 2018). Cilj rada bio je potvrditi prisutnost AHVd-a u prethodno istraživanim izolatima kultivara jabuke na području Hrvatske.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJALI

2.1.1. Biljni materijal

U radu su korišteni neki izolati ukupnih nukleinskih kiselina (TNA) jabuka prethodno istraživani zbog detekcije fitoplazmi (Križanac i sur., 2017). Za potrebe ovog rada skupljena su tri dodatna uzorka. Dva uzorka jabuka 'Granny Smith' su kupljena na tržnici u listopadu 2019. godine, a porijeklo im je nepoznato (G1 i G2). Treći dodatni uzorak (MP1_2) je uzet s dva stara stabla jabuka nepoznatih kultivara iz vrta obitelji Nine Čančar u Korenici (Tablica 1.).

Tablica 1. Popis uzoraka domaćih jabuka analiziranih u radu.

oznaka uzorka	sorta jabuke	lokacija	županija
310	'Idared'	Sv. Marija	Međimurska
354	'Slavonska Srčika'	Osijek	Osječko-baranjska
357	'Prima'	Osijek	Osječko-baranjska
364	'Mutsu'	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka
368	'Ljepocvjetka'	Staro Petrovo selo	Brodsko-posavska
389	'Stark Earliest'	Sv. Marija	Međimurska
390	'Stayman'	Sv. Marija	Međimurska
392	'Mutsu'	Sv. Marija	Međimurska
393	'Jonadel'	Sv. Marija	Međimurska
481	'Gala'	Sv. Marija	Međimurska
483	'Francuska Kožarka'	Sv. Marija	Međimurska
489	'Plemka'	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka
554	'Enterprise'	Žubrica	Virovitičko-podravska
MP1_2	nepoznata	Korenica	Ličko-senjska
G1	'Granny Smith'	nepoznata	nepoznata
G2	'Granny Smith'	nepoznata	nepoznata

2.1.2. Komplet za izolaciju ukupnih RNA iz biljnog tkiva Qiagen RNeasy Plant Mini Kit

- kemikalije u kompletu:
 - RLT-denaturacijski pufer kojem je dodano 10 μ L β -merkaptetanola na 1 mL pufera
 - RW1-pufer za ispiranje RPE-pufer za ispiranje kojem je dodano 4 volumna udjela 96% etanola
- dodatne kemikalije:
 - 96% etanol
 - β -merkaptetanol
 - sterilna voda bez RNaza (Thermo Fisher Scientific)

2.1.3. Kompleti i kemikalije korištene u RT-PCR

- kemikalije u kompletu Superscript III-Platinum Taq
 - SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix (Thermo Fisher Scientific)
 - 2x reakcijski pufer (sadrži: 0.4 mM svakog dNTP-a i 3.2 mM $MgSO_4$)
 - 5 mM $MgSO_4$
- kemikalije u kompletu GoScript™ (Promega)
 - 5x GoScript™ reakcijski pufer
 - 5x GoTaq™ Flexi reakcijski pufer (pH 8.5)
 - 25 mM $MgCl_2$
 - 10 mM dNTP mix
 - GoScript™ reverzna transkriptaza
 - GoTaq™ G2 Flexi DNA polimeraza
- dodatne kemikalije
 - sterilna voda bez RNaza (Thermo Fisher Scientific)
 - RNaseOUT inhibitor RNaza, 40 U/ μ L (Thermo Fisher Scientific)

2.1.4. Otopine i puferi korišteni u elektroforezi na agaroznom gelu

- 10x koncentrirani TBE-pufer (Lonza) (sadrži: 0.89 M Tris-borat, 0.02 M EDTA, pH 8.3) razrijeđen na 1x za potrebe elektroforeze
- Agarozna *low EEO* (Sigma)
 - 1.8% agarozni gel od 30 ml priređen je otapanjem 0.54 g agaroze u 30 ml 1x TBE-pufera te je u njega dodano 0.7 µL StainIN™ GREEN boje (highQu)
 - 1.8% agarozni gel od 50 mL priređen je otapanjem 0.9 g agaroze u 50 ml 1x TBE-pufera te je u njega dodano 1.2 µL StainIN™ GREEN boje (highQu)
- 6x *Gel Loading Dye* (New England BioLabs) (sadrži: 2.5% Ficoll®-400, 3.3 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.02% Dye 1, 0.001% Dye 2, 0.08% SDS; pH 8)

2.1.5. Molekularni DNA standardi

- 50 bp *DNA Ladder* (New England Biolabs)
 - raspon: 50 bp do 1 350 bp
 - za potrebe elektroforeze, standard je razrijeđen 5 puta

2.1.6. Računalni programi za analizu sekvenci

- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) za pretraživanje sekvenci pohranjenih u bazi podataka koje su slične sekvenci od interesa (Altschul i sur., 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Geneious Prime 2023.2 (Geneious Biologics) za analizu i sravnjivanje sekvenci (<https://www.geneious.com/>)
- *Muscle* algoritam za sravnjivanje sekvenci (Edgar, 2004)
- UNAFold program za smatanje RNA-molekula (Zuker, 2003) (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form-v2.php>)

2.1.7. Računalni programi za filogeniju

- *Muscle* algoritam za sravnjivanje sekvenci (Edgar, 2004)
- Geneious Prime 2023.2 (Geneious Biologics) za analizu i sravnjivanje sekvenci (<https://www.geneious.com/>)

2.2. METODE

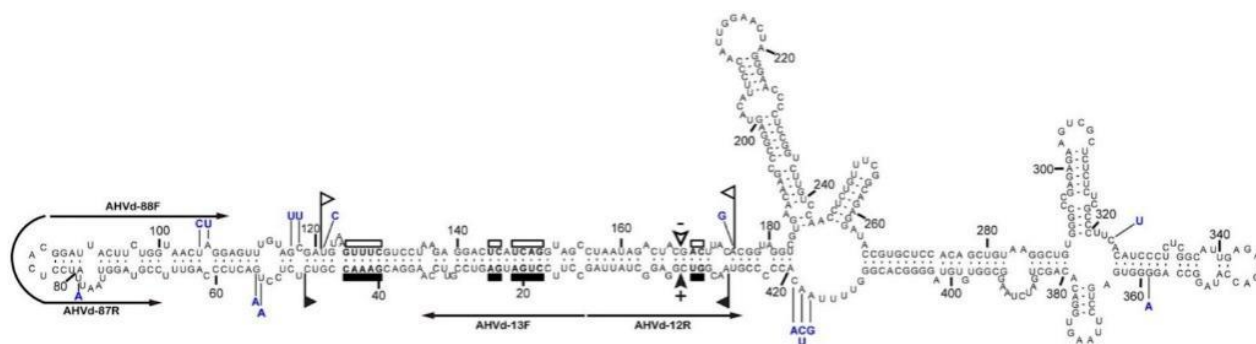
2.2.1. Ekstrakcija ukupnih nukleinskih kiselina iz jabuka

Budući da se radi o retrospektivnoj studiji, u radu su korišteni izolati iz rada Križanac i sur. (2017) u kojem je opisan i proces ekstrakcije TNA CTAB-metodom iz lisnih žila jabuka. Dodatno se radila izolacija RNA uzoraka iz kore plodova MP1_2, G1 i G2 za čiju je ekstrakciju korišten RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Ovaj komplet za izolaciju ukupnih RNA iz biljnog tkiva temelji se na vezanju RNA-molekula na silikatnu membranu u puferu visoke ionske jakosti. Pufer ionske jakosti koristi se u svrhu neutraliziranja DNA vodikovim ionima zbog čega DNA postaje nenabijena te se ne može vezati na silikatnu membranu. S druge strane, RNA ostaje nabijena odnosno polarna zbog jednolančane strukture te se može vezati vodikovim vezama na silikatnu membranu (Karp i sur., 1998). Biljno tkivo približne mase 100 mg se prvo homogenizira u tekućem dušiku pomoću plastičnog tučka obloženog teflonom u epruveti za mikrocentrifugiranje od 2 mL. Zatim se dodaje 450 μ L denaturirajućeg pufera (RLT-pufer) koji sadrži gvanidin-tiocijanat za inaktivaciju RNaza što štiti RNA-molekule od katalize nakon čega se smjesa snažno vorteksira. Uzorke se inkubira na 56°C 3 min. Lizate se zatim prebaci u kolone *QIAshredder* s membranom za homogenizaciju lizata koje se nalaze unutar epruvete za mikrocentrifugiranje (2 mL) u kojoj se skuplja filtrat prilikom centrifugiranja uzoraka 2 min pri 11 000 okretaja u minuti (rpm, eng. *revolutions per minute*). Supernatant se prebaci u nove epruvete za mikrocentrifugiranje (2 mL) bez da se uzmuti eventualno nastali talog. Volumen supernatanta izmjeri se mikropipetom kako bi se moglo dodati 0.5 volumnog udjela 96%-tnog etanola te se smjesa miješa pipetiranjem. Svrha dodatka etanola je postizanje specifičnih uvjeta za vezanje ukupne RNA za membranu dok se ostale stanične komponente eluiraju. Lizati se s eventualno nastalim talogom nanesu na mini-kolone RNeasy s membranom od silika-gela smještene u epruvetama za mikrocentrifugiranje (2 mL). Potom se uzorci centrifugiraju 15 s na 11 000 rpm. Filtrat se odbaci, a kolone se vrati u epruvete za mikrocentrifugiranje (2 mL). U idućem koraku se dodaje 700 μ L pufera za ispiranje (RW1-pufer) ugljikohidrata, proteina, masnih kiselina i drugih molekula koje su nespecifično vezane na silikatnu membranu. Zatim se uzorci centrifugiraju 15 s pri 11 000 rpm. Filtrat se odbaci te se kolone stavi u nove sabirne epruvete (2 mL). Dodaje se 500 μ L pufera za ispiranje (RPE-pufer) soli te se smjesu centrifugira 15 s pri 11 000 rpm. Ponovo se odbaci filtrat te se kolone stave u sabirnu epruvetu

korištenu u prošlom koraku. Pipetira se drugih 500 μ L RPE-pufera te slijedi centrifugiranje 2 min pri 11 000 rpm. Prethodni se korak ponavlja, pri čemu centrifugiranje traje 1 min. Kolone se stave u nove epruvete za mikrocentrifugiranje (1.5 mL) te se pipetira 45 μ L vode bez RNaza direktno na silika-gel membranu. Potom slijedi centrifugiranje 1 min pri 11 000 rpm u svrhu ispiranja RNA s kolona. Korak elucije RNA je ponovljen, no umjesto vode bez RNaza koristio se eluat iz prethodnog koraka kako bi se povećao prinos RNA.

2.2.2. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze (RT-PCR)

U svrhu umnažanja viroidnog genoma korištena je metoda lančane reakcije polimeraze uz prethodnu reverznu transkripciju (eng. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR). Viroidni genom umnožen je iz izolata TNA dobivenih CTAB-metodom (Križanac i sur., 2017) te pomoću komercijalnog kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Za reverznu transkripciju, odnosno za sintezu DNA komplementarne viroidnom genomu te za PCR korištena su dva para početnica: i) AHVd-13F_PG (5'-CCTTCCTGATGAGTCCGTTCCA-3', T_m 62.9°C) i AHVd-12R_PG (5'-CTAATAGCCTCCGACCGTCAT-3', T_m 60.4°C); ii) AHVd-88F_PG (5'-TAGTTACTTCCGGTAACTTGGA-3', T_m 57.4°C) i AHVd-87R_PG (5'-GTTGGTATAACTAACCCAACCA-3', T_m 56.8°C) (Messmer i sur., 2017). Parovi početnica osmišljeni su da amplificiraju produkt dugačak 433 nukleotida te da se iz tih produkata može rekonstruirati viroidni genom dug 434 nukleotida (Slika 5., Zhang i sur., 2014). Prvi navedeni par početnica pokazao se efikasnijim te je iz tog razloga izabran za daljnu analizu sekvenci.



Slika 5. Parovi početnice specifični za čekičasti viroid jabuke AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG te AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG (preuzeto iz Zhang i sur., 2014).

Na uzorcima G1 i G2 rađen je RT-PCR u jednom koraku (eng. *one-step*). Sastojke reakcijske otopine za RT-PCR se kratko vorteksira te ih se drži na ledu prije upotrebe (Tablica 2.).

Tablica 2. Sastav reakcijske otopine za RT-PCR u jednom koraku proveden za uzorke G1 i G2.

sastojak	volumen
sterilna voda za PCR	9.2 μ L
2x reakcijski pufer	12.5 μ L
AHVd-13F_PG ili AHVd-88F_PG (10 pM)	0.4 μ L
AHVd-12R_PG ili AHVd-87R_PG (10 pM)	0.4 μ L
RNaseOUT (40 U/ μ L)	0.5 μ L
SuperScript III-Platinum Taq	1.0 μ L
ukupni volumen	24 μL

U epruvete za PCR (0.2 mL) dodano je 24 μ L reakcijske otopine i 1 μ L RNA-kalupa odnosno izolata ukupne RNA iz jabuke. Kao negativna kontrola koristila se sterilna voda za PCR bez kalupa kako bi se kontrolirala kontaminacija. Pozitivna kontrola se nije koristila jer do sada nije bilo uzoraka pozitivnih za AHVd. Sve inkubacije na povišenoj temperaturi (Tablica 3. i Tablica 6.) odrađene su u uređaju za PCR, GeneAMP 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Nakon inkubacije uzorke se ohladi na 14°C.

Tablica 3. Parametri ciklusa za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimeraze za uzorke G1 i G2.

ciklusi	temperatura	vrijeme	opis koraka
1	55 °C	60 min	reverzna transkripcija
1	94 °C	2 min	početna denaturacija kalupa
30	94 °C	15 s	denaturacija
	56 °C	30 s	vezanje početnica za kalup
	72 °C	30 s	produljenje lanaca DNA
1	72 °C	5 min	završno produljenje lanaca

Na uzorcima 310-554 te na uzorku MP1_2 rađen je RT-PCR u dva koraka (eng. *two step assay*) s parom početnica AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG (Messmer i sur., 2017). Prije lančane reakcije polimeraze potrebno je u ovom slučaju u odvojenoj epruveti sintetizirati komplementarnu DNA

(cDNA) postupkom reverzne transkripcije. Komponente reakcijske smjese za reverznu transkripciju se kratko vorteksira nakon odležavanja te ih se drži na ledu prije upotrebe (Tablica 4.) Za sintezu DNA komplementa potrebno je prethodno pripremiti kalup, a to uključuje inkubaciju 1 μL RNA kalupa s 2 μL reverzne početnice (AHVd-12R_PG) i 2 μL sterilne vode za PCR prvo na 70°C (5 minuta) zatim na ledu jednako dugo. Na taj način se kalup denaturira te se na njega veže reverzna početnica prije početka reverzne transkripcije što omogućuje veću efikasnost sinteze cDNA. Nakon inkubacije smjesu je potrebno kratko vorteksirati kako bi se kapljice smjese koje su se kondenzirale na stijenkama epruvete spustile.

Tablica 4. Sastav reakcijske otopine za sintezu komplementarne DNA za uzorke 310-554 te uzorak MP1_2.

sastojak	volumen
sterilna voda za PCR	6.9 μL
5x reakcijski pufer	4.0 μL
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 μL
dNTP mix (10mM)	1.0 μL
RNaseOUT (40 U/ μL)	0.5 μL
GoScript reverzna transkriptaza	1.0 μL
ukupni volumen	15 μL

U epruvete s 5 μL kalupa dodaje se 15 μL reakcijske smjese (Tablica 4.) te su inkubirane 5 minuta na 25°C, zatim 45 minuta na 47°C te 15 minuta na 70°C. Nakon inkubacije smjese koje sadrže cDNA stavljene su na led.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese za PCR za uzorke 310-554 te uzorak MP1_2.

sastojak	volumen
sterilna voda za PCR	6.0 μL
5x reakcijski pufer	5.0 μL
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 μL
dNTP mix (10mM)	1.25 μL
AHVd-13F_PG (10pM)	2.5 μL
AHVd-12R_PG (10pM)	2.5 μL
RNaseOUT (40 U/ μL)	0.5 μL
GoTaq G2 Flexi DNA polimeraza	0.25 μL
ukupni volumen	20 μL

U 20 μ L reakcijske smjese za PCR (Tablica 5.) dodaje se 5 μ L DNA komplementa dobivenog reverznom transkripcijom. Uzorke se inkubira kroz 37 ciklusa te ih se ohladi na 14°C (Tablica 6.).

Tablica 6. Parametri ciklusa za lančanu reakciju polimeraze za uzorke 310-554 te uzorak MP1_2.

ciklusi	temperatura	vrijeme	opis koraka
1	94 °C	2 min	početna denaturacija kalupa
	94 °C	15 s	denaturacija
30	56 °C	30 s	vezanje početnica za kalup
	72 °C	30 s	produljenje lanaca DNA
1	72 °C	5 min	završno produljenje lanaca

Optimizacija PCR-ciklusa

Bilo je potrebno optimizirati PCR cikluse kako bi se postigla veća efikasnost odnosno veći prinos cDNA-molekula. Optimizacija je uključivala promjenu temperature produljenja lanaca djelovanjem DNA polimeraze i temperature završnog produljenja sa 68°C na 72°C. Nadalje, bilo je potrebno povećati broj ciklusa izmjene temperatura s 30 na 35 ciklusa kako bi se dobio veći prinos DNA-molekula. Dodatno, temperatura prianjanja para početnica AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG snižena je s 56°C na 52°C kako bi bila znatno niža od temperature na kojoj je 50% molekula početnica denaturirano (T_m) što bi spriječilo odvajanje početnica od kalupa te povećalo efikasnost PCR-a.

2.2.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Produkti RT-PCR metode vizualizirani su elektroforezom u agaroznom gelu radi analize uspješnosti sinteze i umnažanja cDNA viroidnih genoma. Rađeni su agarozni gelovi različitih veličina, ali istih udjela agaroze (1.8%). Mali 1.8% agarozni gel od 30 ml priređen je otapanjem 0.54 g agaroze u 30 ml 1x TBE-pufere te je u njega dodano 0.7 μ L fluorescencijske boje StainIN GREEN, dok je veliki 1.8% agarozni gel od 50 mL priređen je otapanjem 0.9 g agaroze u 50 ml 1x TBE-pufere te je u njega dodano 1.2 μ L StainIN GREEN boje. StainIN GREEN boja dodana je nakon kuhanja agaroze u svrhu detekcije nukleinskih kiselina pod UV-svjetlom. U prvu jažicu gela

uneseno je 5 μL standarda za određivanje molekularne mase DNA (eng. *DNA ladder*) i 1 μl boje za unošenje uzoraka u gel. Boja za nanošenje uzoraka služi za vizualizaciju uzoraka tijekom unošenja u gel i fronte uzoraka tijekom elektroforeze kako uzorci ne bi prošli kroz gel. U sastavu boje ima glicerola koji ima veću gustoću od TBE-pufera te osigurava da uzorak s kojim je boja pomiješana padne na dno jažice. U ostale jažice uneseno je 5 μL uzorka i 1 μL boje za unošenje uzoraka u gel. Elektroforeza se odvijala na 100 V u trajanju od sat vremena (10 V/cm). Nakon završetka elektroforeze gelovi su stavljeni u detekcijski uređaj (Amersham ImageQuant™ 800, Cytiva) u kojem su vizualizirani pomoću UV-svjetla te fotografirani. Boja StainIN GREEN veže se na DNA i fluorescira zeleno ukoliko je obasjana UV-svjetlom.

2.2.4. Sekvenciranje

Kako bi se potvrdila prisutnost AHVd u uzorcima, odrađeno je Sanger sekvenciranje (Sanger i sur., 1977). Uzorci su alikvotirani i pripremljeni za sekvenciranje prema uputama tvrtke Macrogen (Macrogen Europe) u koju su uzorci poslani na sekvenciranje. Osim uzoraka koncentracije 50 ng/ μL , pripremljene su i početnice koncentracije 5 pM.

2.2.5. Analiza sekvenci i filogenija

Analiza sekvenci te izrada filogenetskog stabla odrađena je u programu Geneious Prime 2023.2 (Geneious Biologics). Sekvence dobivene Sanger sekvenciranjem uređene su i sravnjene pomoću algoritma *Muscle* (Edgar, 2004) kako bi se dobile konsenzus-sekvence. Dobivene konsenzus sekvence poslane su u bazu podataka GenBank. U GenBank pronađene su srodne sekvence korištenjem programa BLASTn (Altschul i sur., 1990). Srodne sekvence, zajedno sa sekvencama obrađenim u radu, sravnjene su pomoću algoritma *Muscle* kako bi se moglo formirati filogenetsko stablo. Za izradu filogenetskog stabla primijenjena je statistička metoda Neighbor Joining (Saitou i Nei, 1987) i supstitucijski model Tamura-Nei (Tamura i Nei, 1993) uz bootstrap vrijednost 1000. Grane na stablu s ispod 70% podržanosti su urušene. Dodatno, odrađena je i provjera smatanja RNA u programu RNA Folding Form V2.3 u sklopu programskog paketa UNAFold (Zuker, 2003). Parametar smatanja kružne RNA molekule bila je temperatura od 25°C.

3. REZULTATI

3.1. DETEKCIJA I IDENTIFIKACIJA AHVd

Tijekom istraživanja testirano je 18 uzoraka jabuka različitih sorti i porijekla. Čekićasti viroid jabuke pronađen je u raznim sortama jabuka na različitim lokacijama. Od 18 testiranih uzoraka, u njih 7 je identificirana prisutnost AHVd. Najviše pozitivnih uzoraka detektirano je u Međimurskoj županiji u kojoj je bio prikupljen i najveći broj uzoraka (Tablica 7.).

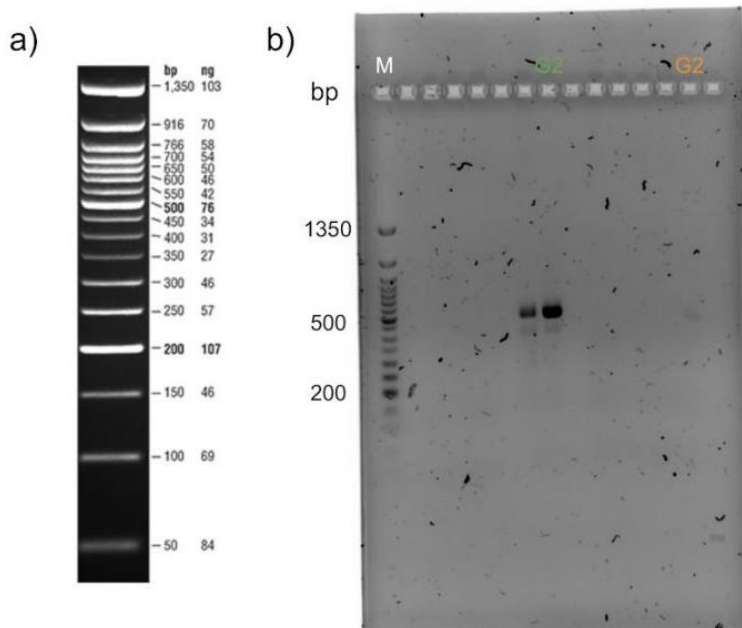
Tablica 7. Popis uzoraka analiziranih u radu s označenim rezultatom.

oznaka uzorka	nalaz AHVd	sorta jabuke	lokacija	županija
310	-	'Idared'	Sv. Marija	Međimurska
354	-	'Slavonska Srčika'	Osijek	Osječko-baranjska
357	-	'Prima'	Osijek	Osječko-baranjska
364	-	'Mutsu'	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka
368	-	'Ljepocvjetka'	Staro Petrovo selo	Brodsko-posavska
389	+	'Stark Earliest'	Sv. Marija	Međimurska
390	-	'Stayman'	Sv. Marija	Međimurska
392	+	'Mutsu'	Sv. Marija	Međimurska
393	-	'Jonadel'	Sv. Marija	Međimurska
481	-	'Gala'	Sv. Marija	Međimurska
483	+	'Francuska Kožarka'	Sv. Marija	Međimurska
489	+	'Plemka'	Velika Ludina	Sisačko-moslavačka
554	+	'Enterprise'	Žubrica	Virovitičko-podravska
MP1_2	+	nepoznata	Korenica	Ličko-senjska
G1	-	'Granny Smith'	nepoznata	nepoznata
G2	+	'Granny Smith'	nepoznata	nepoznata

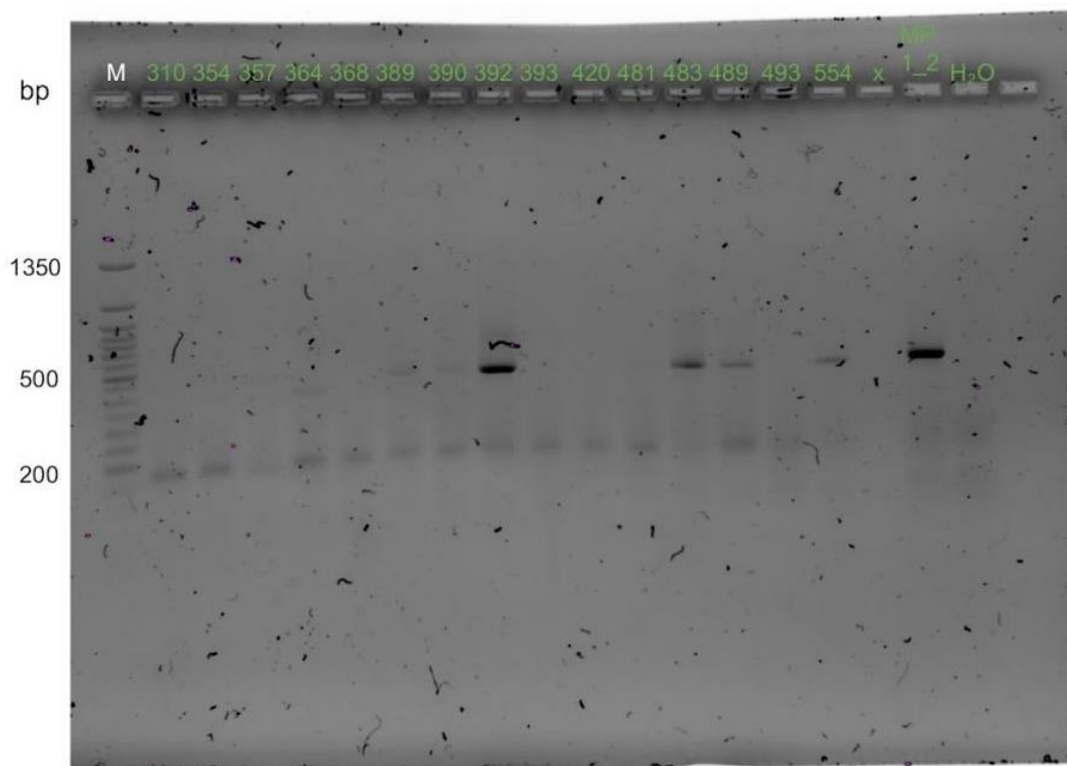
Legenda: + označava prisutnost AHVd amplikona u analizi RT-PCR, a – njegov izostanak.

Nakon reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) korištenjem dva para početnica (AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG; AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG) te analize

dobivenih umnoženih cDNA elektroforezom u agaroznom gelu, pozitivni uzorci sadržavali su produkt veličine otprilike 500 bp (Slika 6. i Slika 7.).



Slika 6. Amplikoni vizualizirani metodom elektroforeze u agaroznom gelu nakon RT-PCR provedenog s dva para početnica specifičnih za AHVd (AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG; AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG). Slika a) predstavlja molekularni DNA standard 50 bp *DNA Ladder* (New England Biolabs) s označenim molekulskim masama. Slika b) predstavlja agarozni gel dobiven nakon elektroforeze u agaroznom gelu s označenim markerom koji se nalazi u prvoj jažici te s označenim uzorcima. Amplikon G2 dobiven korištenjem para početnica AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG označen je zelenom bojom dok je amplikon G2 dobiven upotrebom drugog para početnica (AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG) označen narančastom bojom. Osim uzorka G2 elektroforezom u agaroznom gelu analizirani su i drugi uzorci koji nisu bili analizirani u sklopu ovog rada te zato nisu označeni.



Slika 7. Amplikoni vizualizirani metodom elektroforeze u agaroznom gelu nakon RT-PCR provedenog s parom početnica specifičnih za AHVd (AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG). U prvoj jažici nalazi se marker kojem su označene molekulske mase, a u ostalim se jažicama nalaze uzorci (Tablica 7.) označeni zelenom bojom. Jažica označena slovom x je prazna odnosno u nju nije bio nanesen uzorak.

3.2. VIROIDNE SEKVENCE

Osam uzoraka koji su na gelu imali produkt od gotovo 500 bp i jedan uzorak (uzorak 364) čiji je produkt bio veličine oko 400 bp su sekvencirani, no samo je 7 uzoraka identificirano kao AHVd. Prvi amplikon identificiran kao AHVd bio je iz uzorka G2 s podudarnošću nukleotidnog slijeda od 98.51% sa sekvencom AHVd (MH049335.1) iz GenBank baze podataka. Iz njegovih uzvodnih i nizvodnih sekvenci dobivena je konzensus-sekvencija od 268 nukleotida. Amplikon iz uzorka 364 identificiran je kao dio 18 rDNA vrste *Malus domestica* s podudarnošću od 81.25%. Amplikon iz uzorka 389 identificiran je kao AHVd (podudarnost je 91.67% sa sekvencom MW316931.1), no njegove uzvodne i nizvodne sekvence su imale previše razlika te je zbog toga moglo biti složeno manje od 200 nukleotida konzensus-sekvence. Tako kratka sekvencija nije bila pogodna za slanje sekvence u bazu podataka GenBank jer je minimalna dužina sekvenci koje razmatraju, ukoliko se

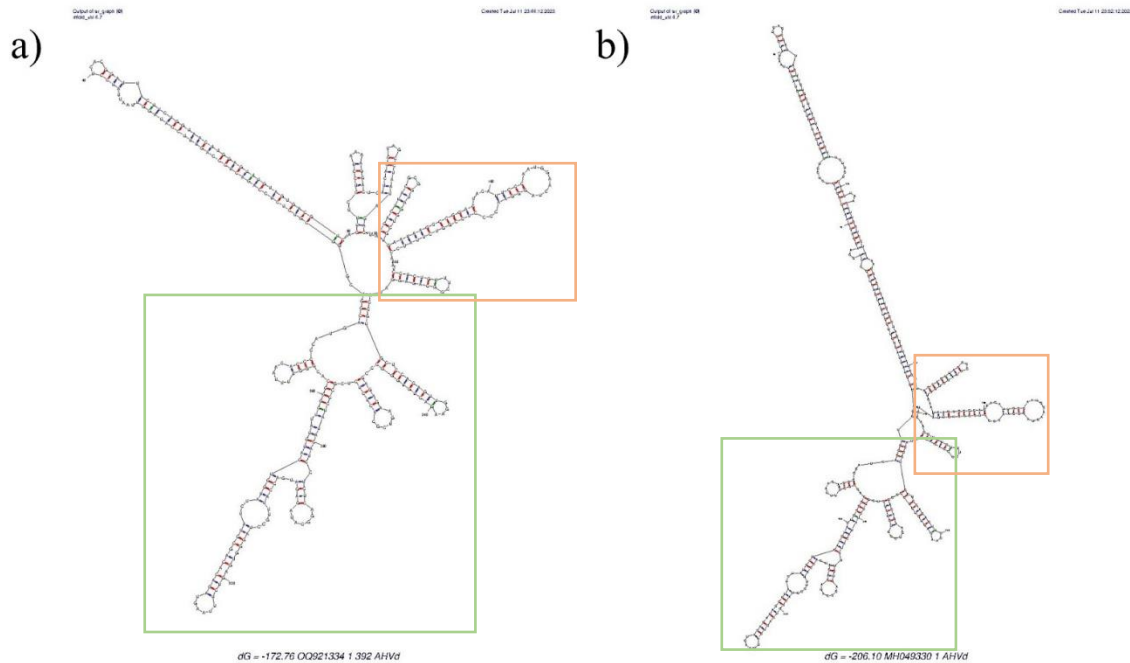
ne radi o mikroRNA, 200 nukleotida. Iako se uzorak 390 pokazao pozitivnim nakon analize elektroforezom u agaroznom gelu, sekvenciranjem i pretraživanjem sličnih sekvenci pomoću BLASTn nije pronađena sekvenca pohranjena u bazi podataka GenBank koja je slična sekvenci tog uzorka. Amplikon iz uzorka 392 identificiran je kao AHVd sa sličnosti od 96.95% sa sekvencom MH049330.1. Iz uzvodnih i nizvodnih sekvenci uzorka 392 dobivena je konsenzus-sekvenca od 392 nukleotida što predstavlja parcijalnu sekvencu AHVd, budući da je njegov genom obično dug 433 nukleotida. Amplikon iz uzorka 483 identificiran je kao AHVd s podudarnošću od 93.28% sa sekvencom MK188693.1, a amplikon iz uzorka 489 s podudarnošću od 95.08% sa sekvencom MT127884.1. Sekvence uzorka 483 rezultirale su konsenzus-sekvencom od 353 nukleotida, dok je konsenzus-sekvenca uzorka 489 duljine od 304 nukleotida. Uzorak 554 identificiran je kao AHVd s podudarnošću od 89.44% sa sekvencom MF402931.1. Iz sekvenci uzorka 554 dobivena je konsenzus-sekvenca od 327 nukleotida. Najkraća konsenzus-sekvenca od 232 nukleotida, dobivena je sravnjivanjem i uređivanjem uzvodnih i nizvodnih sekvenci uzorka MP1_2 (podudarnost sekvenci s AHVd je 92.17% sa sekvencom MK188698.1).

3.3 OPTIMIZACIJA PCR-CIKLUSA

Optimizacija PCR-ciklusa za AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG par početnica koja je odrađena u svrhu postizanja veće efikasnosti i doprinosa reakcije nije uspjela. Iako je temperatura prijanjanja početnica snižena na temperaturu koja je znatno niža od T_m uzvodne i nizvodne početnice, PCR je još uvijek bio neefikasan. Naime, u koraku prijanjanja početnica na kalup temperatura je bila 52°C, dok je T_m uzvodne početnice 57.4°C, a nizvodne 56.8°C. Taj par početnica nije uspio sintetizirati i amplificirati cDNA u metodi RT-PCR. Također, optimizacija za AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG par početnica nije pokazala znatno poboljšanje efikasnosti reakcije.

3.3 USPOREDBA SEKUNDARNIH STRUKTURI

Odrađena je analiza smatanja RNA-molekula na najduljoj dobivenoj konsenzus-sekvenci od 392 nukleotida koja pripada uzorku 392. Uspoređena je sa sekvencom iz baze podataka GenBank (MH049330.1) koja je imala najveću podudarnost s već spomenutom sekvencom (Slika 8.).



Slika 8. Usporedba sekundarnih struktura uzorka 392 i sekvence s pristupnim brojem MH049330.1 dobivene iz baze podataka GenBank. Na dnu su vrijednosti Gibbsove slobodne energije suboptimalne sekundarne strukture s najnižom energijom za smatanje. a) parcijalni genom AHVd iz uzorka 392 na 25°C, b) referentne AHVd-sekvence (MH049330.1) na 25°C. Zelenim i narančastim pravokutnicima označeni su dijelovi sekvenci koji imaju iste strukturne elemente.

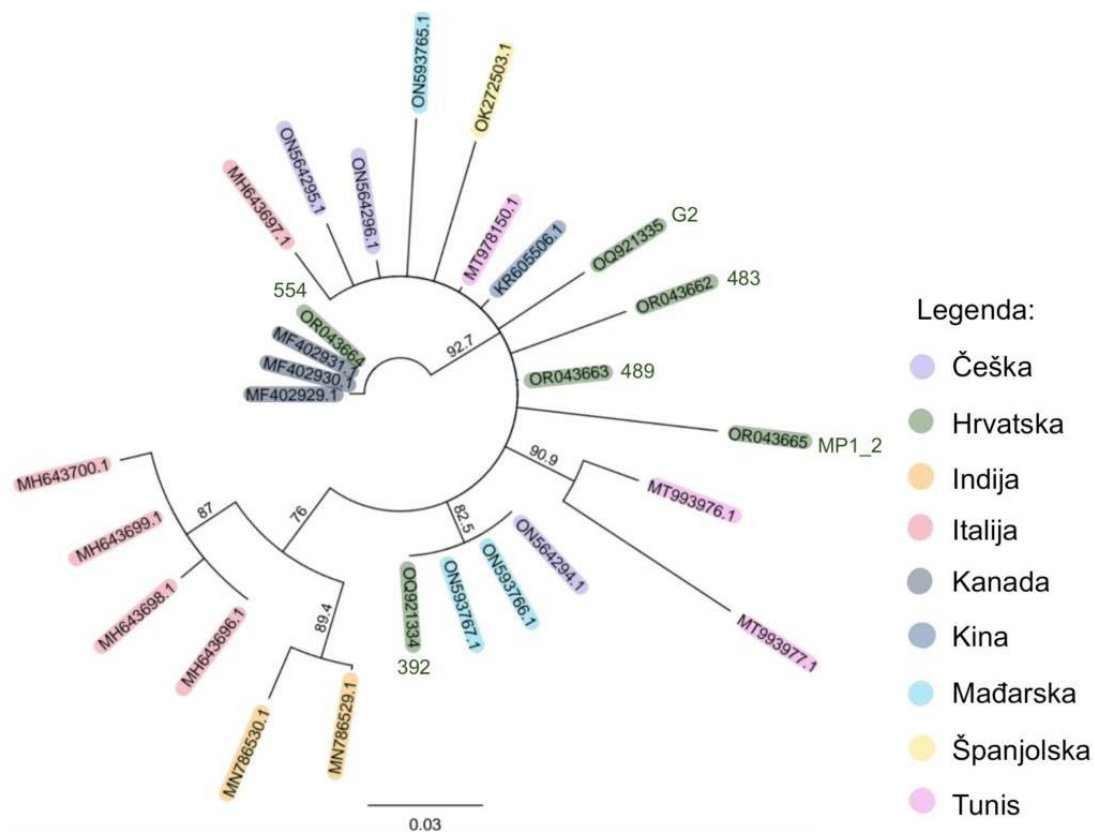
3.4. FILOGENETSKA ANALIZA

Sekvence genoma AHVd deponirane su u NCBI-bazu podataka GenBank te su njihovi pristupni brojevi navedeni u Tablici 8. U filogenetskoj analizi, osim dobivenih sekvenci, korištene su reprezentativne sekvence preuzete iz baze podataka GenBank. Filogenetska analiza dodatno je potvrdila identitet sekvenci dobivenih u istraživanju. Prema podacima iz Tablice 8. izrađeno je filogenetsko stablo prikazano na Slici 9.

Tablica 8. Popis sekvenci s pristupnim brojevima u bazi GenBank te porijeklom i vrstom/sortom korišten u formiranju filogenetskog stabla.

pristupni broj iz GenBank	izolat	opis	vrsta/sorta	država	literatura
OK398018.1		čitava sekvenca	jabuka/nepoznata	Belgija	Pareta i sur. (2022)
MH643696.1					
MH643697.1					
MH643698.1		čitava sekvenca	jabuka/nepoznata	Italija	Chiumenti i sur. (2019)
MH643699.1					
MH643700.1					
ON564294.1			jabuka/'Idared'	Češka Republika	Várallyay i sur. (2022)
ON564295.1			jabuka/'Jonagored Supra'		
ON564296.1		čitava sekvenca	jabuka/'Selena'	Mađarska	
ON593765.1			jabuka/'Gala'		
ON593766.1					
ON593767.1			jabuka/'Remo'		
MN786529.1		čitava sekvenca	jabuka/'Golden Delicious'	Indija	Nabi i Baranwal (2020)
MN786530.1			jabuka/'Oregon Spur'		
OK272503.1		čitava sekvenca	nešpula/nepoznata	Španjolska	Canales i sur. (2021)
MT993976.1					
MT993977.1		čitava sekvenca	jabuka/'Richared Delicious'	Tunis	Hamdi i sur. (2022)
MT978150.1					
MF402929.1					
MF402930.1		čitava sekvenca	jabuka/'Pacific Gala'	Kanada	Messmer i sur. (2017)
MF402931.1					
KR605506.1		čitava sekvenca	jabuka/'Fuji'	Kina	Zhang i sur. (2014)
OQ921334.1	392		jabuka/'Mutsu'	Hrvatska	ovaj rad
OQ921335.1	G2	parcijalna sekvenca	jabuka/'Granny Smith'		
OR043662.1	483		jabuka/'Francuska Kožarka'		
OR043663.1	489		jabuka/'Plemka'		

pristupni broj iz GenBank	izolat	opis	vrsta/sorta	država	literatura
OR043664.1	554		jabuka/'Enterprise'		
OR043665.1	MP1_2		jabuka/nepoznata		



Slika 9. Filogenetsko stablo s legendom dobiveno iz podataka navedenih u Tablici 8. Na slici su uz pristupne brojeve hrvatskih uzoraka označena imena izolata radi lakšeg snalaženja. Filogenetska analiza provedena je u programu Geneious Prime 2023.2 (Geneious Biologics). Za izradu filogenetskog stabla primijenjena je statistička metoda Neighbor Joining (Saitou i Nei, 1987) i supstitucijski model Tamura-Nei (Tamura i Nei, 1993) uz bootstrap vrijednost 1000. Grane na stablu s ispod 70% podržanosti su urušene.

4. RASPRAVA

Čekićasti viroid jabuke, uz ACFSVd, jedan je od najnovije otkrivenih viroida koji inficiraju jabuke (Zhang i sur., 2014; Leichtfried i sur., 2019). Do sada je u Europi AHVd pronađen u svega pet država te je u ovome radu po prvi puta detektiran i u Hrvatskoj. Dugovječnost jabuke kao kulture i njen vegetativni načina razmnožavanja (cijepljenjem) čimbenici su koji pogoduju rasprostranjivanju viroida. Stoga se može pretpostaviti da je AHVd zapravo prisutan u većini uzgojnih područja jabuke ili, ako već nije, da će se brzo rasprostraniti po ostatku Europe.

Iz prethodno prikupljenih uzoraka jabuka istraživanim radi prisutnosti fitoplazmi (Križanac i sur., 2017) izolirane su ukupne nukleinske kiseline metodom CTAB (Clarke, 2009). Tada su u tim jabukama otkrivene fitoplazme vrste '*Ca. P. mali*', uzročnik bolesti proliferacije jabuka. Zbog toga što su se preferencijalno sakupljale jabuke s tipičnim simptomima proliferacije jabuka (mali plodovi s dugim peteljka, proliferacija aksilarnih pupova i sl.), ne mogu se komentirati potencijalni simptomi infekcije AHVd-om. Drugi autori također nisu nalazili simptome koje su mogli povezati samo s ovim viroidom jer su jabuke uglavnom još bile koinficirane s virusima ili drugim viroidima (Várallyay i sur., 2022; Zhang i sur., 2014).

Prisutnost AHVd-a u našim izolatima ukupnih nukleinskih kiselina jabuka stoga je zapravo u retrospektivnoj analizi potvrđena metodom RT-PCR s početnicama specifičnim za AHVd te Sangerovim sekvenciranjem amplicona (Slike 6. i 7., Tablica 7.). Dodatna potvrda da se radi o sekvencama AHVd dobivena je i usporedbom sekundarne strukture parcijalnog genoma AHVd-a (Slika 8.) uzorka 392 (Tablica 7., jabuka sorte 'Mutsu' iz Velike Ludine) te čitavog genoma AHVd s pristupnim brojem MH049330.1 iz GenBank. Iako se u uzorku 392 radi o parcijalnoj AHVd-sekvenci, dijelovi dobivene sekundarne strukture se u potpunosti podudaraju s dijelovima sekundarne strukture sekvence AHVd-a iz baze podataka GenBank.

Amplicon iz uzorka 390 (Tablica 7., jabuka sorte 'Stayman' iz Sv. Marije na Muri) ne pokazuje sličnost i s jednom poznatom sekvencom u bazi podataka GenBank. Postoji mogućnost da se radi o novoj vrsti viroida koja je srodna čekićastom viroidu jabuka budući da se cDNA uspjela amplificirati pomoću početnica specifičnih za AHVd. S druge strane, postoje sekvence s niskom

složenosti (eng. *low-complexity sequence*) koje mogu otežati pretraživanje srodnih sekvenci. Zbog takvih se sekvenci mogu dobiti pogrešni rezultati te zato postoji filter koji ne razmatra sekvence s niskom složenosti prilikom pretraživanja srodnih sekvenci metodom BLASTn (Frith, 2011; Altschul i sur., 1994). Taj filter može prouzročiti rezultat kakav je dobiven ovdje ukoliko pretraživana sekvenca ima puno regija s niskom složenosti. Sekvence s niskom složenosti se mogu prepoznati vizualnim pregledom sekvence od interesa. U slučaju amplikona iz uzorka 390, bilo je dosta sekvenci s niskom složenosti. Ipak, isključivanje navedenog filtra prilikom pretraživanja baze podataka GenBank pomoću programa BLASTn nije rezultiralo identifikacijom srodne sekvence.

Karakterizacija viroida u potpunosti se može provesti samo ukoliko imamo potpune viroidne genome. Oni se osim visokoprotocnim sekvenciranjem mogu dobiti i Sangerovim sekvenciranjem amplikona koji se dobivaju drugim parom početnica koje su i dalje specifične za određeni viroid, ali pokrivaju konzerviranu regiju koju prvi par početnica ne pokriva. Iz toga razloga pokušana je amplifikacija s parom početnica AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG navedenih u literaturi (Messmer i sur., 2017). Međutim, prvi pokus je bio neuspješan te smo zato pokušali optimizirati reakcijske uvjete kako bi se dobio amplikon. Razlog zbog kojeg je optimizacija PCR-ciklusa za par početnica AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG bila neuspješna ostaje nepoznat jer daljnji eksperimenti nisu mogli biti provedeni u okviru ovog rada. Ipak, može se pretpostaviti da taj par početnica ima nisku efikasnost zbog toga što se veže na dio regije čekićastog ribozima koji formira omču (Messmer i sur., 2017). Par početnica AHVd-13F_PG i AHVd-12R_PG prijanja na dio regije čekićastog ribozima bez sekundarnih struktura te je vjerojatno zato amplifikacija s njima bila uspješna.

Filogenetskom analizom (Slika 9.) utvrđena je srodnost sekvenci dobivenih u ovome radu s AHVd-sekvencama iz baze podataka GenBank. Time je i dodatno potvrđena prisutnost AHVd u hrvatskim izolatima ukupnih nukleinskih kiselina iz jabuka. Zbog dobivanja parcijalnih sekvenci AHVd izolata iz Hrvatske uslijed primjene samo jednog para početnica u amplifikaciji RT-PCR nije bilo moguće formirati konsenzus-sekvence čitavog genoma AHVd-a, već su formirane parcijalne sekvence duljine između 232 i 392 nukleotida. Iz tog je razloga nakon sravnjivanja svih sekvenci ostalo samo oko 200 nukleotida za filogenetsku usporedbu što je premalo informativnih mjesta za preciznu filogenetsku analizu. Ipak, sekvence su se donekle grupirale po geografskoj pripadnosti i izvornom porijeklu sorti jabuka (Slika 9.). Uzorak 392 grupirao se tako u skupinu s dva uzorka iz

Mađarske i jednim iz Češke. Radi se o uzorku jabuke japanske sorte 'Mutsu' skupljenom u Međimurskoj županiji koja graniči s Mađarskom. Blizina lokacija kultivara u kojima su prikupljeni ti uzorci indicira da je između tih lokacija došlo do rasprostranjenja AHVd izmjenom sorti jabuka ili podloga na koje se jabuke nacjepljuju. Većina hrvatskih uzoraka grupirana je zajedno (uzorci 483, 489 i MP1_2). Uzorak 483 je iz kultivara 'Francuska Kožarka'. To je jedna od starih, vjerojatno davno introduciranih, sorti koje se uzgajaju na području Hrvatske. Osim 'Francuske Kožarke', kultivar 'Plemka' iz kojeg je prikupljen uzorak 489 također predstavlja udomaćenu sortu jabuke. Iako su uzorci 483 i 489 porijeklom iz različitih županija, radi se o starim sortama u čijim se kultivarima AHVd vjerojatno rasprostranjuje već dugi niz desetljeća. Uzorak MP1_2 izoliran je iz jabuke nepoznate sorte, no vjerojatno se radi o nekoj staroj sorti budući da je uzorak prikupljen s dva stara stabla u voćnjaku obitelji iz Like (Korenice). S tim je uzorcima grupiran i uzorak G2. Budući da se u potonjem slučaju radi o uzorku ploda komercijalno dobro poznatog i rasprostranjenog kultivara 'Granny Smith' kupljenog na tržnici, geografsko porijeklo uzorka nije poznato. Prema blizini grana hrvatskih uzoraka moglo bi se pretpostaviti da je uzorak G2 porijeklom s područja Hrvatske, no to se ne može reći sa sigurnošću, a svakako ne bez dostupnog cjelovitog genoma viroida. Ipak, grana na kojoj se nalazi uzorak G2 u blizini je i grane uzorka iz Kine pa se za sada ne može isključiti mogućnost da se radi o jabuci koja je uvezena iz Kine. To je zemlja koja je najveći izvoznik raznih sorti jabuka u svijetu (World Population review, <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/apple-production-by-country>, pristupljeno 10.7.2023.). Za razliku od dosada navedenih uzoraka, uzorak 554 nije grupiran po europskoj geografskoj lokaciji, već je u grani s kanadskim uzorcima. Radi se o uzorku jabuke sorte 'Enterprise' koja je porijeklom iz Sjedinjenih američkih država (Crosby i sur., 1994). Vjerojatno je već uvozom sorte 'Enterprise' u Europu, pa tako i Hrvatsku, ili introdukcijom podloge za nacjepljivanje jabuka iz područja Sjeverne Amerike došlo do prijenosa te varijante AHVd u Hrvatsku.

5. ZAKLJUČAK

Čekićasti viroid jabuke (AHVd) po prvi je put detektiran u uzorcima jabuka hrvatskih kultivara. Najviše uzoraka u kojima je detektiran AHVd prikupljeni su u Međimurskoj županiji.

Prisutnost AHVd-a u izolatima ukupnih nukleinskih kiselina potvrđena je metodom RT-PCR, Sangerovim sekvenciranjem i filogenetskom analizom, te usporedbom sekundarnih struktura AHVd-genoma.

Sekvenca uzorka 390 ne pokazuje sličnost niti s jednom poznatom sekvencom u bazi podataka GenBank. Zbog toga što je isti rezultat dobiven i bez korištenja filtera za sekvence s niskom složenosti, može se pretpostaviti da se radi o novom viroidu koji je srodan čekićastom viroidu jabuke budući da se cDNA uspjela amplificirati pomoću početnica specifičnih za AHVd. Potrebna su dodatna istraživanja za potvrdu ove hipoteze.

Pretpostavlja se da amplifikacija viroida s parom početnica AHVd-88F_PG i AHVd-87R_PG nije uspjela jer se one vežu na dio regije čekićastog ribozima koji formira terminalnu ukosnicu koja se možda nije denaturirala u postupku RT-PCR. Potrebno je dodatno optimizirati reakcijske uvjete da se postigne amplifikacija.

Iako je sravnjivanjem dobiveno premalo informativnih mjesta za preciznu filogenetsku analizu, naše se AHVd-varijante grupirajurezultat pokazuje grupiraju u skupine prema geografiji i izvornom porijeklu sorti jabuka. Uzorak 392 grupira se s uzorcima iz Mađarske i Češke dok se većina drugih hrvatskih izolata (uzorci 483, 489 i MP1_2) nalazi u zasebnoj skupini. Izolat 554 je grupiran s kanadskim uzorcima moguće zbog izvornog porijekla sorte 'Enterprise' iz koje je taj uzorak izoliran. Budući da većina hrvatskih uzoraka formira jednu skupinu te se samo dva uzorka nalaze u drugim skupinama, može se zaključiti da se AHVd iz skupine uzoraka starih sorti jabuka duže rasprostranjuju na području Hrvatske od uzoraka 392 i 554.

LITERATURA

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- CABI & EPPO. (2022). Apple hammerhead viroid. [Distribution map]. *Distribution Maps of Plant Diseases*. <https://doi.org/10.1079/DMPD/20220233377>
- Canales, C., Morán, F., Olmos, A., & Ruiz-García, A. B. (2021). First detection and molecular characterization of apple stem grooving virus, apple chlorotic leaf spot virus, and apple hammerhead viroid in loquat in Spain. *Plants*, 10(11), 2293. <https://doi.org/10.3390/plants10112293>
- Chiumenti, M., Navarro, B., Venerito, P., Civita, F., Minafra, A., & Di Serio, F. (2019). Molecular variability of apple hammerhead viroid from Italian apple varieties supports the relevance in vivo of its branched conformation stabilized by a kissing loop interaction. *Virus Research*, 270, 197644. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.197644>
- Clarke, J. D. (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (Ctab) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2009(3), pdb.prot5177. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5177>
- Crosby, J. A., Janick, J., Pecknold, P. C., Goffreda, J. C., & Korban, S. S. (1994). 'Enterprise' apple. *HortScience*, 29(7), 825–826. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.7.825>
- Daròs, J., Elena, S. F., & Flores, R. (2006). Viroids: An Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Reports*, 7(6), 593–598. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400706>
- Di Serio, F., Li, S.-F., Matoušek, J., Owens, R. A., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J. Th. J., Vidalakis, G., Flores, R., & ICTV Report Consortium. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Avsunviroidae. *Journal of General Virology*, 99(5), 611–612. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001045>. Dostupno na: <https://ictv.global/report/chapter/avsunviroidae/avsunviroidae> (pristupljeno 9.5.2023)
- Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber "virus." *Virology*, 45(2), 411–428. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90342-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90342-4)
- Diener, T. O. (1979). Viroids: Structure and function. *Science*, 205(4409), 859–866. <https://doi.org/10.1126/science.472709>
- Diener, T. O. (1987). Biological properties. In T. O. Diener (Ed.), *The Viroids* (pp. 9–35). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2_2
- Dissanayaka Mudiyanselage, S. D., Ma, J., Pechan, T., Pechanova, O., Liu, B., & Wang, Y. (2022). A remodeled RNA polymerase II complex catalyzing viroid RNA-templated transcription. *PLoS Pathogens*, 18(9), e1010850. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010850>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elzebroek, A. T. G., & Wind, K. (2008). *Guide to cultivated plants*. CABI.

- Flores, R., Gas, M.-E., Molina-Serrano, D., Nohales, M.-Á., Carbonell, A., Gago, S., De La Peña, M., & Daròs, J.-A. (2009). Viroid replication: Rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses*, *1*(2), 317–334. <https://doi.org/10.3390/v1020317>
- Flores, R., Minoia, S., Carbonell, A., Gisel, A., Delgado, S., López-Carrasco, A., Navarro, B., & Di Serio, F. (2015). Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Research*, *209*, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.027>
- Flores, R., Serra, P., Minoia, S., Di Serio, F., & Navarro, B. (2012). Viroids: From genotype to phenotype just relying on rna sequence and structural motifs. *Frontiers in Microbiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00217>
- Fontdevila Pareta, N., Lateur, M., Steyer, S., Blouin, A. G., & Massart, S. (2022). First reports of Apple luteovirus 1, Apple rubodvirus 1 and Apple hammerhead viroid infecting apples in Belgium. *New Disease Reports*, *45*(2). <https://doi.org/10.1002/ndr2.12076>
- Gas, M.-E., Hernández, C., Flores, R., & Daròs, J.-A. (2007). Processing of nuclear viroids in vivo: An interplay between rna conformations. *PLoS Pathogens*, *3*(11), e182. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030182>
- Giguère, T., Adkar-Purushothama, C. R., Bolduc, F., & Perreault, J.-P. (2014). Elucidation of the structures of all members of the *Avsunviroidae* family: Structure of viroids. *Molecular Plant Pathology*, *15*(8), 767–779. <https://doi.org/10.1111/mpp.12130>
- Grill, L. K., & Semancik, J. S. (1978). RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *75*(2), 896–900. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.2.896>
- Hadidi, A., Vidalakis, G., & Sano, T. (2017). Economic significance of fruit tree and grapevine viroids. In *Viroids and Satellites* (pp. 15–25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00002-4>
- Hamdi, I., Soltani, R., Baraket, G., Varsani, A., & Najjar, A. (2022). First report of apple hammerhead viroid infecting ‘Richared Delicious’ apple (*Malus domestica*) in Tunisia. *Journal of Plant Pathology*, *104*(2), 811–812. <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01027-z>
- Hammond, R. W., & Owens, R. A. (2006). Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2006-1106>
- Karp, A., Isaac, P. G., & Ingram, D. S. (1998). Isolation of nucleic acids using silica-gel based membranes: Methods based on the use of qiaamp spin columns. In A. Karp, P. G. Isaac, & D. S. Ingram (Eds.), *Molecular Tools for Screening Biodiversity* (pp. 59–63). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0019-6_14
- Križanac, I. (2017). *Molekularna epidemiologija i multigenska tipizacija bakterije ‘Candidatus Phytoplasma mali’ u Hrvatskoj* [Info:eu-repo/semantics/doctoralThesis, University of Zagreb. Faculty of Science]. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:393944>
- Lee, B. D., & Koonin, E. V. (2022). Viroids and viroid-like circular rnas: Do they descend from primordial replicators? *Life*, *12*(1), 103. <https://doi.org/10.3390/life12010103>

- Leichtfried, T., Dobrovoly, S., Reizenzein, H., Steinkellner, S., & Gottsberger, R. A. (2019). Apple chlorotic fruit spot viroid: A putative new pathogenic viroid on apple characterized by next-generation sequencing. *Archives of Virology*, *164*(12), 3137–3140. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04420-9>
- López-Carrasco, A., & Flores, R. (2017). Dissecting the secondary structure of the circular RNA of a nuclear viroid *in vivo*: A “naked” rod-like conformation similar but not identical to that observed *in vitro*. *RNA Biology*, *14*(8), 1046–1054. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1223005>
- Messmer, A., Sanderson, D., Braun, G., Serra, P., Flores, R., & James, D. (2017). Molecular and phylogenetic identification of unique isolates of hammerhead viroid-like RNA from ‘Pacific Gala’ apple (*malus domestica*) in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *39*(3), 342–353. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1354334>
- Moelling, K., & Broecker, F. (2021). Viroids and the origin of life. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(7), 3476. <https://doi.org/10.3390/ijms22073476>
- Nabi, S. U., & Baranwal, V. K. (2020). First report of apple hammerhead viroid infecting apple cultivars in india. *Plant Disease*, *104*(11), 3086. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-19-2731-PDN>
- Nohales, M.-Á., Flores, R., & Daròs, J.-A. (2012). Viroid RNA redirects host DNA ligase 1 to act as an RNA ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(34), 13805–13810. <https://doi.org/10.1073/pnas.1206187109>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Serra, P., Messmer, A., Sanderson, D., James, D., & Flores, R. (2018). Apple hammerhead viroid-like RNA is a bona fide viroid: Autonomous replication and structural features support its inclusion as a new member in the genus Pelamoviroid. *Virus Research*, *249*, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.03.001>
- Steger, G., & Perreault, J.-P. (2016). Structure and associated biological functions of viroids. In *Advances in Virus Research* (Vol. 94, pp. 141–172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2015.11.002>
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Tsagris, E. M., Martínez De Alba, Á. E., Gozmanova, M., & Kalantidis, K. (2008). Viroids. *Cellular Microbiology*, *10*(11), 2168–2179. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01231.x>
- Várallyay, E., Příbylová, J., Galbacs, Z. N., Jahan, A., Varga, T., Špak, J., Lenz, O., Fránová, J., Sedlák, J., & Koloniuk, I. (2022). Detection of apple hammerhead viroid, apple luteovirus 1 and citrus concave gum-associated virus in apple propagation materials and orchards in the czech republic and hungary. *Viruses*, *14*(11), 2347. <https://doi.org/10.3390/v14112347>

- Venkataraman, S., Badar, U., Shoeb, E., Hashim, G., AbouHaidar, M., & Hefferon, K. (2021). An inside look into biological miniatures: Molecular mechanisms of viroids. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2795. <https://doi.org/10.3390/ijms22062795>
- Walia, Y., Dhir, S., Zaidi, A. A., & Hallan, V. (2015). *Apple scar skin viroid* naked rna is actively transmitted by the whitefly *trialeurodes vaporariorum*. *RNA Biology*, 12(10), 1131–1138. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1086863>
- Wang, Y. (2021). Current view and perspectives in viroid replication. *Current Opinion in Virology*, 47, 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.12.004>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

INTERNETSKI IZVORI

- Di Serio, F., Li, S.-F., Matoušek, J., Owens, R. A., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J. Th. J., Vidalakis, G., Flores, R., & ICTV Report Consortium. (2018). Ictv virus taxonomy profile: Avsunviroidae. *Journal of General Virology*, 99(5), 611–612. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001045>. Dostupno na: <https://ictv.global/report/chapter/avsunviroidae/avsunviroidae> (pristupljeno 9.5.2023)
- Di Serio, F., Li, S.-F., Pallás, V., Owens, R. A., Randles, J. W., Sano, T., Verhoeven, J. Th. J., Vidalakis, G., & Flores, R. (2017). Viroid taxonomy. In *Viroids and Satellites* (pp. 135–146). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00013-9>. Dostupno na: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/subviral-agents/w/viroids (pristupljeno 9.5.2023.)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 13. rujna 2001. Završila sam Osnovnu školu Savski Gaj u Zagrebu (2008-2016). Nakon završetka osnovnoškolskog obrazovanja upisala sam dvojezični smjer u XVI. gimnaziji (2016-2020). Uz navedene ustanove, završila sam i osnovnoškolsko i srednješkolosko obrazovanje u Glazbenom učilištu Elly Bašić gdje sam stekla titulu glazbenice klaviristice. Završila sam preddiplomski studij Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu (2020-2023). Ove sam godine upisala diplomski studij Molekularne biologije na sveučilištu Lund u Švedskoj.