Biološke i molekularne značajke Coleus blumei viroida 3

Butković, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:631604

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Anamarija Butković

Biološke i molekularne značajke *Coleus blumei viroida 3*

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

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

Zahvaljujem se od sveg srca svojoj mentorici prof. dr. sc. Dijani Škorić na beskrajnom strpljenju i pomoći u mom diplomskom i njegovoj izradi. Uvijek ću pamtiti koliko Ste me naučili i truda uložili u moje znanje i rad. Pretvorili Ste me u znanstvenika i dali mi krila s kojima ću i dalje tražiti saznanja kroz znanstveni rad. Gdje god da me moja krila odvedu uvijek ću se sjećati Vas.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

BIOLOŠKE I MOLEKULARNE ZNAČAJKE *COLEUS BLUMEI VIROIDA 3*

Anamarija Butković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Viroidi su gole, prstenaste molekule RNA duge 246 – 401 nukleotida. Najmanje su autonomne infektivne nukleinske kiseline dosada poznate, ne kodiraju proteine, a isključivo su biljni patogeni. *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. (syn. *Coleus blumei*) ili šarena kopriva je domaćin nekoliko *Coleus blumei viroida* (CbVd). Šarena kopriva je široko rasprostranjena ukrasna biljka i domaćin za istraživanje roda *Coleviroid (Pospiviroidae)*. Najbolje istraženi coleviroid je *Coleus blumei viroid 1* (CbVd-1) dok se za CbVd-3 to ne može reći. Cilj ovog diplomskog rada je bio potvrditi inficiranost prethodno istraživanih kultivara šarene koprive viroidom CbVd-3 te istražiti njegove glavne molekularne i biološke značajke (krug domaćina, prijenos sjemenom, prijenos cijepljenjem). Iz ukupne RNA potencijalnih domaćina metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) detektirana je prisutnost viroida uz primjenu generičkih početnica za rod *Coleviroid*. Od istraženih potencijalnih alternativnih domaćina iz porodice *Lamiaceae*, jedino se *Salvia hispanica* L. pokazala kao mogući novi domaćin coleviroida. Transgeni korjenčići šarene koprive također su domaćini coleviroida koji u njima perzistira. Analiza parcijalnih sekvenci viroida iz *S. hispanica* i transgenih korjenčića šarene koprive ukazuje na CbVd-1 i potvrđuje njegov širi krug domaćina u odnosu na CbVd-3. Dokazana je prenosivost CbVd-3 sjemenom šarene koprive od 40%, no prijenos cijepljenjem nije bio uspješan. Zbog nedostatnih tehničkih uvjeta pokus cijepljenja bi trebalo ponoviti. Istraživanjem domaćina metodom sekvencijske poliakrilamidne gel-elektroforeze (sPAGE) za laboratorijski uzorak šarene koprive inficirana s CbVd-3 u smjesi s CbVd-1 infekcija je potvrđena.

64 stranice, 7 slika, 15 tablica, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Coleviroid*, CbVd-1, CbVd-3, šarena kopriva, RT-PCR, sPAGE

Voditelj: prof. dr. sc. Dijana Škorić

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dijana Škorić

doc. dr. sc. Ana Galov

izv. prof. dr. sc. Renata Matoničkin Kepčija

Rad prihvaćen: 2. 2. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology Graduation thesis

Biological and molecular properties of *Coleus blumei viroid 3*

Anamarija Butković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Viroids are naked, circular RNA molecules with length between 246 and 401 nucleotides. They are the smallest autonomous infectious noncoding nucleic acids known so far. They infect only plants. *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. (syn. *Coleus blumei*) is a host to many *Coleus blumei viroid* species (CbVd). *Coleus blumei* is grown worldwide and it is a host for studying *Coleviroid* members *(Pospiviroidae). Coleus blumei viroid 1* (CbVd-1) is the best studied *Coleviroid* so far while the knowledge on CbVd-3 biology is scarce. The goals of my thesis were to confirm infections with CbVd-3 in previously analyzed coleus cultivars and to study the main molecular and biological properties (hosts, seed transmission, transmission by graft-inoculation) of CbVd-3. Total plant RNA samples from potential hosts were tested by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) with generic coleviroid primers targeting the central conserved region of the viroid molecule. Several potential new hosts from *Lamiaceae* family were tested but only *Salvia hispanica* L. was found positive for coleviroid presence. Transgenic hairy roots of coleus were also found as persistent hosts of a coleviroid. The partial sequence analysis from *S. hispanica* and coleus hairy roots suggest the presence of CbVd-1 confirming its wide host range as opposed to CbVd-3. In one of the coleus cultivars tested, the CbVd-3 seed transmission was 40%. Graft-transmission experiments were unsuccessful as yet but due to technical difficulties, they should be repeated to draw relevant conclusions. Sequential polyacrylamide gel electrophoresis (sPAGE) analyses confirmed the infection of one of the coleus plants with CbVd-3 in mixed infection with CbVd-1.

64 pages, 7 figures, 15 tables, 49 references, original in: croatian

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: *Coleviroid,* CbVd-1, CbVd-3, RT-PCR, sPAGE

Supervisor: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.

Reviewers: Prof. Dijana Škorić, Ph.D.

Asst. Prof. Ana Galov, Ph.D.

Assoc. Prof. Renata Matoničkin Kepčija

Thesis accepted: 2. 2. 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD 1
1.1. OTKRIĆE VIRODA 1
1.2. STRUKTURA VIRODA 1
1.3. VIROIDNE PORODICE 2
1.4. DOMAĆINI I SIMPTOMI 5
1.5. PRIJENOS VIROIDA U PRIRODI I KROZ BILJKU 5
1.6. DETEKCIJA VIROIDA 6
1.7. VIROIDI I EVOLUCIJA 7
1.8. ROD *COLEVIROID* 8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 10
3. MATERIJALI I METODE 11
3.1. MATERIJALI 11
3.1.1. ODABIR POKUSNIH BILJAKA I UZORKOVANJE BILJNOG MATERIJALA 11
3.1.2. PUFERI I OTOPINE 13
3.1.2.1. Puferi i otopine za elektroforezu u agaroznom gelu 13
3.1.2.2. Puferi i otopine za sekvencijsku poliakrilamidnu gel elektroforezu 14
3.1.3. STANDARD ZA ODREĐIVANJE MOLEKULARNE MASE DNA 15
3.1.4. KOMERCIJALNI KOMPLETI I KEMIKALIJE ZA IZOLACIJU NUKLEINSKIH KISELINA 15
3.1.4.1 Komercijalni komplet za izolaciju ukupne RNA iz biljnog tkiva Trizol® reagent 15
3.1.4.2. Komercijalni komplet za izolaciju ukupne RNA iz biljnog tkiva Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit 16
3.1.4.3. Ekstrakcija viroidne RNA iz 5 grama biljnog tkiva 16
3.1.5. RAČUNALNE ANALIZE NUKLEOTIDNIH SLJEDOVA 17
3.2. METODE 18
3.2.1 IZOLACIJA UKUPNIH RNA IZ BILJNOG TKIVA 18
3.2.1.1. Postupak s Trizol®-reagensom 18
3.2.1.2. Esktrakcija RNA kompletom reagensa Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit 19
3.2.1.3. Ekstrakcija RNA iz 5 grama biljnog tkiva 20
3.2.2. SEKVENCIJSKA POLIAKRILAMIDNA GEL-ELEKTROFOREZA 21
3.2.3. BOJANJE POLIAKRILAMIDNIH GELOVA SREBROM 22

3.2.4. UMNAŽANJE VIROIDA REVERZNOM TRANSKRIPCIJOM I LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE 23
3.2.5. ANALIZA UMNOŽENE DNA ELEKTROFOREZOM U AGAROZNOM GELU 26
3.2.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RNA 27
3.2.7. NACJEPLJIVANJE ŠARENE KOPRIVE NA BOSILJAK 27
3.2.8. SEKVENCIRANJE VIROIDNIH GENOMA 27
3.2.9. ANALIZA SEKVENCI 28
4. REZULTATI 29
4.1. POTENCIJALNE DOMAĆINSKE BILJKE U KOJIMA JE ISTRAŽIVANA PRISUTNOST COLEVIROIDA 29
4.2. ELEKTROFOREZA AMPLIKONA U AGAROZNOM GELU 30
4.3. NACJEPLJIVANJE ŠARENE KOPRIVE NA BOSILJAK 36
4.4. SEKVENCIJALNA POLIAKRILAMIDNA GEL-ELEKTROFOREZA 38
4.5. VIROIDNE SEKVENCE 39
5. RASPRAVA 42
6. ZAKLJUČAK 46
7. LITERATURA 47
8. PRILOZI 51

1. UVOD

1.1. OTKRIĆE VIROIDA

Viroidi su gole, male, prstenaste (kovalentno zatvorene) molekule RNA duge 246 – 401 nukleotida (Flores i sur., 2009.). Najmanje su autonomne infektivne nukleinske kiseline dosada poznate, a isključivo su biljni patogeni (Di Serio i sur., 2014.). Otkriveni su u krumpiru kao uzročnici bolesti ušiljenosti gomolja krumpira 1960-ih godina, a 1971. je prvi otkriveni viroid dobio naziv *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Hammond i Owens, 2006.). Bolest koju je uzrokovao lako se mehanički prenosila sa zaražene na zdravu biljku i to je potaknulo znanstvenike da uzročnika traže među bakterijama i gljivicama kao uobičajenim uzročnicima biljnih zaraznih bolesti. Kako nije pronađena gljivica ili bakterija koja bi uzrokovala simptome ušiljenosti gomolja krumpira, sumnja je pala na virus. Iako visoku infekcioznost i mogućnost mehaničkog prijenosa dijeli s virusima, usprkos brojnim pokušajima izolacije virusnih čestica, u zaraženom krumpiru one nikada nisu pronađene (Diener, 1971.). Tretman ribonukleazom A, ali ne i deoksiribonukleazom inaktivirao je uzročnika zaraze. Osim toga, tretman fenolom nije utjecao na položaj infektivnog uzročnika kod pročišćavanja u gradijentu gustoće (Diener, 1987.; Hadidi i sur., 2003.). Tek 1971. godine Diener iznosi tada vrlo neobičnu hipotezu da je uzročnik dosad nepoznati tip patogena, kojega naziva viroid. Okarakterizirao ga je na sljedeći način:

1. patogena koji postoji *in vivo* kao slobodna prstenasta jednolančana RNA
2. u zaraženom tkivu ne mogu se detektirati čestice poput virusnih
3. infektivna RNA je male molekulske mase
4. usprkos ograničenoj veličini, RNA se replicira autonomno, tj, nikakav pomagački virus nije potreban
5. infektivna molekula je samo jedna vrsta RNA (Diener, 1987.).

1.2. STRUKTURA VIROIDA

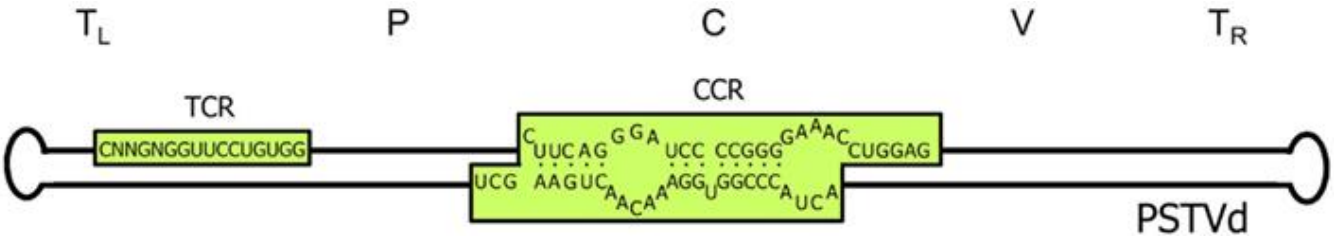
Molekule viroida ne kodiraju proteine što ih čini ovisnima o proteinima domaćina kako bi se replicirali, procesirali i transportirali kroz biljku. To znači da su viroidi paraziti domaćinske transkripcijske mašinerije (Steger i Reisner, 2003.).

Prstenaste molekule viroida zbog visokog postotka komplementarnih nukleotida stvaraju sekundarne i tercijarne strukture kojima upravljaju enzimima (prvenstveno RNA-polimerazom II u jezgri ili RNA-polimerazom u plastidima) u svrhu svoje propagacije. Navedene strukture višeg reda imaju i ključnu ulogu u patogenosti viroida te njihovom pokretanju unutar i između stanica (Flores i sur., 2015.; Flores i sur., 2009.). Sekundarnim strukturama su zaštićeni od razgradnje endonukleazama (koje razgrađuju jednolančane regije) i egzonukleazama (koje za početak razgradnje trebaju slobodan stršeći kraj nukleinske kiseline) (Flores i sur., 2012.). Jedan manji broj viroida ima ribozimsku aktivnost. Ti su okarakterizirani kao katalitičke RNA što govori u prilog teoriji da potječu iz RNA-svijeta (Flores i sur., 2005.).

1.3. VIROIDNE PORODICE

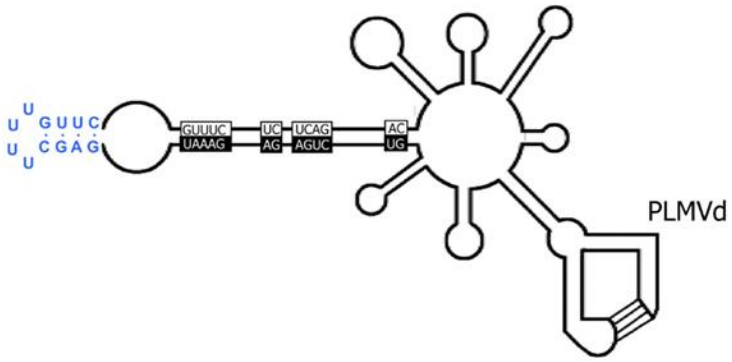
Dosad su poznate 32 vrste viroida podijeljene u 8 rodova (Di Serio i sur., 2014.). Viroidi se klasificiraju prema homologiji cijelog nukleotidnog slijeda, uključujući središnju konzerviranu regiju (*Central Conserved Region*, CCR) kao najvažniju i evolucijski najočuvaniju regiju, te terminalne konzervirane regije i/ili ukosnice kao dodatne odrednice. (Flores i sur., 2003.). Prema *International Organization on Taxonomy of Viruses* (ICTV, http://www.ictvonline.org/) klasificirani su u porodice *Pospiviroidae* i *Avsunviroidae* (Slika 1. i 2.).

Porodici *Pospiviroidae* pripada 28 dosad poznatih viroida koji imaju CCR (Slika 1.) te poprimaju štapićastu sekundarnu strukturu *in vitro* (Flores i sur., 2005). Nemaju svojstvo autokatalitičkog cijepanja i repliciraju se u jezgri asimetričnim mehanizmom (Slika 3.) kotrljajućeg prstena (Flores i sur., 2003.). Pripadnici porodice *Pospiviroidae* imaju u svojoj štapićastoj strukturi 5 domena ili regija: terminalnu lijevu (TL, *terminal left*), regiju ili domenu patogenosti (P), CCR, varijabilnu (V) i terminalnu desnu regiju (TR, *terminal right*) (Slika 1.). Domena patogenosti je povezana s ekspresijom simptoma i sadrži slijed adenina. CCR se sastoji od konzerviranog slijeda nukleotida koji na rubovima ima nepravilna obrnuta ponavljanja i odgovorna je za replikaciju, propagaciju i ligaciju, dok je varijabilna domena podložna promjenama koje ne utječu na infektivnost viroida. Terminalna desna domena ima mali purinski/pirimidinski motiv koji utječe na transport kroz biljku. Konzervirane sekundarne strukture ukosnice 1 i 2 u porodici *Pospiviroidae* su izrazito bitne za očuvanje strukture i replikaciju te se nalaze u varijabilnoj i terminalnoj lijevoj domeni (Flores i sur., 2012.; Steger i Riesner, 2003.).



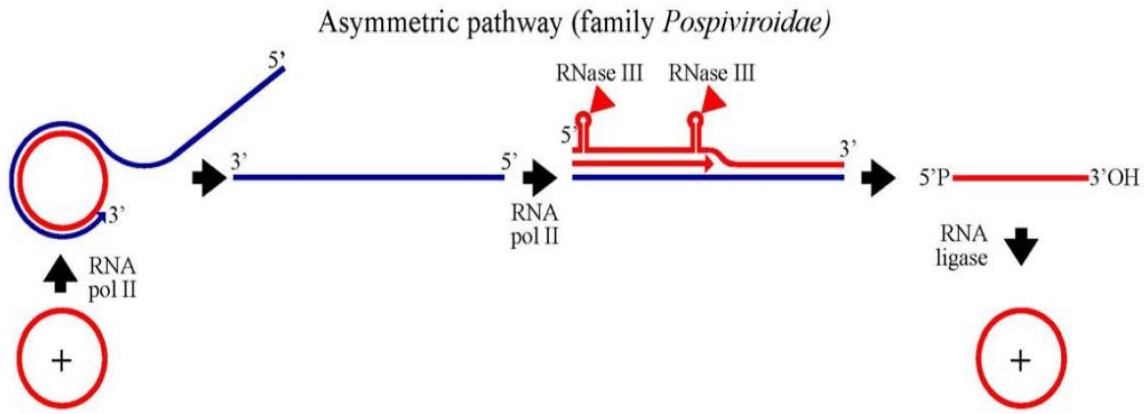
Slika 1. Struktura viroida ušiljenosti gomolja krumpira (*Potato spindle tuber viroid*, PSTVd), glavnog predstavnika porodice *Pospiviroidae.* Prstenasta RNA-molekula s lijevom i desnom terminalnom domenom (TL, TR, redom), domenom patogenosti (P), varijabilnom domenom (V) i središnjom konzerviranom domenom ili regijom (CCR) (prilagođeno prema: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00217/full.

Druga porodica kojoj za sada pripada samo četiri viroida je porodica *Avsunviroidae* (*Avocado sunblotch viroid, Peach latent mosaic viroid, Eggplant latent viroid* i *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*). Nemaju kompaktnu štapićastu sekundarnu strukturu niti centralnu konzerviranu regiju nego su razgranati (Slika 2.). No upravo ovi viroidi imaju svojstvo autokatalize koju obavlja dio njihovog slijeda koji poprima oblik čekićastog ribozima. Repliciraju se u kloroplastu simetričnim mehanizmom kotrljajućeg prstena pomoću drukčijih RNA-polimeraza nego je to slučaj za pospiviroide (Flores i sur., 2005).



Slika 2. Razgranata struktura jednog člana porodice *Avsunviroidae* (*Peach latent mosaic viroid*, PLMVd) (prilagođeno prema: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00217/full).

Dogovorno se dvije molekule RNA viroida smatraju različitim vrstama ako imaju više od 90% razlike u sekvenci, dok se razlike u sekvencama manje od 90% smatraju viroidnim varijantama. Zbog postojanja viroida kao kvazispecijesa tj. populacija sekvencijskih varijanti molekula RNA koje su genetički povezane, nije uvijek lako odrediti viroidne vrste. Struktura kvazispecijesa je kao i kod RNA-virusa posljedica točkastih mutacija zbog veće stope pogreške RNA-polimeraze prilikom ugradnje nukleotida (10^{-5}) u usporedbi s DNA-polimerazom (10^{-9}) (Flores i sur., 2003.). Rekombinacijski događaji među viroidima koji inficiraju istu biljku također doprinose raznolikosti viroidnih varijanti unutar vrste. Kod viroida se iz navedenih razloga biološka svojstva kao što su simptomi i krug domaćina također koriste za razlučivanje vrsta (Flores i sur., 2003.; Di Serio i sur., 2014.).



Slika 3. Asimetrična replikacija viroida iz porodice *Pospiviroidae* mehanizmom kotrljajućeg prstena. Prstenasta RNA viroida služi kao kalup za RNA-polimerazu II čijom djelatnošću nastaje (-) linearni oligomerni produkt koji služi za dalju propagaciju viroidne RNA (označen plavom bojom). Replikacijom linearnog produkta nastaje oligomerna (+) RNA (označena crvenom bojom), a njenim cijepanjem staničnim enzimima (RNazom III) i cirkularizacijom (RNA-ligazom) nastaje (+) infektivni oblik viroida (crveni krug) (Flores i sur., 2009).

Replikacija pospiviroida se događa u jezgri pomoću RNA-polimeraze II i naziva se asimetrična replikacije jer se mehanizmom kotrljajućeg prstena sintetizira samo (-) RNA lanac (Slika 3.). Za PSTVd, (glavni predstavnik porodice *Pospivioridae* kojoj pripadaju i CbVd) postoje dva mjesta početka replikacije i to nukleotidi A_{111} i A_{325} koji se nalaze u CCR, te nukleotidi $_{105}GGAGCGA_{325}$ i $_{319}GGGGCGA_{325}$ koji služe kao promotori. Ligacija se događa uz pomoć ligaze domaćina na (+) lancu (nazvan tako jer najbrojniji lanac *in vivo*) nakon replikacije jer je on duži od (-) lanca (Steger i Riesner, 2003.). Dokazan je i motiv u tercijarnoj strukturi viroidne RNA koji odgovara petlji E koju nalazimo u 5S rRNA bakterija i koja sudjeluje u vezanju ribosomskih proteina i regulaciji transkripcije. Petlja E je regulatorna

sekvenca u viroida koja utječe na viroidnu transkripciju i mjesto je vezanja većine staničnih proteina koji ju omogućavaju (Owens i Baumstark, 2007.).

1.4. DOMAĆINI I SIMPTOMI

Viroidi parazitiraju na biljkama od kojih su mnoge kultivirane i za čovjeka važne kao izvori hrane (krumpir, kokosova palma, rajčica, grožđe i krastavac), kao sirovina u industrijskoj proizvodnji (npr. vlakna kokosove palme) ili služe kao ukrasne biljke (krizantema i šarena kopriva) (Randles, 2003.). Viroidne bolesti su rasprostranjene po tropskom i suptropskom pojasu primarno u biljkama dvosupnicama osim dvaju viroida koji inficiraju jednosupnice (palme), *Coconut cadang-cadang viroid* (CCCVd) i *Coconut tinangaja viroid* (CTiVd). Zaražene biljke pokazuju simptome slične simptomima virusnih oboljenja poput kloroza, patuljastog rasta, deformacije i epinastije listova, nekroze listova, smanjenja duljine internodija, pucanja kore, smanjenja cvjetova, deformacija plodova, pomaka vremena cvatnje i zriobe plodova te uginuća cijele biljke. No čest je i potpun izostanak simptoma i to u divljih biljaka koje su onda neka vrsta rezervoara viroidnih zaraza. Neke zaražene biljke poput šarene koprive (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br syn. *Coleus blumei*) uglavnom ne pokazuju simptome zaraze i zbog toga je nemoguće identificirati inficiranu biljku samo opservacijom već su potrebna laboratorijska testiranja. Najefikasniji način sprječavanja daljnjeg širenja zaraze u većini slučajeva je proizvodnja bezviroidng sadnog materijala i uništavanje zaraženih biljaka (Flores i sur., 2005.).

1.5. PRIJENOS VIROIDA U PRIRODI I KROZ BILJKU

Viroidi se prenose vrlo lako mehaničkom inokulacijom, cijepljenjem i kontaktom sa zaraženim oruđem, odjećom te rukama. U nekim vrstama biljaka viroidi se prenose sjemenom (*Coleus blumei viroidi*), peludom, a samo iznimno i kukcima; biljna uš *Myzus persicae* prenosi *Tomato planta macho viroid* (TPMVd). Metode eliminacije viroida iz zaraženih biljaka kao termoterapija i kultura meristemskih stanica biljke, koje se također podvrgavaju termoterapiji, su se pokazale uspješnima u eliminaciji pojedinih viroida jabuke (*Apple scar skin viroid*, ASSVd) i krizanteme (*Chrysanthemum stunt viroid*, CSVd) (Hammond i Owens, 2006.).

Sistemska infekcija domaćina je proces koji se sastoji od ulaska viroida u stanicu domaćina, dolaska na mjesto replikacije (jezgra kod *Pospiviroidae* i kloroplast kod *Avsunviroidae*), replikacije, izlaska umnoženih viroida iz stanice i transporta u susjedne stanice te naposljetku prijelaza iz organa u organ, odnosno kroz cijelu biljku. Plazmodezmiji su put za prijelaz viroida iz stanice u stanicu dok je se njihovo putovanje iz organa u organ odvija kroz floem. Viroidi obično „putuju“ vezani na neki stanični protein. HSVd (*Hop stunt viroid*) se primjerice u krastavcu veže na floemski protein 2 (*phloem protein 2 from cucumber* , CsPP2), a PSTVd se veže na dva proteina rajčice (Ding i Owens, 2003.; Semancik, 2003.).

1.6. DETEKCIJA VIROIDA

Najranija metoda za identifikaciju bolesti izazvanih viroidima bili su biološki testovi. Biotest tj. biološko indeksiranje podrazumijeva bilo koji inokulacijski test kojim se pouzdano može potvrditi prisutnost ili odsutnost patogena u inokuliranoj biljci. Za indeksiranje se koriste indikatorske biljne vrste to jest oni domaćini u kojima pojedini patogeni stalno izazivaju pojavu za njih tipičnih simptoma. Na ovaj način dobivamo vizualnu potvrdu biološke aktivnosti viroida, odnosno zaraze, možemo saznati potencijal za prijenos i replikaciju viroida te sposobnost izazivanja vidljivih simptoma. Međutim, indeksiranje nije uvijek praktično ni moguće, a striktno govoreći, ne određuje niti tip patogena. U najboljem slučaju biotestovi se mogu obaviti u nekoliko tjedana, ali mogu potrajati i više mjeseci. Za neke viroide poput *Coleus blumei viroida* (CbVd) ne postoje indikatorske biljke i detekcija je moguća jedino metodama molekularne biologije (Singh i Ready, 2003.).

Viroidi su gole RNA-molekule te imunokemijske metode poput testa ELISA standardne kod detekcije virusa za njih nisu primjenjive. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, PAGE) ne ovisi o slijedu nukleotida već o duljini i strukturi molekule te se prva koristila za brzu detekciju viroida. PAGE- varijante poput 2D-PAGE (dvodimenzionalna poliakrilamid-gel-elektroforeza), R-PAGE (*return*, odnosno povratna-PAGE) ili PAGE s temperaturnim gradijentom omogućuju detekciju, ali čak i izolaciju i pročišćavanje viroida. Na temelju razlika duljine i sporije pokretljivosti prstenaste strukture molekule RNA u odnosu na linearne iste duljine viroidi se odvajaju od malih linearnih staničnih RNA pa se ove metode i dalje koriste za otkrivanje novih viroidnih vrsta (Hanold i sur., 2003.).

Hibridizacija nukleinskih kiselina, reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR) postale su moguće s dostupnošću viroidnih nukleotidnih sljedova. Molekularna hibridizacija se oslanja na interakcije između nukleotida ciljne molekule i komplementarnih nukleotida označene probe čime nastaje dvolančana struktura. Neradioaktivne probe od kojih su najčešće one obilježene biotinom i digoksigeninom su povećale dostupnost i praktičnost metode (Mühlbach i sur., 2003.).

RT-PCR je metoda kojom je moguće kopirati točno određene RNA-sekvence u molekule komplementarne jednolančane DNA (cDNA), a zatim umnožiti DNA-sekvence sintezom DNA *in vitro*. Ključni koraci su kopiranje RNA-lanca uz pomoć odgovarajuće reverzne transkriptaze i specifične oligonukleotidne početnice, a u samom PCR-u faze amplifikacijskog ciklusa su: a) razdvajanje lanaca DNA povišenom temperaturom, b) prijanjanje oligonukleotidnih početnica denaturiranim lancima, te c) ekstenzija početnica termostabilnom DNA-polimerazom. Novosintetizirana DNA se eksponencijalno umnožava ponavljanjem ova 3 koraka kroz 30-tak ciklusa (Henson i French, 1993.). Početnice se uglavnom dizajniraju prema CCR-u u slučaju pospiviroida. Zahvaljujući cirkularnosti genoma dvije početnice orijentirane jedna nasuprot druge umnožit će cijeli viroidni genom. RT-PCR se zbog brzine i osjetljivosti rutinski primjenjuje u detekciji i identifikaciji viroida, ali nije pogodan za jako veliki broj uzoraka (Hadidi i Candresse, 2003.).

1.7. VIROIDI I EVOLUCIJA

Prvotna ideja o porijeklu viroida je bila da su viroidi introni koji su izbjegli mehanizme regulacije u stanici domaćina. Ta teorija je bazirana na velikoj sličnosti sekvenci viroida s grupom 2 introna te njihovom sličnom samoizrezivanju i ligaciji. Daljnjim istraživanjem se pokazalo da sekvence viroida nalikuju krajevima transpozona i posjeduju inverzna ponavljanja u sekvenci, te je to dovelo do zaključka da su viroidi potekli od transpozonskih elemenata ili retrovirusa delecijom unutarnjeg slijeda. No ovim teorijama ne ide u prilog to što nisu potvrđene za članove porodice *Avsunviroidae* jer među njima nije nađena sličnost sekvenci s intronima, transpozonima i retrovirusima. Diener je uz mnoge druge znanstvenike donio zaokret u razmišljanjima o porijeklu viroida jer je iznio teoriju da su oni zapravo relikti RNA-svijeta (Flores i sur., 2014.).

Karakteristike koje idu u prilog ovoj teoriji su:

- Maleni genomi od 240-400 nukleotida
- Veliki postotak GC-parova koji osiguravaju veću točnost RNA-polimeraze
- Prstenasta struktura zbog koje ne trebaju molekularne oznake za potpunu replikaciju
- Ne kodiraju proteine što ih stavlja u razdoblje prije pojave ribosoma
- Prisutnost ribozima što je odlika RNA-svijeta (Flores i sur., 2014.).

Vjeruje se da su članovi porodice *Avsunviroidae* (koji se repliciraju u kloroplastima) prvotno imali domaćina u cijanobakterijama koje su poslije postale plastidi endosimbiozom. Daljnjom adaptacijom na biljne stanice su nastali pripadnici porodice *Pospiviroidae* koji su „preselili" replikaciju u jezgru i prilagodili se na replikaciju RNA-polimerazom II. Jedan od mehanizama odgovornih za njihovu prilagodbu na replikaciju u biljnoj stanici i jezgri je velika stopa mutacija prilikom replikacije zbog većeg broja grešaka RNA-polimeraze u usporedbi s DNA-polimerazom (Flores i sur., 2014.).

1.8. ROD *COLEVIROID*

Porodici *Pospiviroidae* pripada rod *Coleviroid* čije vrste prvenstveno inficiraju biljku šarena ili ukrasna kopriva za koju je, čak i u široj javnosti, uvriježeno staro ime koleus (*Coleus blumei*), no preimenovana je u *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. (*Lamiaceae*). Šarena kopriva potječe iz jugoistočne Azije te se javlja u različitim bojama (žuta, zelena, grimizna i ružičasta) i njihovim kombinacijama (Chung i Choi, 2008.). Široko je rasprostranjena ukrasna biljka, lako se uzgaja u sobnim uvjetima, ali i na otvorenom u toplijim dijelovima godine što je čini važnom hortikulturnom vrstom umjerenih klimatskih područja i dobrim domaćinom za istraživanje roda *Coleviroid* (Hadidi i sur., 2003.). Ova biljna vrsta bitna je i u farmaciji zbog visoke koncentracije fenolnih tvari, a posebice zbog iskoristivosti kod sinteze ružmarinske kiseline (Petersen i sur., 1994.).

Prvi otkriveni i najbolje proučeni pripadnik roda *Coleviroid* je *Coleus blumei viroid 1* (CbVd-1). Otkriven je u sorti žute šarene koprive u Brazilu te se njegova rasprostranjenost poslije detektirala diljem svijeta. CbVd-1 se prenosi s biljke na biljku mehaničkom inokulacijom, cijepljenjem, reznicama ali i sjemenom. Prijenos sjemenom je dokazan i za

CbVd-5 i -6 (Chung i Choi, 2008.; Di Serio i sur., 2014.). U inficiranim biljkama može doći do pojave patuljastog rasta i kloroze no najčešće je infekcija prisutna bez vidljivih simptoma (Hadidi i sur., 2003.).

Rod *Coleviroid* sadrži još dvije priznate vrste *Coleus blumei viroida*, CbVd-2 i CbVd-3 (http://www.ictvonline.org/), a CbVd-5 i CbVd-6 će vjerojatno biti uskoro priznate kao nove vrste viroida (Di Serio i sur., 2014.). Svi poznati *Coleus blumei viroidi* imaju vrlo sličnu CCR koja je važna u replikaciji, procesiranju i ligaciji molekule dok su ostali dijelovi podložniji rekombinaciji i ostalim promjenama što omogućava nastanak kimera i novih vrsta (Hadidi i sur., 2003.)

.

Tablica 1. Dužina svih vrsta *Coleus blumei viroida* (CbVd) izražena brojem nukleotida (nt).

Vrsta viroida	**Dužina u nt**
CbVd-1	248-251
CbVd-2	301
CbVd-3	361-364
CbVd-4	295
CbVd-5	274
CbVd-6	342

CbVd-1 je rasprostranjen po cijelom svijetu, CbVd-2 i CbVd-3 su pronađeni u Njemačkoj, Kini i Hrvatskoj, CbVd-4 u Njemačkoj, CbVd-5 u Kini, Indiji i Indoneziji dok je CbVd-6 nađen u Kini i Japanu (Jiang i sur., 2011b.; Tsushima i Sano, 2015b., Škorić i sur., 2015.).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Najbolje istraženi pripadnik roda *Coleviroid* je *Coleus blumei viroid 1* (CbVd-1) kod kojeg je dokazan prijenos mehaničkom inokulacijom, cijepljenjem i sjemenom na šarenu koprivu, te donekle istražen i krug domaćina koji je ograničen na samo nekoliko drugih vrsta porodice *Lamiaceae.* Dok je ovaj viroid rasprostranjen cijelim svijetom (Hadidi i sur., 2003.; Jiang i sur., 2011a.), za CbVd-3 se to ne može reći. Za sada je dokazana njegova prisutnost samo u Njemačkoj, Kini i Hrvatskoj (Jiang i sur., 2011b.; Škorić i sur., 2015.). U literaturi se gotovo podrazumijeva da su biološke značajke poput načina prijenosa i kruga domaćina iste za CbVd-3 kao i za CbVd-1, no to u stvari nije dokazano. Cilj mojeg diplomskog rada je bio potvrditi inficiranost prethodno istraživanih kultivara šarene koprive viroidom CbVd-3 te istražiti glavne molekularne i biološke značajke (krug domaćina, prijenos sjemenom, prijenos cijepljenjem) CbVd-3. Tijekom istraživanja bioloških značajki CbVd-3, kao dodatni metodološki cilj bila je postavljena optimizacija uvjeta elektroforetske analize viroidnih amplikona u agaroznim gelovima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Odabir pokusnih biljaka i uzorkovanje biljnog materijala

Tijekom rujna 2015. godine u Botaničkom vrtu PMF-a (Slika 4.a) prikupljeni su uzorci listova, reznica i sjemenki šarene koprive (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.), vjerojatno kultivara Aureole (Slika 4.b) što je određeno pomoću ključa na stranici http://www.coleusfinder.org/. Problem pri određivanju točnog kultivara šarene koprive je postojanje velike raznolikosti fenotipova pa je teško sa sigurnošću odrediti pravi kultivar no za ovo istraživanje točan kultivar nije bitan. Tijekom 2014. godine su bile sakupljene sjemenke istog kultivara šarene koprive i oni su uzgajani kao klijanci za testiranje (Slika 4.b-desno), a korištene su i prethodno istraživane stakleničke biljke šarene koprive zaražene s CbVd-3 i sa smjesom CbVd-1 i CbVd-3 (Slika 4.c i 4.e). Kao negativne kontrole korišteni su klijanci bezviroidne šarene koprive kultivara Aurora Black Cherry (Sjeme je ljubazno ustupio dr. Taro Tsushima, Hirosaki University, Japan.) (Slika 4.d). Dodatni izvor biljnog materijala za analizu su bili i transgenični korjenčići šarene koprive uzgojeni *in vitro* (Vuković i sur., 2013.) koji su nam ustupljeni sa Sveučilišta u Osijeku ljubaznošću prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica i dr. sc. Zorane Katanić.

Za istraživanje kruga domaćina coleviroida korištene su i druge biljke iz porodice *Lamiaceae* (*Ajuga reptans* L., *Ocimum basilicum* L., *Salvia hispanica* L. (Slika 4.e), *Nepeta faassenii* Bergmans ex Stearn i *Plectranthus forsterii* Benth.), a za mogućnost prijenosa viroida heterolognim cijepljenjem kao podloga za cijepljenje korišten je bosiljak (*Ocimum basilicum* L.).



Slika 4. Vrste biljaka koje su uzorkovane i analizirane: a) biljke šarene koprive u botaničkom vrtu, b) reznice (lijevo) i klijanci (desno) šarene koprive 'Aureole', c) staklenička šarena kopriva br. 6 (lijevo) inficirana s dva viroida (CbVd-1 i CbVd-3) i VN3 (desno) inficirana s CbVd-3, d) bezviroidna šarena kopriva 'Aurora Black Cherry', e) *Salvia hispanica* klijanci (desno) i biljka u cvatu (lijevo).



Slika 4. nastavak: Vrste biljaka koje su uzorkovane i analizirane: a) biljke šarene koprive u botaničkom vrtu, b) reznice (lijevo) i klijanci (desno) šarene koprive 'Aureole', c) staklenička šarena kopriva br. 6 (lijevo) inficirana s dva viroida (CbVd-1 i CbVd-3) i VN3 (desno) inficirana s CbVd-3, d) bezviroidna šarena kopriva 'Aurora Black Cherry', e) *Salvia hispanica* klijanci (desno) i biljka u cvatu (lijevo).

3.1.2. PUFERI I OTOPINE

3.1.2.1. Puferi i otopine za elektroforezu u agaroznom gelu

- 10x koncentrirani TBE-pufer (100 mM Tris, 100 mM H_3BO_3, 10 mM EDTA), Invitrogen, SAD, (pH 8,3)
- 10x koncentrirani SB-pufer (10 mM NaOH, podešeno na pH 8,0 sa bornom kiselinom)
- Agaroza (Sigma Chemical, SAD)
    - Mali gel agaroze (30 ml, 1,5%) priređen je otapanjem 0,45 g agaroze u 30 ml 1x TBE-pufera
    - Mali gel agaroze (30 ml, 1,8%) priređen je otapanjem 0,54 g agaroze u 30 ml 1x TBE-pufera
    - Mali gel agaroze (30 ml, 2%) priređen je otapanjem 0,9 g agaroze u 30 ml 1x TBE-pufera
- Otopina boje za nanošenje uzoraka, *6x Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific, SAD)

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

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

Ksilen-cijanol FF 0,03% (w/v)

Glicerol 60% (v/v)

EDTA (60 mM)

- Boja za vizualizaciju DNA u gelu GelStar Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, SAD)
- 0,3 µl na 30 ml agaroze

3.1.2.2. Puferi i otopine za sekvencijsku poliakrilamidnu gel-elektroforezu (sPAGE, Semancik, 1991.)

- 10x koncentrirani TAE-pufer (400 mM Tris, 200 mM $Na(CH_3COO) \cdot 3\ H_2O$, 10 mM Na EDTA, pH 7,2)
- 10x koncentrirani TAE- pufer (120 mM Tris, 60 mM $Na(CH_3COO) \cdot 3\ H_2O$, 3 mM Na EDTA, pH 6,5)
- 10x koncentrirani TBE-pufer (225 mM Tris, 225 mM H_3BO_3, 5 mM Na EDTA, pH 8,3)
- 60%-tni glicerol
- Etidij-bromid (ili etidijev bromid) 5 mg/ml
- Boja za praćenje elektroforeze: bromfenol-plavilo i ksilen-cijanol 0,3% u 60%-tnom glicerolu (Kemika, Hrvatska)
- Poliakrilamidni nativni gel (5%-tni, 30 ml)
  3,65 ml akrilamida (40%-tni, Merck, Njemačka)
  1,85 ml bis-akrilamida (2%-tni, Merck, Njemačka)
  10 ml 0,3x koncentrirani TAE-pufer, pH 7,2 (Invitrogen, SAD)
  11,5 ml deionizirane vode
  2,4 ml 2%-tnog TEMED-a (Fluka Chemie, Švicarska)
    - Otopljeno je 0,2 ml koncentrirane otopine TEMED-a u 10 ml deionizirane vode

  480 µl 10%-tni amonijev persulfat (APS, Fluka Chemie, Švicarska)
    - Otopljeno je 0,1 g APS-a u 1 ml deionizirane vode, držano na 4°C i potrošeno u roku od nekoliko dana
- Poliakrilamidni denaturirajući gel (5%-tni, 48,6 ml)
  21,6 g ureje
  5,91 ml akrilamida (40%-tni)

3,037 ml bis-akrilamida (2%-tni)

4,5 ml 10x koncentrirani TBE-pufer, pH 8,3 (Invitrogen, SAD)

9 ml deionizirane vode

3,75 ml 2%-tnog TEMED-a

- Otopljeno je 0,2 ml stock otopine TEMED-a u 10 ml deionizirane vode

750 μl 10%-tni APS

- Otopljeno je 0,1 g APS-a u 1 ml deionizirane vode, držano na 4°C i potrošeno u roku od nekoliko dana

- Bojanje srebrom

  Otopina za fiksiranje gela: 50% etanola i 10% octene kiselina (Kemika, Hrvatska)

  Otopina za ponovno rehidriranje gela: 10% etanola i 1% octene kiseline

  Otopina za bojanje gela: 12 mM $AgNO_3$ (Kemika, Hrvatska)

  Otopina za razvijanje boje: 0,75 M KOH i 0,28% HCHO (Kemika, Hrvatska)

  Otopina za zaustavljanje reakcije bojanja gela srebrom: 0,07 M Na_2CO_3 (Alkaloid, Makedonija)

3.1.3. STANDARDI ZA ODREĐIVANJE MOLEKULARNE MASE DNA

- ϕX174 DNA/BsuR1 (HaeIII) – Marker 9 (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Standard sadrži 10 fragmenata DNA dužine (u parovima baza) : 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72. Korišten je razrjeđen 5 puta.

- 50 bp DNA Ladder (New England Biolabs, SAD)

Standard sadrži 17 fragmenata DNA dužine (u parovima baza) : 1350, 916, 766, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50. Korišten je razrjeđen 5 puta.

3.1.4. KOMERCIJALNI KOMPLETI I KEMIKALIJE ZA IZOLACIJU NUKLEINSKIH KISELINA

3.1.4.1. Komercijalni komplet za izolaciju ukupne RNA iz biljnog tkiva TRIzol®-reagent

Kemikalije iz kompleta:

TRIzol®-reagens (Life Technologies, SAD)

Dodatne kemikalije:

- Kloroform (Kemika, Hrvatska)
- Izopropanol (Kemika, Hrvatska)
- 70%-tni etanol (Gram Mol, Hrvatska)
- Voda bez RNaza

3.1.4.2. Komercijalni komplet za izolaciju ukupne RNA iz biljnog tkiva Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit

Kemikalije iz kompleta (Qiagen, SAD):

- RLT-denaturacijski pufer (sadrži gvanidin-tiocijanat), prije uporabe dodano je 10 µl β-merkaptoetanola na 1 ml pufera
- RW1-pufer za ispiranje RNA vezane na membranu (sadrži gvanidin-tiocijanat)
- RPE-pufer (koncentrirani) za ispiranje RNA vezane na membranu (sadrži gvanidin-tiocijanat), za pripremu radne otopine dodano je 4 volumena 96% etanola

Dodatne kemikalije:

- 96% etanol
- β-merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, SAD)
- Voda bez RNaza

3.1.4.3. Ekstrakcija viroidne RNA iz 5 grama biljnog tkiva (Semancik, 1991.)

- EM-pufer (0,4 M Tris-HCl pH 8,9, 1% SDS, 5 mM EDTA pH 7, 4% merkaptoetanol)
- TKM-pufer (10 mM Tris, 10 mM KCl, 0,1 mM $MgCl_2$)
- 4 M LiCl (Fisher chemical, UK)
- 3 M natrij-acetat, pH 5,5 (Kemika, Hrvatska)
- Fenol pH 7,0 (uravnotežen natrij-hidroksidom, Acros organics, SAD)
- 96% etanol
- CF-11 celuloza (Sigma-Aldrich, SAD)
- 10x STE-pufer (1 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7,2)
- Crijeva za dijalizu (Sigma-Aldrich, SAD)

Kromatografija na celulozi CF-11

- CF-11 celuloza prah (Sigma-Aldrich, SAD)
- 10x STE-pufer (0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 M Tris-HCl, pH 7,2)
- 96% etanol
- 3 M natrij-acetat

3.1.5. Računalne analize nukleotidnih sljedova

Računalni programi za analizu dobivenih sekvenci :

- Sequencher™, verzija 4.7 (http://www.genecodes.com/) – za uređenje i sastavljanje neobrađenih sekvenci
- BLAST (Altschul i sur., 1990) – za pretraživanje baze podataka s pohranjenim sekvencama GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
- Clustal W (Larkin i sur., 2007.) – za sravnjenje sekvenci
- Mega7 (Kumar i sur., 2015.) – za određivanje filogenije između sekvenci

3.2. METODE

3.2.1. IZOLACIJA UKUPNIH RNA IZ BILJNOG TKIVA

Svi postupci centrifugiranja su provedeni u uređaju *Hettich D-78532* (Hettich-Zentrifugen, Njemačka) pri temperaturi od 4°C osim kod ekstrakcije RNA Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit-om koja je provedena na sobnoj temperaturi. Postupak ekstrakcije s hlapljivim štetnim tvarima je obavljen u digestoru.

3.2.1.1. Postupak s TRIzol®-reagensom

Ukupne RNA iz biljnog tkiva su u većini slučajeva izolirane i pročišćene pomoću TRIzol®-reagensa prema uputama proizvođača. Biološki uzorci se prvo liziraju i homogeniziraju u prisutnosti TRIzol®-reagensa. Reagens sadrži gvanidin-tiocijanat koji inaktivira RNaze čime se ujedno štiti RNA te uspješno lizira stanice i stanične komponente.

Sto mg biljnog tkiva u obliku biljnih diskova je uzeto s listova biljaka i usitnjeno plastičnim tučcima u 2 ml-Eppendorf-epruvetama u digestoru nakon dodatka tekućeg dušika. Zatim je u epruvete sa tkivom u prahu dodano 1 ml TRIzol®-reagensa i vorteksirano dok smjesa nije postala homogena. Nakon vorteksiranja epruvete su ostavljene na stolu na sobnoj temperaturi 5 minuta. Zatim je u epruvete dodano 0,2 ml kloroforma i vorteksirano 15 sekundi kako bi se dodatno razorila i izdvojila RNA od proteina. Epruvete su ostavljene na stolu na sobnoj temperaturi 2–3 minute. Stavljene su na centrifugiranje 15 minuta na 12 000 g. Preneseno je oko 0,5 ml gornje vodenaste faze koja sadrži RNA u novu 2 ml-epruvetu i dodano 0,5 ml izopropanola te vorteksirano dok smjesa nije postala homogena. Epruvete su ostavljene na stolu na sobnoj temperaturi 10 minuta. Epruvete su zatim centrifugirane10 minuta na 12 000 g. Pažljivo je maknut supernatant i na bijeli talog koji sadrži RNA dodano 1 ml hladnog 70% etanola kako bi se RNA isprala te su epruvete stavljene u centrifugu da se centrifugiraju 5 minuta na 7500 g. Supernatant je maknut i talozi RNA u epruvetama su ostavljeni na stolu da se suše na zraku ili pod lampom oko 30 minuta. Kada je sav etanol ispario talozi RNA su otopljeni u 50 µl destilirane vode uz resuspendiranje i povremeno grebanje dna epruvete plastičnim nastavkom od pipete.

3.2.1.2. Ekstrakcija RNA kompletom reagensa Qiagen® RNeasy Plant Mini Kit

Izolacija RNA iz biljnog tkiva pomoću kompleta je puno jednostavnija i sigurnija jer se ne koriste kemikalije poput kloroforma i fenola. Postupak traje oko 30 min i provodi se na sobnoj temperaturi. Ukupne RNA iz biljnog tkiva izolirane su i pročišćene pomoću kompleta kemikalija RNeasy Mini Kit (Qiagen, SAD) prema uputama proizvođača. Ova tehnologija se temelji na selektivnom vezanju RNA za jednu vrstu silikatne membrane što je omogućeno posebnim puferom visoke ionske jakosti. Biološki uzorci se prvo liziraju i homogeniziraju u prisutnosti denaturirajućeg pufera. Denaturirajući pufer sadrži gvanidin-tiocijanat koji inaktivira RNaze čime se ujedno štiti RNA. Uzorak se stavlja na RNeasy Mini-kolonu s membranom. Etanol se dodaje za postizanje odgovarajućih uvjeta za vezanje i ukupna RNA se veže za membranu dok se ostali stanični sastojci ispiru. Vezana RNA se nakon svega eluira sterilnom vodom.

Iz prikupljenih uzoraka odvagano je približno 100 mg tkiva listova. Tkivo je prebačeno u epruvete za centrifugiranje (2 ml) i uz dodatak tekućeg dušika usitnjeno u prah pomoću sterilnog plastičnog tučka. Nastalom homogenatu mikropipetom je dodano 450 µl RLT-pufera i snažno vorteksirano. Epruvete sa tkivom su inkubirane na 56°C 3 min. Lizati su prebačeni u QIAshredder kolone koje su stavljene unutar sabirne epruvete (2 ml) i centrifugirane 2 min pri 11 000 okretaja u minuti (rpm). Pažljivo je prebačen supernatant u nove epruvete za mikrocentrifugiranje (2 ml) te su samo ovi lizati dalje korišteni. Mikropipetom su izmjereni volumeni lizata i dodano im je pola volumena 96%-tnog etanola uz miješanje pipetiranjem. Lizati (oko 700 µl) su prebačeni u RNeasy kolone koje su stavljene unutar sabirnih epruveta. Poklopci su zatvoreni i epruvete su centrifugirane 15 s pri 11 000 rpm. Sadržaj koji je prošao kroz kolone (filtrat) je odbačen, a kolone su vračene u sabirne epruvete. Sada je u kolone dodano 700 µl RW1-pufera. Da bi se membrane isprale ponovno su centrifugirane 15 s pri 11 000 rpm i filtrati su odbačeni. Kolone su ponovno vračene u nove sabirne epruvete i na kolone je dodano 500 µl RPE-pufera za ispiranje membrana. Kolone su lagano zatvorene i stavljene u centrifugu 15 s pri 11 000 rpm. Kolone su opet vračene, dodano je 500 µl RPE-pufera i još jednom centrifugirano, ali ovaj put 2 min pri 11 000 rpm. Kolone su prebačene u sabirne epruvete (iz seta, 2 ml), odbačen je filtrat i centrifugirane su 1 min pri 11 000 rpm te je time završeno ispiranje nečistoća. Zatim su kolone stavljene u nove sabirne epruvete (1,5 ml) i izravno na membrane je dodano 50 µl vode bez RNaza. Kolone su pažljivo zatvorene i centrifugirane 1

min pri 11 000 rpm kako bi se isprala RNA sa kolona. Ponovljen je korak elucije uzoraka s kolone s istih 50 µl vode da se poveća prinos RNA.

3.2.1.3. Ekstrakcija RNA iz 5 grama biljnog tkiva

Ekstrakcijom iz 5 grama biljnog tkiva (Semancik, 1991.) dobivamo veću količinu malih molekula RNA koja ne samo da je čišća nego i obogaćena prstenastim jednolančanima RNA i time pogodnija za daljnju analizu. Najbolje rezultate daju zeljaste biljke zbog lake homogenizacije tkiva tekućim dušikom. Velika prednost ovog postupka je dijaliza uzorka preko noći koja iz uzorka ukloni sve pigmente i nečistoće koje smetaju pri analizi viroidne RNA. U ovaj postupak ekstrakcije spada i kromatografija pa nije odijeljena u posebno poglavlje.

U digestoru je u prethodno ohlađenim tarionicima usitnjeno biljno tkivo uz pomoć tučka i tekućeg dušika. Na usitnjeno biljno tkivo u prahu je dodano 3 ml EM-pufera i ostavljeno da se tkivo razmoči da ga je lakše prebaciti u veće (30 ml) plastične epruvete za centrifugiranje. Nakon što se tkivo dovoljno razmočilo dodano je 3 ml EM-pufera i 18 ml fenola. Homogenizirana smjesa tkiva, fenola i EM-pufera je dobro vorteksirana (oko 1 min). Epruvete sa uzorcima su stavljene na centrifugiranje 20 minuta na 12 000 g. Poslije centrifugiranja u epruvetama se nalazi vodena faza koji je djelomično obojana pigmentima iz listova, kruta međufaza s ostacima biljnog tkiva i denaturiranim proteinima, te faza organskog otapala na dnu koja je jako tamna. Pažljivo je pipetom uzeta i izmjerena vodena faza i prebačena u novu epruvetu te je dodano 1/10 volumena 3 M natrij-acetata i 3 volumena 96%-tnog etanola te su epruvete stavljene barem 30 min na -20°C. Zatim su epruvete centrifugirane 20 minuta na 12 000 g. Supernatant je uklonjen i talozi u kojima se nalaze nukleinske kiseline stavljene su da se suše u digestoru dok nije nestao miris etanola. Zatim su talozi otopljeni u 1 ml 1x TKM-pufera te su dobro resuspendirani. Dok su se uzorci sušili pripremljena su crijeva za dijalizu močenjem u 1x TKM-puferu. Crijevo je zavezano na jednom kraju i pipetom je prebačen uzorak iz epruvete u crijevo te je drugi kraj crijeva zavezan tako da je dio crijeva sa uzorkom bio napuhnut zrakom. U veliku tikvicu napunjenu litrom 1x TKM-pufera su ubačena crijeva i prebačena na magnetsku miješalicu u hladnjak preko noći. Sljedeće jutro je pročišćenim uzorcima iz celuloznih crijeva izmjeren volumen mikropipetom i prebačeni su u nove epruvete te im je dodan jednak volumen 4 M LiCl i stavljeni su 4 sata na 4°C radi selektivne precipitacije nukleinskih kiselina. Nakon 4 sata epruvete s uzorcima su centrifugirane 20 minuta na 12 000 g. Supernatant koji sadržava jednolančane DNA, 4S RNA, 5S RNA, dsRNA i viroidne RNA je prebačen u novu epruvetu i dodana su 3 volumena 96%-tnog etanola te su epruvete ostavljene

na -20°C 30 minuta. Ohlađeni uzorci su stavljeni na centrifugiranje 20 minuta na 12 000 g. Bačen je supernatant i talozi koji sadržavaju RNA su stavljeni u digestor da se osuše dok ne ispari miris etanola, a potom su otopljeni u 1 ml 1x TKM-pufera uz dobro resuspendiranje.

- **Kromatografija na celulozi CF-11**

Kromatografija na stupcu celuloze koristi se kako bi se maknule DNA i pigmenti iz otopljenog taloga u kojem se nalaze viroidne RNA. Dodatno se pročišćava uzorak, a selekcijom uvjeta dobiva se viroidna RNA uz primjese 4S, 5S i 7S RNA. Bazira se na principu selektivnog vezanja RNA za celulozu pri različitim koncentracijama etanola. To omogućava „zarobljavanje" velike količine viroidne RNA i njeno eluiranje odgovarajućom koncentracijom etanola.

Pripremljene su borsilikatne kromatografske kolone (BioRad, SAD) tako što je u njih ulivena otopina celuloze CF-11 sa 35%-tnim etanolom u STE-puferu. Nakon što se slegla celuloza pripremljeni su uzorci dodavanjem etanola tako da bude 35% etanola u uzorku. Tako pripremljeni uzorak je nanesen na kolonu sterilnom jednokratnom Pasteurovom pipetom od 3 ml te nakon što je sav uzorak ušao u kolonu ista je isprana s 3 volumena prazne kolone 30%-tnim etanolom u STE-puferu pri čemu se s kolone isprala većina pigmentata. Zatim su promijenjeni uvjeti u koloni dodatkom čistog STE-pufera. Nakon što je sav STE-pufer prošao kroz kolonu, nukleinske kiseline su eluirane sa 800 µl 1x STE-pufera bez etanola. Eluati su skupljeni u plastične epruvete u kojima je pripremljen 1 ml 96%-tnog etanola i 300 µl natrij acetata. Epruvete su stavljene na -20°C 30 min. Ohlađene epruvete su centrifugirane 20 min na 12 000 g pri 4°C. Supernatant je bačen i talozi su osušeni u digestoru dok se nije maknuo miris etanola te su peleti resuspendirani u 200 µl 1x TKM-pufera.

3.2.2. SEKVENCIJSKA POLIAKRILAMIDNA GEL-ELEKTROFOREZA (sPAGE)

Optimalna rezolucija viroidne RNA postiže se sekvencijskom poliakrilamidnom gel-elektroforezom (sPAGE). Ova procedura (Semancik, 1991.) se bazira na jedinstvenim značajkama jednolančane prstenaste molekule viroida koja se smješta na određenoj visini u gelu. U nativnom gelu dolazi do razdvajanja domaćinske DNA, RNA i viroidne RNA na temelju njihove elektroforetske pokretljivosti koja ponajviše ovisi o veličini molekule. Kako se izrezan komad nativnog gela (pH 6,5) s ciljnim molekulama stavlja u kontakt s denaturirajućim gelom koji sadržava ureju (pH 8,3) u drugoj elektroforezi, dolazi do otvaranja kružnih molekula

i njihovog zaostajanja u gelu u odnosu na linearne molekule iste duljine. Nakon bojanja denaturirajućeg gela srebrom, ovom metodom možemo vizualizirati razne nove vrste viroida. Uz to je i smanjeno pozadinsko obojenje od domaćinskih nukleinskih kiselina što omogućava izolaciju čistih viroidnih RNA ukoliko se gel boja etidij-bromidom.

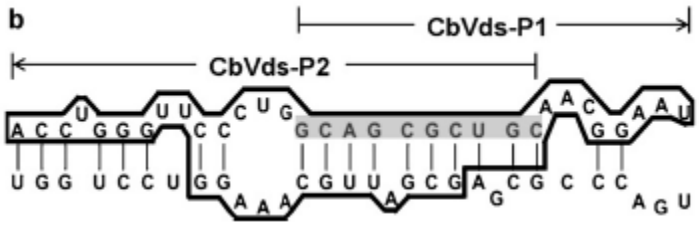
Nakon što je složena aparatura za elektroforezu, priređen je nativni 5%-tni gel tako da su pomiješane kemikalije po navedenom receptu za nativni gel i izlivene u kalup te je postavljen češljić. Kada je gel polimerizirao izvađen je češljić (promjera 0,75 cm), postavljen kalup promjera stakala 18 cm x 15 cm u kadicu za elektroforezu (*SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical Unit, GE Healthcare Life Sciences*, Njemačka) i kadica je napunjena sa 1x TAE-puferom, pH 7,2. Naneseno je 30 µl uzorka koji su prethodno pomiješani sa 60%-tnim glicerolom (25 µl uzorka i 8 µl 60%-tnog glicerola) u jažicu uz koje je nanesena i boja bromfenol-blue u prvu i zadnju jažicu gela za lakše praćenje elektroforeze. Pokrenuta je elektroforeza na 50 mA pri 4°C i provođena je sve dok bromfenol-plavilo nije bio 8 cm, a ksilen-cijanol 4 cm od gornjeg ruba gela. Zaustavljena je elektroforeza i gel je stavljen u otopinu etidij-bromida na 15 minuta. Gel je pogledan na UV-transluminatoru (*Syngene GVM20*, UK) i izrezala dio gela između visine 7S RNA i 5S RNA te je taj gel prenesen na prethodno pripremljen denaturacijski gel (promjer češljića 1,5 cm i dimenzije stakala 18 cm x 15 cm) po prethodno navedenom receptu. U kuteve gela nasena je boja ksilen-cijanol kako bi se pratio tijek elektroforeze. Pokrenuta je elektroforezu na 50 mA pri sobnoj temperaturi i provođena je sve dok ksilen-cijanol nije bio 1 cm od donjeg ruba gela.

3.2.3 BOJANJE POLIAKRILAMIDNOG GELA SREBROM

Postupak bojanja srebrom je rađen prema protokolu Igloi (1983). Denaturacijski gel je stavljen u otopinu 50%-tnog etanola i 10%-tne octene kiseline uz lagano protresivanje preko noći. Sljedeće jutro gel je izvađen i stavljen u prethodno pripremljenu otopinu 10%-nog etanola i 1%-tne octene kiseline uz lagano protresivanje do jednog sata. Zatim je gel izvađen i stavljen u otopinu za bojanje do jednog sata uz lagano protresivanje. Nakon jednog sata gel je temeljito ispran destiliranom vodom i stavljen u otopinu za razvijanje boje dok nisu uočene pruge u gelu. Kada su se pojavile pruge dodana je destilirana voda kako bi se zaustavilo razvijanje. Aternativno, otopinu za razvijač se može neutralizirati s otopinom za zaustavljanje bojenja i gel je slikan na bijelom transiluminatoru (*CL-5000L*, Cole Parmer, SAD).

3.2.4. UMNAŽANJE VIROIDA REVERZNOM TRANSKRIPCIJOM I LANČANOM REAKCIJOM POLIMERAZE

Viroidni genom umnožen je izravno iz izolirane smjese ukupne RNA metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR). Za sintezu komplementarne DNA (cDNA) i za PCR-reakciju sa cDNA kao kalupom korištene su univerzalne početnice (CbVd-P1 i CbVd-P2, CbVd-F i CbVd-R) dizajnirane prema sekvenci CCR poznatih *Coleviroida* (Jiang i sur., 2011b.; Hou i sur., 2008.) (Slika 5.) i početnice specifične za *Coleus blumei viroid 3* (CbVd-3 PF i CbVd-3 PR) koje su usmjerene na desnu terminalnu regiju (Jiang i sur., 2011a.).



Slika 5. Generičke početnice CbVds-P1 i CbVd-P2 za rod *Coleviroid* korištene u postupku detekcije viroida metodom RT-PCR (Jiang i sur., 2011b.).

Sastojke reakcijske smjese za sintezu cDNA prije upotrebe se kratko vorteksira i drži na ledu. Sastav reakcijske smjese s dodanim kalupom prikazan je u Tablici 2. Za sintezu cDNA najčešće je korištena početnica CbVd-P2 (5'-GCAGCGCTGCCAGGGAACCCAGGT-3') komplementarna dijelu slijeda gornjeg lanca CCR pripadnika roda *Coleviroid* (Jiang i sur., 2011b.) ili vrlo sličnu CbVd-R (5'-CGCTGCCAGGGAACCCAGGT-3') isto komplementarnu CCR regiji svih poznatih coleviroida (Hou i sur., 2008.). Za sintezu cDNA samo CbVd-3, korištena je CbVd-3 PR (5'-TGGGTACCCGCGAAGAGC-3') komplementarna lijevoj terminalnoj regiji *Coleus blumei viroida 3* (Jiang i sur., 2011a.).

Tablica 2. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju (za 1 uzorak).

SASTOJAK	VOLUMEN
10x reakcijski pufer	1 µl
Smjesa dNTP-a (10 Mm, Thermo Fisher Scientific, SAD)	1 µl
CbVd-P2 ili CbVd-R ili CbVd-3 PR početnica (20 pmol)	1 µl
M-MLV reverzna transkriptaza (200 U/µl, Promega, SAD)	1 µl
inhibitor RNaza (40 U/µl, Thermo Fisher Scientific, SAD)	0,2 µl
$MgCl_2$ (25 mM, Thermo Fisher Scientific, SAD)	1 µl
sterilna voda za PCR (bez nukleaza)	3,8 µl
UKUPNO	**9 µl**

U epruvete za PCR dodano je 9 µl reakcijske smjese i 1 µl RNA-kalupa. Kao pozitivna kontrola poslužila je RNA od prije izoliranog viroida (CbVd-1 ili CbVd-3) iz roda *Coleviroid*. Negativna kontrola (kontrola kontaminacije) bila je sterilna voda bez kalupa. Prije inkubacije, završne smjese su lagano vorteksirane i kratko centrifugirane u stolnoj mikrocentrifugi. Smjese su inkubirane 60 min na 42°C i 5 min na 98°C (program CbVdsRT) u uređaju *GeneAMP® 2720 Thermal Cycler* (Applied Biosystems, SAD). Nakon završene reverzne transkripcije epruvete su stavljene na led.

Nakon reverzne transkripcije, 1 µl dobivene otopine cDNA pomiješan je u novim epruvetama s reakcijskom smjesom za PCR sastava prikazanog u Tablici 3. Za umnažanje su korištene generičke početnice :

CbVd-P1 : 5'-GCAGCGCTGCAACGGAAT-3' i
CbVd-P2 : 5'-GCAGCGCTGCCAGGGAACCCAGGT-3' (Jiang i sur., 2011b.),

CbVd-3 PF: 5’-CGGGTACCCAGCAACCTGCT-3’ i
CbVd-3 PR: 5’-TGGGTACCCGCGAAGAGC-3’ (Jiang i sur., 2011a.),

i specifične početnice za CbVd-3:

CbVd-F: CbVd F 5'-GCTGCAACGGAATYCAGKGC-3' i
CbVd R: 5'-CGCTGCCAGGGAACCCAGGT-3' (Hou i sur., 2008.).

Tablica 3. Reakcijska smjesa za PCR-umnažanje viroidne cDNA (za 1 uzorak).

SASTOJAK	VOLUMEN
10x reakcijski pufer (Thermo Fisher Scientific, SAD)	2 µl
$MgCl_2$ (25 mM, Thermo Fisher Scientific, SAD)	1,6 µl
dNTP mix (10mM, Thermo Fisher Scientific, SAD)	2 µl
početnica CbVd-P1 ili CbVd-F ili CbVd-3 PF (20 pmol)	0,2 µl
početnica CbVd-P2 ili CbVd-R ili CbVd-3 PR (20 pmol)	0,2 µl
Taq-DNA-polimeraza (5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, SAD)	0,4 µl
sterilna voda	12,6 µl
UKUPNO	**19 µl**

Pozitivna kontrola je bila cDNA viroida CbVd-1 ili CbVd-3 prethodno izoliranog u laboratoriju, a negativna kontrola (kontrola kontaminacije reakcije) je bila sterilna voda. cDNA je umnožena kroz 30 ciklusa na sljedeći način: početna denaturacija DNA se odvijala 5 min na 94°C nakon čega su slijedili ciklusi umnažanja termostabilnom polimerazom (Thermo Fisher Scientific, SAD); denaturacija lanaca 30 s na 94°C, vezanje početnica na kalup 30 s na 63°C,

produljenje lanaca 30 s na 72°C; te završno produljenje lanaca u trajanju od 10 min. Na kraju reakcije smjesa je ohlađena na 16°C.

Optimizacija PCR-reakcije

Optimizacija koncentracije $MgCl_2$ u PCR-reakciji gdje su korištene generičke početnice za coleviroide CbVd-R (20 pmol) i CbVd-F (20 pmol) (Hou i sur., 2008.). Koncentracije svih sastojaka u PCR smjesi su kao u priloženoj tablici (Tablica 3.) dok su konačne koncentracije $MgCl_2$ u PCR smjesi bile: 1 mM, 1,5 mM i 2 mM. Volumen dodanog $MgCl_2$ je izračunat prema željenim konačnim koncentracijama $MgCl_2$ u 20 µl PCR smjese.

3.2.5. ANALIZA UMNOŽENE DNA ELEKTROFOREZOM U AGAROZNOM GELU

Produkti RT-PCR reakcija su vizualizirani elektroforezom u agaroznom gelu koncentracija: 1,5%, 1,8% i 2% (prema Ambriović-Ristov i sur., 2007.). Gelovi su pripremljeni dodavanjem 450 mg agaroze i 30 ml 1x TBE ili 1x SB-pufera za 1,5%-tni gel, za 1,8%-tni gel korišteno je 540 mg agaroze i 30 ml 1x TBE ili 1x SB-pufera i za 2%-tni gel korišteno je 600 mg agaroze i 30 ml 1x TBE ili 1x SB-pufera te je agaroza otapana u mikrovalnoj pećnici (prema Brody i sur., 2004.; Brody i Kern, 2004.).

Za detekciju nukleinskih kiselina korištena je GelStar Nucleic Acid Gel Stain po principu 0,3 µl GelStar Nucleic Acid Gel Stain na 30 ml agaroznog gela koji je dodan nakon kuhanja agaroze (prema uputama proizvođača).

U jažice gela naneseno je 5 µl uzorka i 1 µl boje (*6x Loading Dye buffer*, razrijeđene 5x) za nanošenje uzorka na gel. U prvu jažicu stavljeno je 5 µl standarda (0,1 µg/µl) za određivanje molekularne mase DNA i 1 µl boje. Elektroforeza se odvijala u 1x TBE-puferu i zaustavljena je kada je bromfenol-plavilo prešlo 2/3 duljine gela (prema Ambriović-Ristov i sur., 2007.).

Po završetku elektroforeze gelove su prebačeni na UV-transiluminator (*Syngene GVM20*, UK) i fotografirani pomoću sustava EOS Utility-Canon. Boja GelStar vezana na DNA fluorescira nakon što je obasjana UV-svjetlom. Digitalna fotografija je prema potrebi obrađivana u programu GIMP (*GNU Image Manipulation Program*) za obradu slika.

3.2.6. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE RNA

Koncentracije RNA u ekstraktima određivane su spektrofotometrijski na uređaju *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific Inc., SAD). Metoda se temelji na mjerenju apsorpcije svjetlosti u karakterističnom UV-dijelu spektra. Za mjerenje je korišteno 1,5 µl uzorka i obraćena je pozornost na izgled krivulje. Purinske i pirimidinske baze DNA imaju apsorpcijske maksimume pri ovoj valnoj duljini pri čemu se iz vrijednosti A_{260} računa koncentracija. Uređaj automatski mjeri i čistoću uzorka računanjem omjera apsorbancija pri 260, 280 i 230 nm. Za čistu RNA omjer A_{260}/A_{280} je oko 2,0 (Sambrook i Russell, 2001).

3.2.7. NACJEPLJIVANJE ŠARENE KOPRIVE NA BOSILJAK

Izdanci šarene koprive visine oko 1 cm otkinuti su s originalnih biljaka i nacijepljeni na mjesec dana stare bosiljke metodom engleske kopulacije – povezivanjem podloge i plemke u obliku slova Y (Nelson, 2007). Biljke šarene koprive koje su uzete za cijepljenje su bile: biljka iz staklenika oznake VN3 koja je zaražena sa CbVd-3, nezaražena biljka iz staklenika i biljka iz staklenika oznake 6 koja je zaražena sa CbVd-1 i CbVd-3. Nacijepljeno je 5 bosiljaka oznaka: B1-nacjepljena biljka VN3, B2- nacijepljena biljka VN3, B3- nacijepljena biljka VN3, B4- nacijepljena nezaražena biljka i B5- nacijepljena biljka 6.

3.2.8. SEKVENCIRANJE VIROIDNIH GENOMA

Izabrani su najzanimljiviji uzorci korjenčića šarene koprive i *Salvia hispanica* nakon provedene gel elektroforeze. Program PCR-postupka prikazan je u Tablici 4. i 5. Koncentracija produkta u deioniziranoj vodi je bila 20 ng/µl, a u zasebnoj epruveti priređeno je 30 µl homolognih i komplementarnih početnica koncentracije 60 ng/µl. Uzorci su poslala u tvrtku Macrogen Inc. (Seoul, J. Koreja) gdje je obavljeno standardno sekvenciranje.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za umnažanje kalupa za sekvenciranje (za 1 uzorak).

SASTOJAK	VOLUMEN
10x reakcijski pufer (Thermo Fisher Scientific, SAD)	12 µl
$MgCl_2$ (25 mM, Thermo Fisher Scientific, SAD)	4,8 µl
dNTP mix (10 mM, Thermo Fisher Scientific, SAD)	6 µl
početnica CbVd-P1 (20 pmol)	0,6 µl
početnica CbVd-P2 (20 pmol)	0,6 µl
Taq-DNA-polimeraza (5 U/µl, Thermo Fisher Scientific, SAD)	1,2 µl
deionizirana voda	31,8 µl
UKUPNO	**60 µl**

Tablica 5. Program PCR reakcije za pripremu kalupa za sekvenciranje.

IZMJENA CIKLUSA	VRIJEME/TEMPERATURA	OPIS KORAKA
1 CIKLUS	5 min / 94°C	početna denaturacija DNA
30 CIKLUSA	30 s / 94°C	denaturacija DNA
	30 s / 63°C	vezanje početnica za jednolančani kalup
	30 s / 72°C	produljenje lanaca Taq polimerazom
1 CIKLUS	5 min / 72°C	završno produljenje lanaca

3.2.9. ANALIZA SEKVENCI

Dobivene neobrađene sekvence uređene su pomoću programa SequencherTM 5.4.3 (http://www.genecodes.com/) (Gene Codes Corporation, SAD). Srodne sekvence su pronađene u bazi podataka GenBank korištenjem programa BLAST (Altschul i sur., 1990). Sekvence su sravnjene programom Clustal W (Larkin i sur., 2007.). Programom Mega7 (Kumar i sur., 2015.) im je određivana filogenija.

4. REZULTATI

4.1. Potencijalne domaćinske biljke u kojima je istraživana prisutnost coleviroida

Kako je prije dokazana prisutnost CbVd-1 u biljkama *Ocimum sanctum* L., *Mentha spicata* L., *Mentha arvensis* var. *piperascens* Malinv. ex L. H. Bailey, *Ocimum basilicum* L. i *Mentha officinalis* L. (Singh i sur., 2003.) koje pripadaju porodici *Lamiaceae*, tako su i u ovom radu odabrane neke dostupne biljke porodice *Lamiaceae* i testirane na prisutnost CbVd-3, odnosno coleviroida. Razlog odabira ovih biljaka je bila i neistraženost infekcija coleviroidima, kao u slučaju vrsta *Salvia hispanica, S. hians, Ajuga reptans, Nepeta faassenii i Plectranthus forsterii*.

Tablica 6. Popis uzoraka biljaka iz kojih su različitim metodama izolirane viroidne RNA. Uzorci šarene koprive *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. su u tablici označeni imenom *Coleus blumei* ili *C. blumei* zbog jednostavnosti.

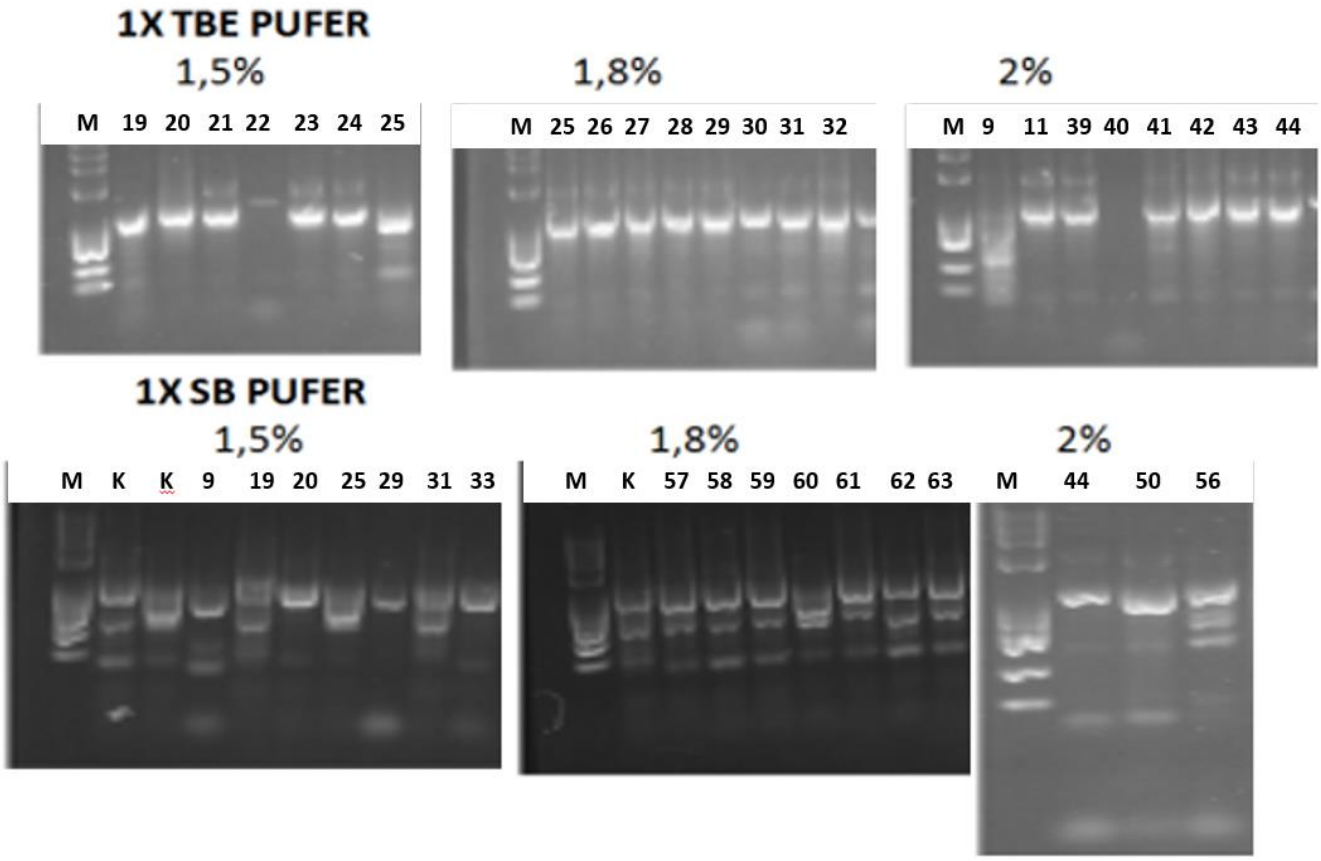
LAB. OZNAKA	BILJNA VRSTA	METODA EKSTRAKCIJE VIROIDA
1-11	*Salvia hispanica* - klijanac (sjemenke kupljene u trgovačkom lancu Spar)	Trizol®
12	*Coleus blumei* - reznica 'Aureole' iz 2015.	
13-23	*C. blumei* - klijanac 'Aureole' iz 2015.	
24	*C. blumei* - reznica 'Aureole' iz 2015.	
25-37	*S. hispanica* – klijanac	
38	*C. blumei* – reznice biljke VN3 zaražene sa CbVd-3	
39-55	*S. hispanica* – klijanac	
56	*C. blumei* – reznica biljke VN3 zaražene s CbVd-3	
57-59	*C. blumei* 'Aurora Black Cherry' (bezviroidna)	
60	*C. blumei* - reznica 'Aureole' iz 2015.	
61-62	*C. blumei* - klijanac 'Aureole' iz 2015.	
63	*C. blumei* – klijanac 'Aureole' iz 2014. (fenotipski varijabilna - cijela biljka zelena)	
64-66	*C. blumei* – klijanac 'Aureole' iz 2014.	
67, 69-74	*C. blumei* - reznica 'Aureole iz 2015.	
68	*C. blumei* - reznica cv Aureole iz 2014.	
1^	*C. blumei* - korjenčići linije 05 crypt +	
2^-3^	*C. blumei* - korjenčići linije 03 crypt +	
4^-5^	*C. blumei* - korjenčići linije 06 crypt +	
6^	*C. blumei* 'Aurora Black Cherry' (bezviroidna)	
7^	*C. blumei* 6 (CbVd-1 + CbVd-3 kontrola)	
8^	*C. blumei* – reznica VN3 zaražene s CbVd-3	
1*	*Salvia hians*	
2*	*Ocimum basilicum*	
3*	*Ajuga reptans 'Multicolor'*	
4*	*Nepeta faassenii 'Snowflake'*	

Tablica 6. nastavak: Popis uzoraka biljaka iz kojih su različitim metodama izolirane viroidne RNA. Uzorci šarene koprive *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. su u tablici označeni imenom *Coleus blumei* ili *C. blumei* zbog jednostavnosti.

LAB. OZNAKA	BILJNA VRSTA	METODA EKSTRAKCIJE VIROIDA
5*	*Plectranthus forsterii 'Marginatus'*	Trizol®
6*	*C. blumei*	
7*	*C. blumei*	
1'	*Ajuga reptans 'Multicolor'*, smrznuto tkivo 15.6.2015.	Ekstrakcija iz 5 g tkiva, (Semancik, 1991.)
2'	*O. basilicum*, smrznuto tkivo 15.6.2015.	
3'	*Plectranthus forsterii 'Marginatus'*, smrznuto tkivo 15.6.2015.	
4'	*C. blumei* 6 – staklenik, reznica (CbVd-1 + CbVd-3)	
5'	*C. blumei* VN3 (zaražen s CbVd-3)	
6'	*C. blumei* 'Aurora Black Cherry' (bezviroidna)	
7'	*C. blumei* - korjenčići linije 03 crypt +	
8'	*S. hispanica* klijanac, pretpostavljeno bezviroidna, smrznuto tkivo 9.6.2016. (uzorci 1, 45 i 47)	
9'	*S. hispanica* klijanac, pretpostavljno da je zaražena viroidom, smrznuto tkivo 9.6.2016. (uzorci 9, 25 i 44)	
10'	*Vitis vinifera* sa simptomima *Grapevine yellow speckle viroida* (Agronomski fakultet), smrznuto tkivo 8.7.2015.	
11'	*Solanum lycopersicum*, zaražen s PSTVd, smrznuto tkivo 3.1.2011.	
12'	*S. lycopersicum*, nezaraženo tkivo, smrznuto 3.1.2011.	
1!	*Plectrantus forsterii* 'Marginatus'- Botanički vrt	
2!	*O. basilicum* cijepljeni B1	
3!	*C. blumei* 6 – staklenik, reznica (CbVd-1 + CbVd-3)	
4!	*C. blumei* VN3 zaražen sa CbVd-3 iz staklenika	
5!	*C. blumei* VN3 (zaražen sa CbVd-3)	
6!	*C. blumei* 'Aurora Black Cherry' (bezviroidna)	

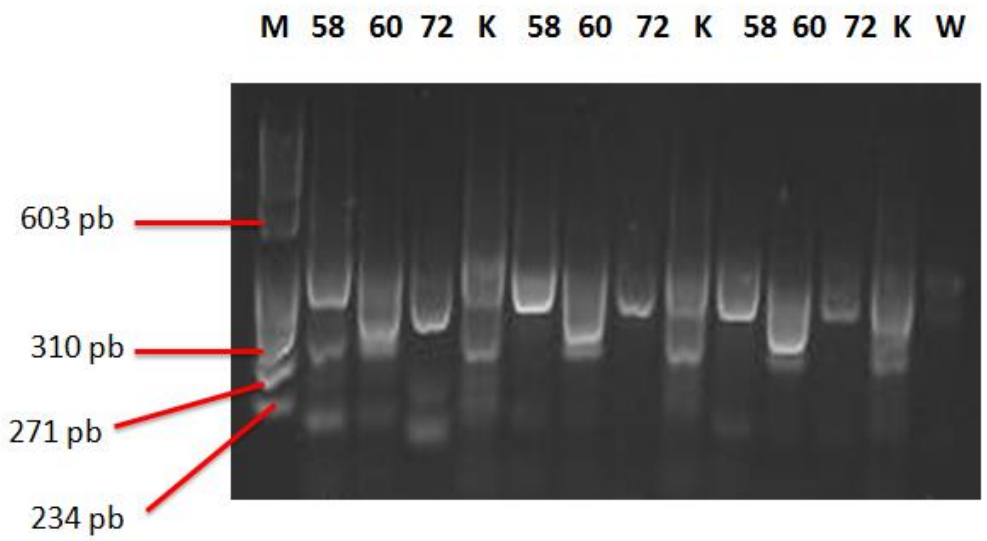
4.2. Elektroforeza amplikona u agaroznom gelu

Tijekom istraživanja provedena je i usporedba agaroznih gel elektroforeza u 1x TBE-puferu i 1x SB-puferu pri koncentraciji agaroze 1,5%, 1,8% i 2%. Vidljiva je bolja ravnina pruga u 1x TBE-puferu i njihova bolja razlučivost. U elektroforezi sa 1x SB-puferom dolazi do „gužvanja“ pruga i manja je njihova razlučivost (Slika 6.).



Slika 6. Usporedba elektroforetskih analiza amplikona coleviroida u agaroznim gelovima (brojevi iznad gelova odgovaraju uzorcima u Tablici 6.) s 1x TBE i 1x SB-puferom. Postotci agaroze od 1,5%, 1,8% i 2% bili su istraženi s oba pufera. M - marker 9, K – pozitivna kontrola koja sadržava CbVd-1 i CbVd-3.

Optimizacija koncentracije $MgCl_2$ u PCR-reakciji s generičkim početnicama za coleviroide CbVd-R (20 pmol) i CbVd-F (20 pmol) pri koncentracijama $MgCl_2$ od 1 mM, 1,5 mM i 2 mM. Rezultat je podjednako dobar pri koncentracijma magnezij-klorida od 1,5 i 2 mM. Radi zadovoljavajuće efikasnosti i specifičnosti amplifikacije uzeta je koncentracija $MgCl_2$ od 1,5 mM kao koncentracija za daljnje PCR reakcije (Slika 7.).



Slika 7. Optimizacija koncentracije $MgCl_2$ u reakcijama RT-PCR-a (brojevi iznad slike odgovaraju uzorcima u Tablici 6.). Konačne koncentracije $MgCl_2$ u prvoj skupini uzoraka su bile 1 mM, u drugoj 1,5 mM, a u trećoj 2 mM. M - marker 9, K – pozitivna kontrola koja sadržava CbVd-3, W-negativna kontrola.

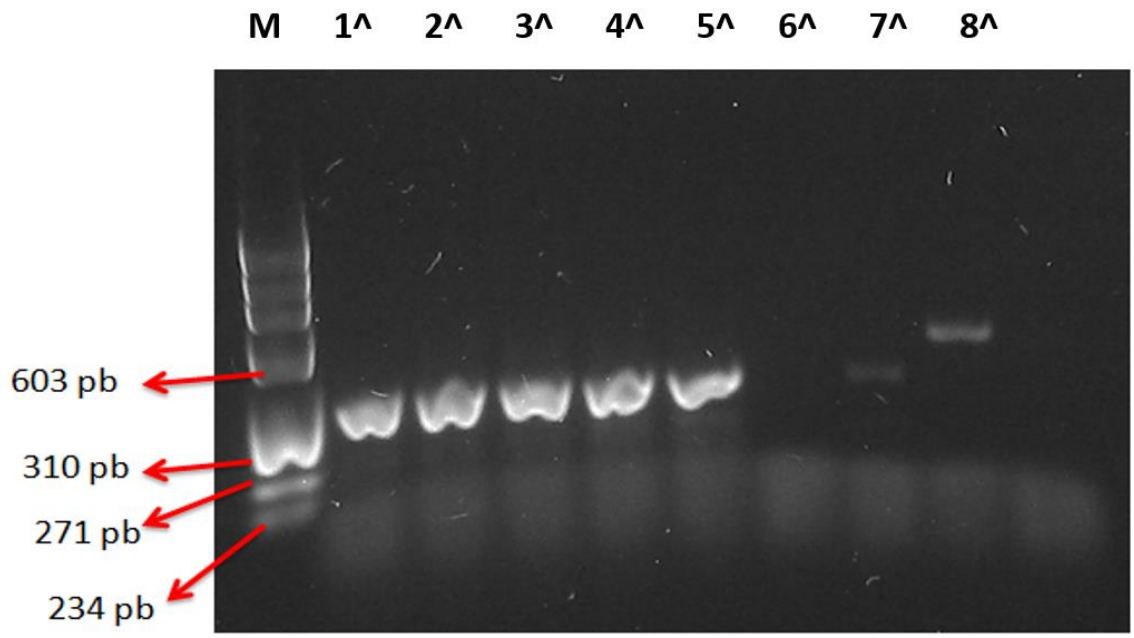
Tablica 7. Analiza ekstrahiranih uzoraka metodom RT-PCR u svrhu detekcije coleviroida uz primjenu generičkih početnica CbVd-P1/P2 (Jiang i sur., 2011b.) i/ili CbVd-R/F (Hou i sur., 2008.). Oznake +/- se odnose na rezultate RT-PCR-a sa prethodno navedenim generičkim početnicama za coleviroide.

LAB. OZNAKA	REZULTAT RT-PCR-a	NAPOMENE
1-8	-	
9	+	Sekvencirano - velika podudarnost sekvence sa CbVd-1.
10	-	
11-12	+	
13	-	
14-15	+	
16-17	-	
18	+	
19	+	Sekvencirano - heterogenost sekvenci prevelika. Testirano i sa specifičnim primerima za CbVd-3 - negativno.
20-21	+	Sekvencirano - heterogenost sekvenci prevelika.
22	-	
23-25	+	Sekvencirano - heterogenost sekvenci prevelika.
26-28	+	
29	+	Sekvencirano - heterogenost sekvenci prevelika.
30	+	
31	+	Sekvencirano - heterogenost sekvenci prevelika.
32-34	+	
35	-	
36	+	
37	-	
38	+	Testirano i sa specifičnim primerima za CbVd-3 - negativno.

Tablica 7. nastavak: Analiza ekstrahiranih uzoraka metodom RT-PCR u svrhu detekcije coleviroida uz primjenu generičkih početnica CbVd-P1/P2 (Jiang i sur., 2011b.) i/ili CbVd-R/F (Hou i sur., 2008.). Oznake +/- se odnose na rezultate RT-PCR-a sa prethodno navedenim generičkim početnicama za coleviroide.

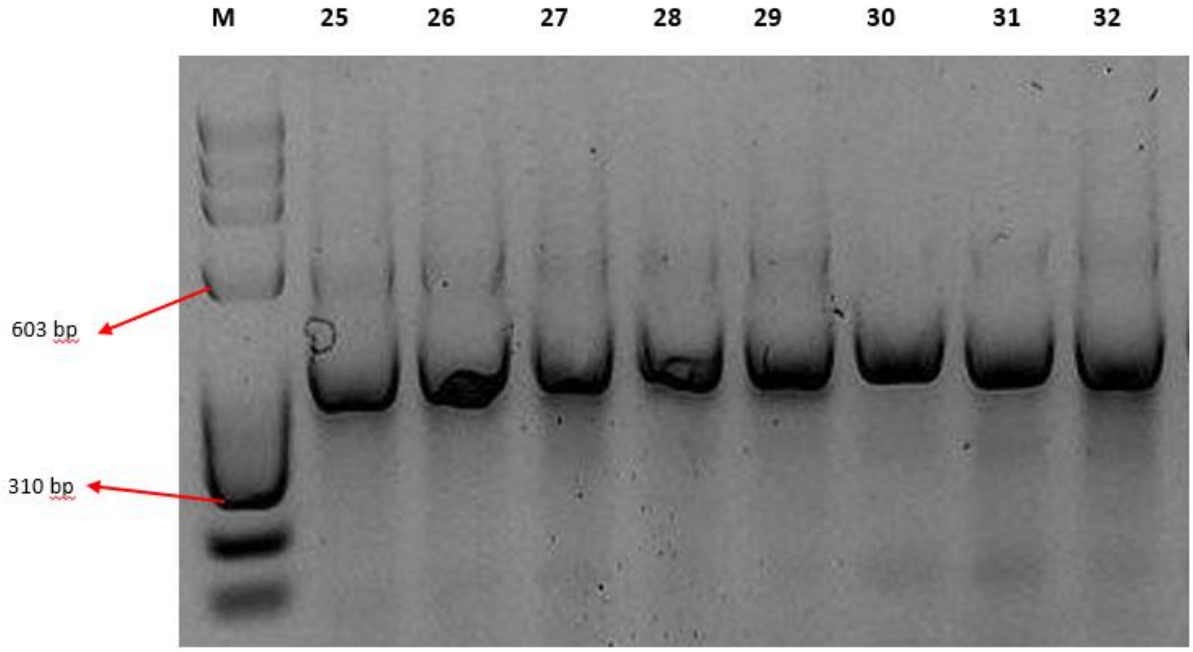
LAB. OZNAKA	REZULTAT RT-PCR-a	NAPOMENE
39	-	
40-43	+	
44	+	Sekvencirano - heterogenost sekvenci prevelika.
45-48	-	
49	+	
50	+	Sekvencirano - heterogenost sekvenci prevelika.
51-59	+	
60	+	Testirano i sa specifičnim primerima za CbVd-3 - negativno.
61-67	+	
68-73	+	Testirano i sa specifičnim primerima za CbVd-3 - negativno.
74	-	
1^-5^	+	
6^	-	
7^-8^	+	
1*-2*	-	
3*	-	Sekvencirano - velika podudarnost sekvence sa CbVd-1.
4*-5*	-	
6*-7*	+	
1'-12'	nepoznato	sPAGE - neuspješno. Prijašnjom analizom dokazana prisutnost viroida.
1!-2!	-	
3!-5!	+	
6!	-	

Osim bezviroidne šarene koprive 'Aurora Black Cherry' (uzorak 6^), svi uzorci RNA iz korjenčića šarene koprive uzgojenih *in vitro* (1^-5^) i šarenih kopriva iz staklenika (7^-8^) izoliranih metodom ekstrakcije iz 5 grama tkiva (Semancik, 1991.), analizirani u gelu 1,8% agaroze s 1xTBE-puferom (Slika 8.) dali su pozitivan rezultat. U uzorcima 1^-5^ se vidi pruga na visini koja odgovara veličini CbVd-1 kao i u kontrolnom uzorku 7^ zaraženom sa CbVd-1. Uzorak 6^ kao negativna kontrola (bezviroidna biljka) nema pruga u gelu što ukazuje na odsutnost viroida. Uzorak 8^ iz kontrolne biljke zaražene sa CbVd-3 pokazuje prisutnost amplikona koji odgovara po duljini CbVd-3.



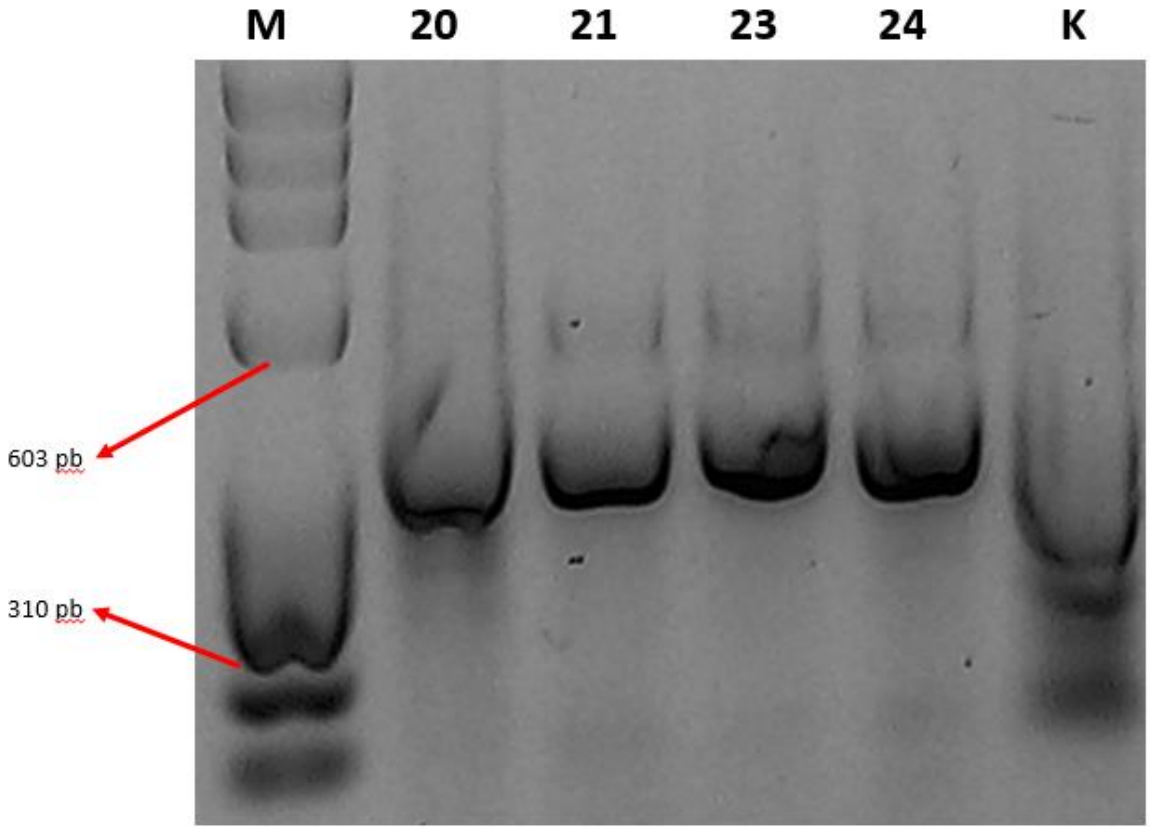
Slika 8. Produkti RT-PCR reakcija provedenih s generičkim početnicama za coleviroide CbVd-R i CbVd-F iz uzoraka korjenčića šarene koprive uzgojenih *in vitro* (brojevi iznad slike odgovaraju uzorcima u Tablici 6.). M - marker 9.

Analiza uzoraka tkiva *S. hispanica* metodom RT-PCR s generičkim početnicama za coleviroide CbVd-R i CbVd-F rezultirala je vidljivim prugama u gelu na istoj visini za sve uzorke (oko 350 pb). Slične su visine kao kontrolni uzorak 7^ zaražen sa CbVd-1. Prisutnost viroida u *S. hispanica* još treba dokazati i drugim metodama te do kraja analizirati sekvencu (Slika 9.).



Slika 9. Uzorci klijanaca *Salvia hispanica* analizirani metodom RT-PCR s generičkim početnicama za coleviroide CbVd-R i CbVd-F (brojevi iznad slike odgovaraju uzorcima u Tablici 6.). M - marker 9.

Analiza šarenih kopriva 'Aureole' uzgojenih iz sjemena metodom RT-PCR s generičkim početnicama CbVd-R i CbVd-F u različitim etapama eksperimentalnog rada pokazala je prisutnost amplikona (Slika 10.) u mnogima (rezultat nije prikazan za sve). Amplikoni su po duljini odgovarali CbVd-3. Kako je u originalnoj biljci s koje je sakupljeno sjeme dokazana zaraza sa CbVd-3 u prijašnjim eksperimentima u laboratoriju (Škorić, usmeno priopćenje) ovo bi bio preliminarni pokazatelj da se CbVd-3 kao i CbVd-1 prenosi sjemenom. Postotak prijenosa sjemenom CbVd-3 je u ovim eksperimentima bio 40%.



Slika 10. Reprezentativni uzorci šarenih kopriva uzgojenih iz sjemenki sakupljenih u rujnu 2015. sa kultivara Aureole (brojevi iznad slike odgovaraju uzorcima u Tablici 6.). M - marker 9, K – pozitivna kontrola koja sadržava CbVd-1.

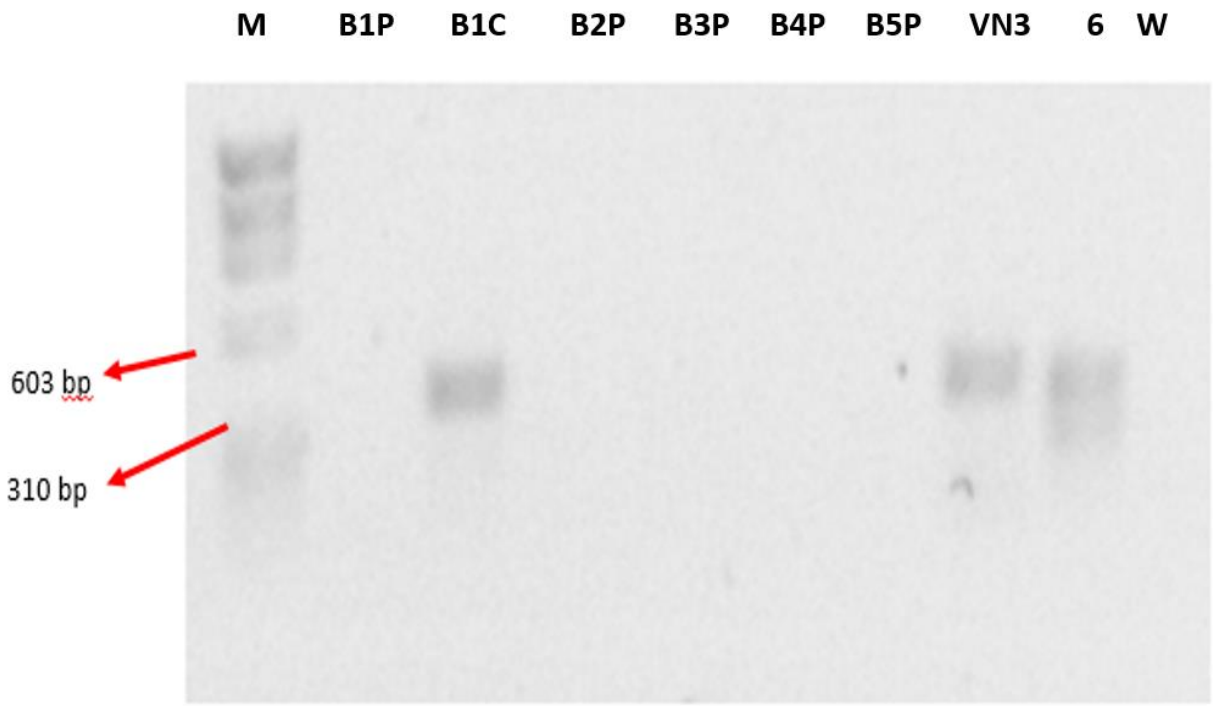
4.3. Prijenos CbVd-3 sa šarene koprive na bosiljak cijepljenjem

Pregledom nacjepljenih šarenih kopriva uočeno je da se uspješno nacjepila biljka B1 (nacjepljena šarena kopriva oznake VN3 iz staklenika zaražena sa CbVd-3). U biljkama B2 (nacjepljena šarena kopriva oznake VN3 iz staklenika zaražena sa CbVd-3) i B3 (nacjepljena šarena kopriva oznake VN3 iz staklenika zaražena sa CbVd-3) je prilikom skidanja parafilma došlo do trganja plemke šarene koprive s bosiljka tj. podloge. Pregledom mjesta cijepljenja na biljkama B2 i B3 uočeno je da je cijepljenje bilo uspješno. Šarena kopriva s biljke B4 (nacjepljena šarena kopriva oznake 13 iz staklenika bez viroida) je nestala s mjesta cijepljenja, vjerojatno je izbačena iz cijepa prilikom zalijevanja, pa je uspješnost cijepljenja bilo nemoguće utvrditi. Cijepljenje na biljku B5 (nacjepljena šarena kopriva oznake 6 iz staklenika koja je zaražena sa CbVd-1 i CbVd-3) nije uspjelo jer je šarena kopriva uvenula i istrunula (Slika 11.).



Slika 11. Nacjepljivanje šarene koprive na bosiljak (B1, B2, B5) i skupina svih nacjepljenih biljaka (B1-B5, dolje desno).

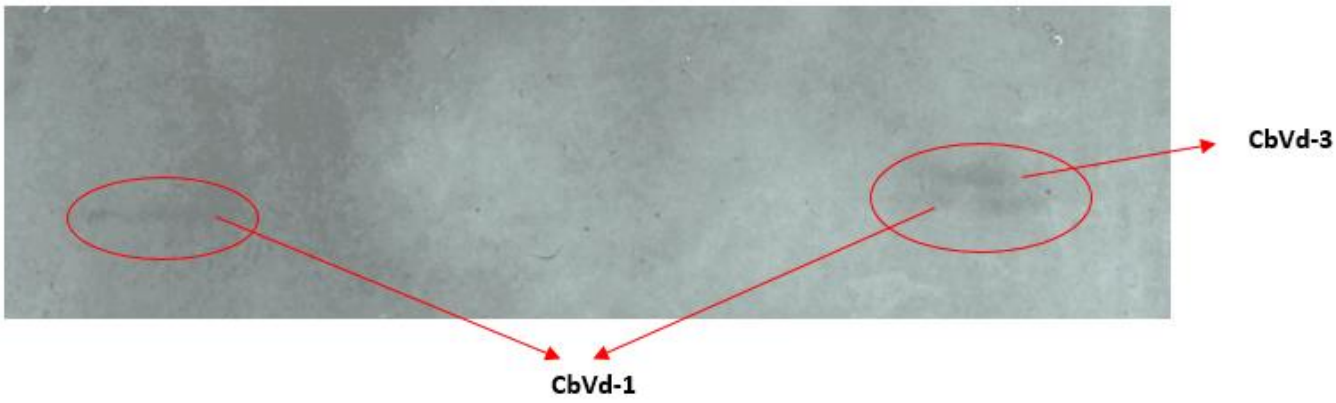
Analizirani su uzorci nacjepljenih šarenih kopriva na bosiljak izoliranih Qiagen® RNA easy kompletom nakon RT-PCR-a s generičkim početnicama za colevioride CbVd-P1 i CbVd-P2 (Slika 12.). Pozitivne kontrole PCR-a su uzorci šarenih kopriva iz staklenika kod kojih su već potvrđene zaraze viroida (šarena kopriva oznake VN3 koja je bila zaražena sa CbVd-3 i šarena kopriva oznake 6 koja je zaražena sa CbVd-1 i CbVd-3) . Uočena je prisutnost viroida CbVd-3 kod plemke uzoraka B1 (B1C) i pozitivnih kontrola PCR-a (VN3 i 6) no nema dokaza infekcije bosiljaka nakon nacjepljivanja šarene koprive, tj. nema prisutnosti viroidnih amplikona u ostalim uzrocima.



Slika 12. Uzorci nacjepljenih šarenih kopriva na bosiljak. M - marker 9, K – pozitivna kontrola koja sadržava CbVd-3, W-negativna kontrola. B1P-B5P- tkivo bosiljka korišteno kao podloga za cijepljenje, B1C- tkivo šarene koprive oznake VN3 iz staklenika koja je bila nacjepljena na bosiljak (plemka), stakleničke biljke VN3 i 6- pozitivne kontrole za infekciju s CbVd-3 i CbVd-1+CbVd-3, redom.

4.4. Sekvencijska poliakrilamidna gel-elektroforeza

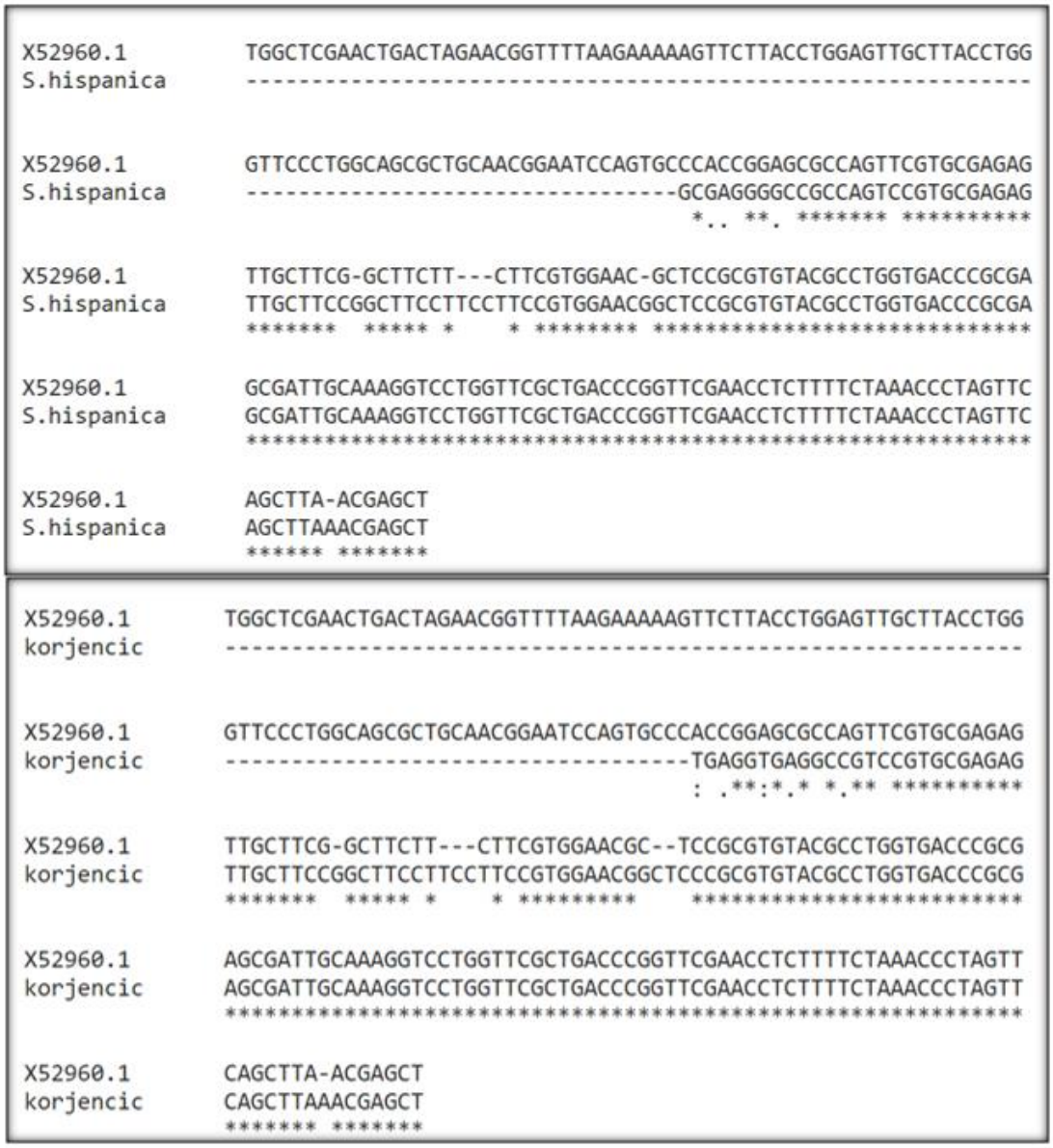
Kod odabranih uzoraka šarene koprive za koje se na temelju RT-PCR analiza utvrdilo da su zaraženi coleviroidima trebalo je to dokazati komplementarnom metodom koja se ne oslanja na sekvencu. Prisutnost CbVd je dokazana jedino kod šarene koprive iz staklenika oznake 6 zaražene sa CbVd-1 i CbVd-3 (Slika 13., desno) koja je uglavnom korištena kao pozitivna kontrola, te kod šarene kopriva iz staklenika oznake 8 zaražena samo sa CbVd-1 (Slika 13., lijevo). Testirane su i šarene koprive: šarena kopriva iz staklenika oznake VN3 koja je zaražena sa CbVd-3 i korjenčići šarene koprive zaraženi sa CbVd-1 kod kojih su metodom RT-PCR-a dokazane zaraze viroidima, no nisu prisutne pruge na gelu.



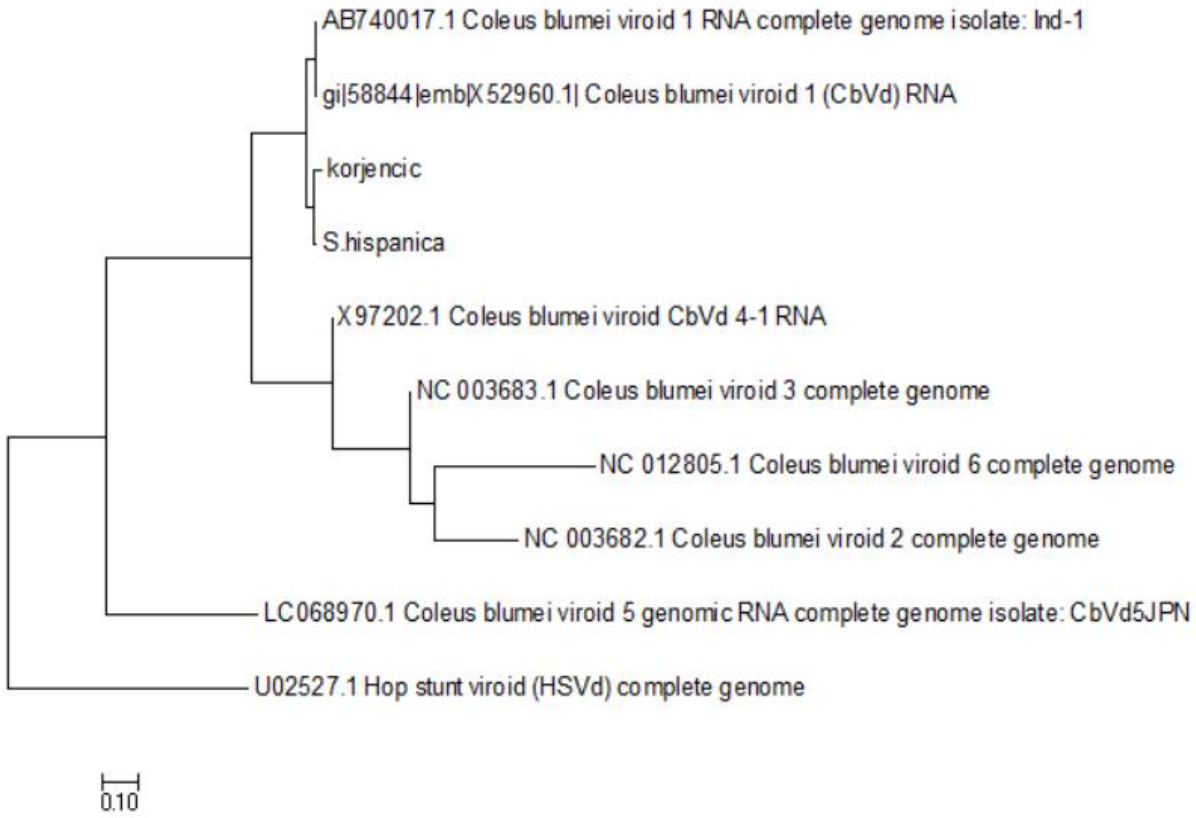
Slika 13. Sekvencijska poliakrilamidna gel-elektroforeza s prugama kod uzoraka šarene koprive iz staklenika laboratorijske oznake 6 koje potvrđuju zarazu sa CbVd-1 i CbVd-3 (desno) te šarene koprive iz staklenika oznake 8 koja ukazuje na zarazu samo sa CbVd-1 (lijevo).

4.5. Viroidne sekvence

Nakon dobivenih rezultata sekvenciranja iz tvrtke sekvence su uređene u programu SequencherTM 5.4.3 (Gene Codes Corporation, SAD), a kao referentna sekvenca kod određivanja konsenzus-sekvence za svaki uzorak korištena je sekvenca CbVd-1 (GenBank pristupni broj: X52960.1, Spieker i sur., 1990.). Sekvence su sravnjene i skraćene tj. odrezan je dio koji odgovara sekvencama početnica za colevioride. Za korjenčiće šarene koprive je rezultirajuća sekvenca bila duga tek 160 nukleotida, a za uzorak *S. hispanica* 161 nukleotid što je znatno manje od pune duljine viroida. Nakon toga su sekvence analizirane programom BLAST (Altschul i sur., 1990). Rezultati su pokazali da naše parcijalne viroidne sekvence imaju veliku podudarnost (97% za uzorak *S. hispanica* i 95% za korjenčiće šarene koprive) sa sekvencom (DQ178399.1) koja odgovara viroidu CbVd-1 (Li i sur., 2006.). Mjesta podudarnosti sekvenci korjenčića i *S. hispanica* sa referentnom sekvencom CbVd-1 sežu od mjesta vezanja generičkih početnica u CCR regiji pa sve do kraja slijedova sekvenci (Slika 14.). Daljnjom obradom sekvenci u programu Mega7 (Kumar i sur., 2015.) izrađeno je filogenetičko stablo (Slika 15.) uz korištenje referentnih sekvenci za CbVd-1 (AB40017.1 i X52960.1), HSVd (*Hop stunt viroid*) (U02527.1) i ostale coleviroide (CbVd-2 NC_003682.1, CbVd-3 NC_003683.1, CbVd-4 X97202.1, CbVd-5 LC068970.1, CbVd-6 NC_012805.1).



Slika 14. Sravnjene sekvence korjenčića šarene koprive i biljke *S. hispanica* sa referentnom sekvencom za CbVd-1 (X52960.1) programom Clustal W. Oznake: * - mjesta podudarnosti nukleotida, : - mjesta s tranzicijama, . – mjesta s transverzijama.



Slika 15. Filogenetičko stablo sa sekvencama *S. hispanica* i coleviroida dobivenih programom Mega7 korištenjem algoritma maksimalne vjerodostojnosti (*maximum likelihood method*) gdje dužina grana svake sekvence odgovara broju promjena u sekvenci. Stablo je ukorijenjeno sa sekvencom HSVd. "Bar" označava količinu genetičke promjene (broj promjena podijeljen sa dužinom sekvence).

5. RASPRAVA

Šarena kopriva (udomaćenog imena koleus) već dugi niz godina ima svoje mjesto kao sobna biljka i u raznim vrtovima diljem Hrvatske i svijeta. Njen laki uzgoj i široka rasprostranjenost je omogućila istraživanje coleviroida. Zbog rasprostranjenosti CbVd-1 u šarenoj koprivi dobro poznate su njegove glavne biološke značajke (krug domaćina, prenosivost sjemenom, cijepljenjem), a pronađeni su i alternativni domaćini u porodici *Lamiaceae*. CbVd-3 je kasnije otkriven, a i nije toliko široko rasprostranjen (Jiang i sur., 2011b) pa je njegova biologija razmjerno nepoznata. Zato je cilj ovog istraživanja bio istražiti biološke i molekularne značajke, odnosno način prijenosa te alternativne domaćine CbVd-3. U tu svrhu, a i zbog utvrđivanja alternativnih domaćina coleviroida općenito, provedeno je i testiranje dosad neistraženih potencijalnih domaćina iz porodice *Lamiaceae* (*Ajuga reptans, Ocimum basilicum, Salvia hispanica, S. hians, Nepeta faassenii, Plectranthus forsterii*). Nije dokazana prisutnost CbVd-3 u prethodno navedenim biljkama (Slika 13., Tablica 7.). No dokazana je prisutnost coleviroida u biljci *S. hispanica* koji ima sličnost po duljini amplikona sa CbVd-1 (Slika 9.), a filogenija na temelju parcijalne sekvence to potvrđuje (Slika 15.). Ovime je potvrđena veća rasprostranjenost CbVd-1 u odnosu na CbVd-3 u različitim domaćinima porodice *Lamiaceae*.

Izvorna zamisao za testiranje 1x SB-pufera (Brody i Kern, 2004.; Brody i sur., 2004.) je bila njegova manja konduktivnost što dovodi do manjeg zagrijavanja tokom elektroforeze u usporedbi sa 1x TBE-puferom. Zbog ove značajke se elektroforeza u 1x SB-puferu može provoditi pri većem naponu i u kraćem vremenu. Prema radu Brody i sur. (2004.). pretpostavka je bila da će pruge na gelu u 1x SB-puferu biti "oštrije" nego u 1x TBE- puferu no to se nije pokazalo sasvim točnim. Iako je priprema SB-pufera jednostavnija i jeftinija jer se sastoji od otopine natrij-klorida i borne kiseline, za razliku od TBE-pufera koji se sastoji od Tris, borne kiseline i EDTA, te elektroforeza protječe u kraćem roku bez prevelikog zagrijavanja, SB-pufer se nije pokazao znatno boljim od TBE-pufera zbog deformacija (valovitosti) pruga u gelu. Bolja razlučivost je prilikom elektroforeze u TBE-puferu gdje se jasno vide odvojene linije pruga u gelu. Međutim, kod brzih i rutinskih detekcija poznatih amplikona, sustav s SB-puferom prihvatljiva je jeftinija alternativa.

Prilikom primjene metode RT-PCR s generičkim početnicama CbVd-F/R (Hou i sur., 2008.) koje prije nisu korištene u laboratoriju najprije su reakcije optimizirane promjenom koncentracije $MgCl_2$ i izabrana je najbolja te je dalje korištena u radu. Testirane koncentracije

$MgCl_2$ su bile 1 mM, 1,5 mM i 2 mM pri čemu su koncentracije svih ostalih komponenata PCR smjese ostale iste. Iako su amplikoni bili slične koncentracije kod 1,5 i 2,0 mM $MgCl_2$, nešto manje nespecifične amplifikacije bilo je kod niže koncentracije $MgCl_2$ te je ona korištena u daljem radu.

U uzorcima različitih linija transgeničnih korjenčića šarene koprive uzgojenima *in vitro* (Vuković i sur., 2013.) također je dokazana prisutnost viroidnog amplikona i na isti način je potvrđeno da bi se moglo raditi o CbVd-1 (Slike 8. i 15.). Zanimljivo je da bez obzira na gen za kriptogein eksprimiran u ovim linijama korjenčića, infekcija s CbVd-1 postoji u njima, a zbog rasprostranjenosti CbVd-1 u različitim kultivarima šarene koprive logično je za pretpostaviti da potječe iz matične biljke (u ovom slučaju nepoznatog kultivara) i perzistira nakon svih postupaka genetičke manipulacije i uzgoja korjenčića *in vitro*. Ovaj sustav je sam po sebi zanimljiv potencijalni model za buduća istraživanja interakcija CbVd-1 i domaćinske biljke, te utjecaja ovih manipulacija na evoluciju CbVd-1.

Parcijalne sekvence viroida iz korjenčića i uzorka *S. hispanica* međusobno su najsličnije i imaju najveću podudarnost sa sekvencama CbVd-1. Međutim postojali su problemi prilikom sekvenciranja odabranih uzoraka korjenčića i *S. hispanica* jer je odgonetnut samo 161 nukleotid (pretpostavljena dužina CbVd-1 je oko 250 nt). Podudarnost je pokazana u dijelovima sekvenci od mjesta vezanja početnica u regiji CCR pa sve do kraja slijeda sekvenci (Slika 14.) što nije dovoljno za neku bolju karakterizaciju, odnosno trebalo bi u budućim istraživanjima odgonetnuti cijelu sekvencu iz navedenih uzoraka. Problem kod sekvenciranja se javlja i zbog velike heterogenosti sekvenci viroida tj. zbog njihove prirode kvazispecijesa. Jedno od rješenja je kloniranje viroidnih amplikona (ugradnja u plazmid i transformacija bakterije *Escherichia coli)* kako bi se mogle lijepo razdvojiti varijante sekvence i dobiti čiste kromatograme na temelju kojih se može lakše odrediti sekvenca. Zbog postojanja CbVd-3 kao kvazispecijesa u laboratorijskim uzorcima koji su istraživani ranije, također je trebalo provesti kloniranje, analizu haplotipova metodom *single-strand polymorphism analysis* (SSCP), no zbog ograničenog budžeta, to nije bilo moguće provesti. Stoga je detaljnija molekularna karakterizacija CbVd-3 iz uzoraka koji su o ovom diplomskom uglavnom korišteni kao pozitivne kontrole (biljka 6 i VN3) morala biti izostavljena.

Iako sekvence viroida iz *S. hispanica* i transgenih korjenčića šarene koprive nisu do kraja određene, velika podudarnost dobivenih parcijalnih sekvenci sa sekvencama CbVd-1 u dijelu viroida koji je varijabilniji i općenito široka rasprostranjenost CbVd-1 dobre su indikacije da se

u oba domaćina doista radi o CbVd-1. Pri tome *S. hispanica* nikad nije bila istraživana i bila bi novi domaćin za CbVd-1, a nalaz ovog viroida u korjenčićima šarene koprive iz kulture *in vitro* potvrda je da se umnožava u korjenskim tkivima, pa čak i u uvjetima *in vitro*. Ove rezultate je dakako potrebno potvrditi u daljim istraživanjima.

Listovi su uzimani kao izvor biljnog tkiva jer se u njima u prisustvu zaraze nalazi najveća koncentracija viroida što olakšava detekciju (Jiang i sur., 2011b.). Jedini je problem prisutnost polifenola i polisaharida koji imaju negativni utjecaj na RT-PCR-reakciju, a šarene koprive su biljke bogate polifenolima (Petersen i sur., 1994.). Pročišćavanje uzoraka se obavlja tijekom ekstrakcije viroidne RNA iz biljnog tkiva i svaka primijenjena metoda se razlikovala u nekim pojedinostima. No metoda koja daje najbolji prinos i čistoću viroidne RNA je ekstrakcijska metoda iz 5 grama tkiva (Semancik, 1991.) zbog dugotrajnog i opsežnog procesa izolacije RNA. Međutim, čak ni ona nije osigurala dovoljnu količinu viroida za detekciju metodom sPAGE koja se oslanja na strukturu viroidne molekule, a ne na sekvencu, kod svih testiranih uzoraka (Slika 13.). Ipak, uspješno je potvrđeno postojanje dvaju viroida u uzorku za koji se na temelju sekvenci pretpostavljalo da je inficiran sa CbVd-1 i CbVd-3 i koji se često koristi kao pozitivna kontrola u laboratorijskim RT-PCR-analizama. Daljnjim istraživanjem prisutnosti coleviroida u alternativnim domaćinima pomoću sekvencijske poliakrilamidne gel-elektroforeze nije na ovaj način dokazana prisutnost viroida . Postupak sPAGE je kompliciraniji u usporedbi sa standardnim agaroznim gel-elektroforezama. Jedan od razloga kompliciranosti je taj što je nakon elektroforeze prvog gela potrebno izrezati dio gela koji najvjerojatnije sadrži viroidne pruge u gelu, no to je bilo teško jer su pruge bile veoma slabo vidljive zbog određene starosti nekih uzoraka koji su korišteni kao kontrole pa je rezanje gela provedeno prema pretpostavci gdje bi se nalazile pruge viroida. Drugi problem je provođenje druge dimenzije gela pod konstantnom strujom. Ispravljač kojim se raspolaže u laboratoriju nije uspio održati istu struju tokom cijele elektroforeze. To sve utječe na kvalitetu sekvencijske poliakrilamidne gel elektroforeze i dodatnom optimizacijom bi se vjerojatno mogla popraviti kvaliteta rezultata, uz korištenje ekstrakcijske metode iz 5 g svježeg inficiranog tkiva koja bi osigurala dovoljnu količinu viroidne RNA za analizu.

Istraživanjem prenosivosti sjemenom utvrđeno je da je i CbVd-3 prenosiv sjemenom kao i CbVd-1 (Chung i Choi, 2008.). Zbog dokazane prisutnosti CbVd-3 metodom RT-PCR u 40% testiranih klijanaca šarene koprive kultivara Aureole (iz 2015.) svakako se ovo može pretpostaviti, no kako kod coleviroida postotak prenosivosti sjemenom varira u različitim kultivarima (Singh i Ready, 2003.), eksperiment bi trebalo ponoviti na većem broju uzoraka

kod ovoga kultivara, ali i kod biljke VN3 (CbVd-3 pozitivna kontrola) ukoliko se od nje uspije dobiti sjeme u budućnosti što je iz nekog razloga kod uzgoja ove biljke problem.

Prijenos CbVd-1 i CbVd-3 cijepljenjem šarene koprive na bosiljak nije se za sada pokazalo uspješnim. Iz priloženih rezultata (Slika 12.) se može zaključiti da nema prenosivosti CbVd-3 cjepljenjem, ali je to upitno jer se nije prenio ni CbVd-1 kod kojeg je inače dokazana prenosivost cjepljenjem na bosiljak (Singh i sur., 1991.). No problem je i uništenje biljnog materijala u trenutnim stakleničkim uvjetima prije uspješnog nacjepljenja što dovodi u pitanje rezultate. Postupak bi trebalo ponoviti i uzeti veći broj uzoraka kako bi se smanjio gubitak uspješnih nacjepljenja i povećala statistička točnost pokusa.

Ovo je jedno od prvih istraživanja CbVd-3 i karakterizacije njegovih značajki. Daljnjim istraživanjem treba proširiti istraživanje prijenosa sjemenom i postojanje omče 13 u molekuli CbVd-3 tj. strukturnog motiva potencijalno odgovornog za tu značajku (Tsushima i Sano, 2015a.). Uz to bi daljnjim istraživanjem trebalo potvrditi komplementarnim metodama (npr. sPAGE) postojanje viroida u uzorcima *S. hispanica* koji pokazuje veliku međusobnu sličnost sa CbVd-1 i do kraja utvrditi njegovu sekvencu.

6. ZAKLJUČAK

Optimizacijom elektroforeze agaroznih gelova u SB- i TBE-puferu pokazano je da je TBE-pufer nešto bolji i omogućuje dobru vizualizaciju viroidnih pruga. U SB-puferu dolazi do male deformacije pruga što otežava vizualizaciju, no još uvijek je ovakva elektroforetska analiza prihvatljiva jeftinija alternativa za rutinsku analizu poznatih viroidnih amplikona.

Korištenjem različitih koncentracija $MgCl_2$ u reakcijama RT-PCR-a sa generičkim početnicama CbVd-R i CbVd-F, najbolja se pokazala koncentracija od 1,5 mM $MgCl_2$ jer se pri njoj ne pojavljuju nespecifične pruge, a intenzitet amplikona je prihvatljiv.

Ekstrakcijom ukupne RNA iz tkiva listova biljke *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. te drugih potencijalnih domaćina iz porodice *Lamiaceae: Ajuga reptans* L., *Ocimum basilicum* L., *Salvia hispanica* L., *S. hians, Nepeta faassenii* Bergmans ex Stearn i *Plectranthus forsterii* Benth. metodom RT-PCR uz pomoć generičkih početnica za coleviroide detektirana je prisutnost amplikona u uzorcima *S. hispanica*.

Analiza parcijalnih sekvenca viroidnih amplikona iz tkiva korjenčića šarene koprive i tkiva biljke *S. hispanica,* odgovarala je CbVd-1. No prisutnost viroida sličnog CbVd-1 u *S.hispanica* još treba potvrditi dodatnim metodama i odgonetnuti mu potpunu sekvencu i na taj način bi se proširio krug domaćina za CbVd-1. Za CbVd-3 nisu pronađeni dodatni domaćini.

Parcijalna sekvenca CbVd-1 u transgeničnim korjenčićima šarene koprive iz kulture *in vitro* potvrda je da se umnožava i perzistira u njenim korjenskim tkivima čak i u ovakvim uvjetima.

Kod CbVd-3 je dokazana prenosivost sjemenom šarene koprive od 40%.

Prijenos CbVd-3 cjepljenjem se nije pokazao uspješnim, no zbog nepovoljnih eksperimentalnih uvjeta i malog broja testiranih biljaka ovaj rezultat ne može se smatrati konačnim i pokus bi trebalo ponoviti na većem broju biljaka i uz poboljšanje uvjeta u stakleniku.

7. REFERENCE

- Adkar-Purushothama CR, Nagaraja H, Sreenivasa MY, Sano T, 2013. First report of *Coleus blumei viorid* Infecting *Coleus* in India. Plant Disease **97**, 149.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology **215**, 403-410.
- Ambriović-Ristov A, Brozović A, Bruvo Mađarić B, Ćetković H, Hranilović D, Herak Bosnar M, Katušić S, Meštrović N, Mihaljević S, Slade N, Vujaklija D, 2007. Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.
- Brody JR, Kern SE, 2004. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. BioTechniques **36**, 214-216.
- Brody JR, Calhoun ES, Gallmeier E, Creavalle TD, Kern SE, 2004. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. BioTechniques **37**, 598-602.
- Chung BN, Choi GS, 2008. Incidence of *Coleus blumei viroid* 1 in seeds of commercial *Coleus* in Korea. The Plant Pathology Journal **24**, 305-308.
- Černi S, Ruščić J, Nolasco G, Gatin Ž, Krajačić M, Škorić D, 2008. Stem pitting and seedling yellows symptoms of *Citrus tristeza virus* infection may be determined by minor sequence variants. Virus Genes **36**, 241-249.
- Černi S, Ćurković-Perica M, Rusak G, Škorić D, 2012. *In vitro* system for studying interactions between *Citrus exocortis viroid* and *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. Metabolism and growing conditions. Journal of Plant Interactions **7**, 254-261.
- Di Serio F, Flores R, Verhoeven JTJ, Li SF, Pallas V, Randles W, Sano T, Vidalakis G, Owens RA, 2014. Current status of viroid taxonomy. Archives of Virology **159**, 3467-3478.
- Diener TO (ur.), 1987. The viroids. Springer US, Plenum Press, New York and London.
- Diener TO, 1971. Potato spindle tuber ``virus´´ IV. A replicating, low molecular weight RNA. Virology **45**, 411-428.
- Ding B, Owens RA, 2003. Movement. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 49-53.
- Flores R, Daros JA, Navarro JA, 2003. Replication. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 55-59.

- Flores R, Delgado S, Gas ME, Carbonell A, Molina D, Gago S, De la Pena M, 2004. Viroids: The minimal non-coding RNAs with autonomous replication. FEBS Letters, **567**, 42-48.
- Flores R, Hernandez C, de Alba AEM, Daros JA, Di Serio F, 2005. Viroids and viroid-host interaction. Annual Review of Phytopathology **43**, 117-139.
- Flores R, Gas ME, Molina-Serrano D, Nohales MA, Carbonell A, Gago S, De la Pena M, Daros JA, 2009. Viroid replication: Rolling- Circles, enzymes and ribozymes. Viruses **1**, 317-334.
- 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 10.3389.
- Flores R, Gago-Zachert S, Serra P, Sanjuan R, Elena SF, 2014. Viroids: survivors from the RNA world. Annual Reviews of Microbiology **68**, 395-414.
- Flores R, Minoia S, Carbonell A, Gisel A, Delgado S, Lopez-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 **96**, 559.
- Flores R, Randles JW, Owens RA, 2003. Classification. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 71-74.
- Hadidi A, Candresse T, 2003. Polymerase chain reaction. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 115-122.
- Hammond RW, Owens RA, 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultular and agricultural crops. American Phytopathological Society online.
- Hanold D, Semancik JS, Owens RA, 2003. Polyacrylamide gel electrophoresis. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 94-102.
- Henson J. M. i French R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annual Review of Phytopathology **31**: 81-109.
- Hou WY, Sano T, Li F, Wu ZY, Li L, Li SF, 2009. Identification and characterization of a new coleoviroid (CbVd-5). Archives of Virology **154**, 315-320.
- Igloi G, 1983. A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. Analytical Biochemistry **134**, 184-188.

- Jiang DM, Li SF, Fu FH, Wu ZJ, Xie LH, 2011a. First reported occurrence of *Coleus blumei viroid 3* from *Coleus blumei* in China. Journal of Plant Pathology **93**, S4.63-S4.89.
- Jiang D, Wu Z, Xie L, Sano T, Li S, 2011b. Sap-direct RT-PCR for the rapid detection of *Coleus blumei viroids of the genus Coleoviroid* from natural host plants. Journal of Virological Methods **174**, 123-127.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. Molecular Biology and Evolution.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG, 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics **23**, 2947-2948.
- Li SF, Su Q, Guo R, Tsuji M i Sano T, 2006. First report of *Coleus blumei viroid* from coleus in China. Plant Patholology **55**, 565.
- Mühlbach HP, Weber U, Gomez G, Pallas V, Duran-Vila N, Hadidi A, 2003. Molecular hybridization. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids: Properties, detection, disease and their control. CSIRO Publishing, Australia, 103-114.
- Nelson A, 2007. Principles of Agricultural Botany. Read Books,United Kingdom,101.
- Owens RA, Baumstark T, 2007. Structural differences within the loop E motif imply alternative mechanisms of viroid processing. RNA **13**, 824-834.
- Petersen M, Hausler E, Meinhard J, Karwatzki B, Gertlowski C, 1994. The biosynthesis of rosmarinic acid in suspension cultures of *Coleus blumei*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **38**, 171-179.
- Ragozzino E, Faggioli F, Barba M, 2004. Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: *Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid and Pospiviroid.* Journal of Virological Methods **9522**, 1-5.
- Randles J, 2003. Economic impact of viroid disease. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 3-12.
- Sambrook J i Russell D, 2001. Molecular cloning: a laboratory manual 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Semancik JS, 2003. Pathogenesis. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 61-65.

- Semancik JS, 1991. Viroid purification and characterization. In Roistacher CN. Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis. International Organisation of Citrus Virologists, FAO, Rome, 233-241.
- Singh RP, Boucher A, Singh A, 1991. High incidence of transmission and occurrence of a viroid in commercial seeds of Coleus in Canada. Plant Disease **75**, 184-187.
- Singh RP, Ready KFM, 2003. Biological indexing. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 89-94.
- Singh RP, Boiteux MENF, Ready KFM, Nie X, 2003. *Coleus blumei* viroid. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.). Viroids. CSIRO Publishing, Australia.
- Spieker RL, Haas B, Charng YC, Freimuller K, Sanger HL, 1990. Primary and secondary structure of a new viroid 'species' (CbVd 1) present in the Coleus blumei cultivar 'Bienvenue'. Nucleic Acids Research **19**, 3998.
- Steger G, Riesner D, 2003. Molecular characteristics. In Hadidi A, Flores R, Randles J, Semancik J (eds.) 2003. Viroids. CSIRO Publishing, Australia, 15-28.
- Škorić D, Černi S, Jezernik K, 2015. Preliminary findings on *Coleus blumei viroids* in Croatia. Viroid 2015: International Conference on Viroid and Viroid-like RNAs Book of Abstracts, Duesseldorf University Press 2015, 63-64.
- Tsushima T, Sano T, 2015a. Analysis of genetic stability and seed transmission of *Coleus blumei viroid* 1 variants with different internal loop structures. Viroid 2015: International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs Book of Abstracts, June 25-28, Česke Budějovice, pp. 67-68.
- Tsushima T, Sano T, 2015b. First report of *Coleus blumei viroid 5* infection in vegetatively propagated clonal coleus cv. `Aurora black cherry` in Japan. New Disease Reports **32**, 7.
- Vuković R, Bauer N, Ćurković-Perica M, 2013. Genetic elicitation by inducible expression of β-cryptogein stimulates secretion of phenolocs from Coleus blumei hairy roots. Plant Science **199-200**, 18-28.

8. PRILOZI

Prilog 1. Nukleotidni slijedovi sekvenci korištenih u izradi filogenetičkog stabla u programu Mega7. Sekvence su u FASTA formatu, a oznake odgovaraju oznakama sekvenci u stablu.

>X52960.1 Coleus blumei viroid 1 (CbVd) RNA

TGGCTCGAACTGACTAGAACGGTTTTAAGAAAAAGTTCTTACCTGGAGTTGCT
TACCTGGGTTCCCTGGCAGCGCTGCAACGGAATCCAGTGCCCACCGGAGCGCC
AGTTCGTGCGAGAGTTGCTTCGGCTTCTTCTTCGTGGAACGCTCCGCGTGTAC
GCCTGGTGACCCGCGAGCGATTGCAAAGGTCCTGGTTCGCTGACCCGGTTCGA
ACCTCTTTTCTAAACCCTAGTTCAGCTTAACGAGCT

>AB740017.1 Coleus blumei viroid 1 RNA, complete genome, isolate: Ind-1

TGGCTCGAACTGACTAGAACGGTTAAAGAAAAAGTTCTTACCTGGAGTTGCTT
ACCTGGGTTCCCTGGCAGCGCTGCAACGGAATCCAGTGCCCACCGGAGCGCC
AGTTCGTGCGAGAGTTGCTTCGGCTTCTTCTTCGTGGAACGGCTCCGCGTGTA
CGCCTGGTGACCCGCGAGCGATTGCAAAGGTCCTGGTTCGCTGACCCGGTTCG
AACCTCTTTTCTAAACCCTAGTTCAGCTTAAACGAGCT

>NC_003682.1 Coleus blumei viroid 2, complete genome

CGGATCATTTTCTTGTGGTTCCTGTGGTACACCTCCGAAGGCGCGCTAGGCGA
GAAGAGAGTAAATAGAGGAGAGAGCTTACCTGGGTTCCCTGGCAGCGCTGCA
ACGGAATCCAGTGCCCACCGGAGCGCCAGTTCGTGCGAGAGCCGCTTCGGCTT
CTTCTTCGCGGAACGGCTCCGCGTGTACGCCTGGGACCCCGCGAGCGATTGCA
AAGGTCCCGGTTCGCTCTCCTTTTCTTTTTTACCTACTTCAGCCGACCGCCCCG
GGGAGTGAATCACCCGGGACCGCGAAAAGCGATCCT

>NC_003683.1 Coleus blumei viroid 3, complete genome

CGGATCATTTTCCTTGTGGTTCCTGTGGTACACCTCCGAAGGCGCGCTCGGCG
AGAAGAGAGTAAATAGAAGAGAGAGCTTACCTGGGTTCCCTGGCAGCGCTGC
AACGGAATCCAGGGCGTTGGCCCCGATGGAGTTTCCGATGAGCACCGGTGAG
AAGAAACTGTCTCGCAGAATAGAAGTCTCTTCTTGTTTGCTTTGAGACTTCTTC
TCCACAGGGCTCTTCGGCTCTTCGCGGGTACCCAGCAACCTGCTCCCACGCGG

CGATTGCAAAGGACCCGGTTCGCTCTCCTTTTCTTATTTACCTGCTTCAGACCG
ACCGCCCCGGGGAGTGAATCACTGGAACCGCGAGAAAAAGGATCCT

>X97202.1 Coleus blumei viroid CbVd 4-1 RNA

TGGCTCGAACTGACTAGAACGGTTTAAAGAAAAAGTTCTTACCTGGAACCTGG
GTTCCCTGGCAGCGCTGCAACGGAATTCAGGGCGTTGGCCCCGATGGAGTTAC
CGATGAGCACCGGTGAGAAGAGACTGTCTCGCAGACTAGAAGTCTCTTCTTTT
CTGCTTTGAGACTTCTTCTCCGTAGGACTCTTCGGCTCTTCGCGGGTACCCAGC
AACCTGCTCCCACGCGGCGATTGCAAAGGATCCGGTCCGGTTCGAACCTCTTT
TCTAAACCCTAGTTCAGCTTAAACGAGCT

>LC068970.1 Coleus blumei viroid 5 genomic RNA, complete genome, isolate: CbVd5JPN

TGACCTCAATTGACTAGAACAGTAGTAAAGAAAAGGCAGGTTGCTTACCTGG
CTTCCCTGGCAGCGCTGCAACGGAATTCAGGGCACGGAGTCGGTGCCAGATC
GTGCGGCTTCGGCGCCAGTTCGTGCGAGAGCTTCGCTCGCGAACTCTACGTGG
AACGGCCGTCGCTCGTGGGTCGGCCGTCTTCCGGGTTCCTGCTCCCACGCGGC
GATTGCAAAGGAGCTGGTTCGCGTCCTGTCCTATTCTTCTACTCTAGTTCAACT
TAAAGAGGTT

>NC_012805.1 Coleus blumei viroid 6, complete genome

CGGATCATTTTCTTGTGGTTCCTGTGGTACACCTCCGAAGGCCGCCTAGGCGA
GAAGAGAGTAAATAGAGGAGAGAGCTTACCTGGGTTCCCTGGCAGCGCTGCA
ACGGAATTCAGGGCACGGAGTCGGTGCCAGATCGTGCGGCTTCGGCGCCAGT
TCGTGCGAGAGCTTCGCTCGCGAACTCTTCGTGGAACGGCCGTCGCTCGTGGA
TCGGCCGTCTTCCGGGTTCCTGCTCCCACGCAGCGATTGCAAAGGATCCGGTT
CGCTCTCCTTTTCTTTTTTACCTGCTTCAGACCGACGCGCCCGGGGAGTGAATC
ACCTGGGACCGCGAAAAGCGATCCT

>U02527.1 Hop stunt viroid (HSVd), complete genome

CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATAAGGCAAGCAAAGAAAAAACAAGGCAG
GGAGGAGACTTACCTGAGAAAGGAGCCCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCCA
GCGAGAGGCGTAGGAGAGAGGGCCGCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTTCTTGC
TTCGAAACACCATCGATCGTCCCTTCTTCTTTTACCTTCTCCTGGCTCTTCGAG

TGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTCGTCTTCCAACCTGCTTTTTGT
CTATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGCCCCT

Prilog 2. Nukleotidni slijedovi sekvenci izoliranih u ovom radu iz uzoraka biljnog tkiva korjenčića šarene koprive i biljke *Salvia hispanica*. Sekvence su u FASTA formatu i oznake odgovaraju oznakama sekvenci u stablu. Priložene sekvence su konsenzusne-sekvence obrađene u programu SequencherTM 5.4.3.

>S.hispanica

GCGAGGGGCCGCCAGTCCGTGCGAGAGTTGCTTCCGGCTTCCTTCCTTCCGTG
GAACGGCTCCGCGTGTACGCCTGGTGACCCGCGAGCGATTGCAAAGGTCCTG
GTTCGCTGACCCGGTTCGAACCTCTTTTCTAAACCCTAGTTCAGCTTAAACGA
GCT

>korjencic

TGAGGTGAGGCCGTCCGTGCGAGAGTTGCTTCCGGCTTCCTTCCTTCCGTGGA
ACGGCTCCCGCGTGTACGCCTGGTGACCCGCGAGCGATTGCAAAGGTCCTGGT
TCGCTGACCCGGTTCGAACCTCTTTTCTAAACCCTAGTTCAGCTTAAACGAGCT

OSOBNE INFORMACIJE

Anamarija Butković



Diljska ulica 22a, 10040 Zagreb (Dubrava), Republika Hrvatska

+385 91 732 00 29

anamarija.butkovic@gmail.com

LinkedIn https://hr.linkedin.com/in/anamarija-butković-7b630210a

Researchgate https://www.researchgate.net/profile/Anamarija_Butkovic2

Spol Žensko | Datum rođenja 30/04/1992 | Državljanstvo Republike Hrvatske

RADNO ISKUSTVO

studeni 2013 – rujan 2016

Edukator

Zoološki vrt grada Zagreba, Maksimirski perivoj bb, Zagreb (Hrvatska)

- Edukacija djece i odraslih o životinjama i važnosti njihova očuvanja i zaštite.

Sektor Edukacija

veljača 2016-rujan 2016

Hostesa

Marketinška agencija 'Brandkarma', Petrova ulica 79, Zagreb (Hrvatska)

- Promocija brendova I edukacija odraslih

Sektor Marketing

listopad 2016-veljača 2017

Izvršitelj projekata

Laboratorij za evoluciju virusa Universitat politècnica de València, El Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (**IBMCP**) pod vodstvom dr. Santiaga Elene

- Usavršavanje laboratorijskih vještina u području izloacije virusne RNA, RT-PCR-a, qRT-PCR-a, gel elektroforeze, inokulacije biljaka

Sektor Molekularna biologija virusa

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

2014 – 2016

Diplomski studij – Molekularna biologija

Diplomski studij

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet – Biološki odsjek

2011 – 2014

Preddiplomski studij – Biologija

Preddiplomski studij

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet – Biološki odsjek

2007 – 2011

Srednja škola

II. gimnazija, Zagreb

1999 – 2007 **Osnovna škola**

Osnovna škola Marije Jurić Zagorke, Zagreb

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik hrvatski

Ostali jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C2	C2	C2
	Lingua (http://www.linguagrupa.hr/), Erasmus procjena I CEFR procjena				
njemački	B1	B1	B1	B1	A2
španjolski	A2	A2	A2	A2	A2

Stupnjevi: A1/2: Početnik - B1/2: Samostalni korisnik - C1/2 Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

- Odlične komunikacijske vještine stečene tijekom rada s djecom i odraslima u Zoo vrtu Zagreb.
- Odlične komunikacijske vještine stečene tijekom trogodišnjeg sudjelovanja na sveučilišnoj manifestaciji *Noć biologije* u organizaciji profesora i studenata Biološkog odsjeka PMF-a.

Organizacijske vještine

- Odlične organizacijske vještine stečene tijekom rada s djecom i odraslima u Zoo vrtu Zagreb.
- Odlične organizacijske vještine stečene tijekom trogodišnjeg sudjelovanja na sveučilišnoj manifestaciji *Noć biologije* u organizaciji profesora i studenata Biološkog odsjeka PMF-a.

Poslovne vještine

- Odlično snalaženje u laboratorijskom okruženju i radu s laboratorijskim priborom u svrhu znanstvenog istraživanja iz područja molekularne biologije (odrađena i položena laboratorijska stručna praksa tijekom dvaju ljetnih semestara preddiplomskog i diplomskog studija).
- Izrađen diplomski rad u laboratorijskom okruženju iz područja biljne virologije.
- U sklopu stipendije 'Erasmus + stručna praksa' u trajanju 5 mjeseci kao izvršitelj projekata o evoluciji virusa TEV (*Tobacco etch virus*) i TuMV (*Turnip mosaic virus*) pod nadzorom dr. Santiaga Eleneu laboratoriju Universitat politècnica de valència, El Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (**IBMCP**).

Računalne vještine

- Odlično vladanje osnovama rada na računalu.
- Vrlo dobro vladanje programskim jezikom 'R' za statističku obradu podataka.
- Dobro vladanje programskim jezicima 'Python' I 'LaTex'
- Vrlo dobro vladanje alatima Microsoft Office-a (Word, Excel, PowerPoint i Access).

Ostale vještine

- Bavim se plivanjem, planinarenjem i yogom
- U slobodno vrijeme puno čitam, volim trčati i boraviti u prirodi.
- Imam obrazovanje iz prve pomoći stečeno tijekom polaganja vozačkog ispita.

Vozačka dozvola B

DODATNE INFORMACIJE

Projekti

- Sveučilišna manifestacija *Noć biologije*. Edukator i demonstrator na Botaničkom, Mikrobiološkom i Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a (2011.-2014.).
- Universitat politècnica de valència, El Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (**IBMCP**) u sklopu stipendije 'Erasmus + stručna praksa' u trajanju 5 mjeseci kao izvršitelj projekata o evoluciji virusa TEV (*Tobacco etch virus*) I TuMV (*Turnip mosaic virus*) pod nadzorom dr. Santiaga Elene (listopad 2016.-veljača 2017.)

Konferencije

- *HDIR-3 „From Bench to Clinic*". Sudjelovanje na trećoj međunarodnoj konferenciji Hrvatskog društva za istraživanje raka održanoj u Zagrebu (6.-7. studenog 2014.).

Priznanja i nagrade

- *Rektorova nagrada*. Za aktivno sudjelovanje u organizaciji i provedbi sveučilišne manifestacije *Noć biologije* – edukator i demonstrator na Mikrobiološkom zavodu Biološkog odsjeka PMF-a (2012.).

Članstva

- *Hrvatsko mikrobiološko društvo (Croatian Microbiological society).* Aktivni član od siječnja 2016.