

# MOLEKULARNA I BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA VIRUSA UVIJEJENOSTI LISTA VINOVE LOZE 3 IZ AUTOHTONIH DALMATINSKIH SORTI

---

Čarija, Mate

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:726584>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Mate Čarija

**MOLEKULARNA I BIOLOŠKA  
KARAKTERIZACIJA VIRUSA UVIJENOSTI  
LISTA VINOVE LOZE 3 IZ AUTOHTONIH  
DALMATINSKIH SORTI**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Science  
Department of Biology

Mate Čarija

**MOLECULAR AND BIOLOGICAL  
CHARACTERIZATION OF GRAPEVINE  
LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS 3 FROM  
DALMATIAN INDIGENOUS VARIETIES**

DOCTORAL DISSERTATION

Zagreb, 2023.

Ovaj doktorski rad je izrađen na Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu i na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Katarine Hančević, više znanstvene suradnice, i izv. prof. dr. sc. Silvije Černi, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O MENTORIMA

Dr. sc. Katarina Hančević, viša je znanstvena suradnica zaposlena u Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu. Doktorirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2009. s disertacijom naslova „Patogeni potencijal monofiletskih izolata virusa tristeza (*Citrus tirsteza virus*)". Njezin znanstveno-istraživački interes prvenstveno je vezan za biljne patogene, viruse vinove loze i agruma. Također se bavi istraživanjima korisnih simbiotskih mikroorganizama kao što su arbuskularno-mikorizne gljive. Identifikacija biljnih mikroorganizama, njihova genomska karakterizacija te učinak koji imaju na fiziološke i biokemijske procese domaćinske biljke predstavljaju najvažnije aspekte njenog znanstvenog djelovanja.

Izv. prof. dr. sc. Silvija Černi zaposlena je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je završila diplomski studij molekularne biologije i kasnije poslijediplomski studij te doktorirala 2009. s disertacijom naslova „Molekularna varijabilnost i populacijska struktura hrvatskih izolata virusa tristeza". Kao nastavnica na Zavodu za mikrobiologiju, nositeljica je nekoliko kolegija iz ovog područja, a tijekom znanstvene karijere bila je aktivno uključena u više domaćih i inozemnih projekata te se usavršavala u inozemstvu. Primarni interes njenog znanstvenog djelovanja je molekularna karakterizacija i epidemiologija virusnih i subvirusnih patogena, a u ovom je području objavila i veći broj znanstvenih radova.

## ZAHVALE

Dragoj mentorici dr. sc. Katarini Hančević hvala za to što me uvela u svijet znanosti i pružila mi priliku da kroz učenje i rad ostvarim ovu disertaciju. Nesebičnim dijeljenjem znanja, svakodnevnim zajedničkim radom i brojnim savjetima kojima je pratila ovaj proces, dala je nemjerljiv doprinos mom profesionalnom razvoju, a prijateljskim pristupom mi je pokazala kako nema tog problema koji se ne može riješiti. Veselim se nastavku naše zajedničke suradnje i novim izazovima koji nas očekuju.

Mojoj mentorici na fakultetu, izv. prof. dr. sc. Silviji Černi, zahvaljujem na svim vrijednim savjetima koje mi je dala tijekom našeg zajedničkog rada i znanju kojeg je prenijela na mene, a bez kojeg ova disertacija nikad ne bi dobila svoj konačni oblik. Uvijek je bila tu kada je trebalo, a izuzetnom komunikacijom je učinila da udaljenost u kilometrima među nama postane nepostojeća.

Dragom dr. sc. Tomislavu Radiću se zahvaljujem na prijateljskoj podršci tijekom ovog procesa, kao i brojnim zajedničkim satima rada koji je iznijedrio vrijedne znanstvene rezultate. Tomi i Emanuelu želim da njihova sinergija, vrijedan rad i entuzijizam budu u najmanju ruku jednako tako produktivni.

Svim kolegama iz „male zgrade“ Instituta, Ivanu, Goranu, Lukreciji, Josipu i Mrkiju hvala za svaki trenutak ispunjen smijehom i prijateljskim ozračjem. Uz njih je svaki radni dan bio ljepši i ugodniji.

Svim ostalim kolegama iz Instituta hvala na podršci i prijateljskim savjetima kojima su ovaj rad učinili potpunim.

Mojoj obitelji, majci Maji, ocu Ivanu, bratu Josipu i nevjesti Nikolini hvala na neizmjerljivoj podršci i razumijevanju, bez njih ništa od ovog ne bi bilo moguće.

Svim dragim prijateljima hvala na podršci i beskrajnom razumijevanju na ovom dugom putu.

I za kraj, draga Sanjo, hvala ti na beskrajnoj podršci i ljubavi koju si mi pružila tijekom pisanja ove disertacije, uz tebe je ipak puno lakše bilo prolaziti sve. 😊

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

**MOLEKULARNA I BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA VIRUSA UVIJENOSTI LISTA VINOVE LOZE 3 IZ  
AUTOHTONIH DALMATINSKIH SORTI**

Mate Čarija

Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split  
Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Virus uvijenosti lista vinove loze 3 (grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3, *Closteroviridae*) uzročnik je bolesti uvijenosti lista, jedne od ekonomski najznačajnijih viroza vinove loze. U ovom istraživanju, u uzorcima 16 autohtonih dalmatinskih sorti i klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali', primjenom molekularnih metoda napravljen je pregled pojavnosti ekonomski štetnih virusa vinove loze uz poseban osvrt na genomske varijante GLRaV-3. Utvrđena je dominantna pojavnost GLRaV-3 te učestale koinfekcije s drugim virusima. Analizom populacijske strukture virusa GLRaV-3 utvrđena je pripadnost virusnih varijanti filogenijskim skupinama I i II. Nakon inokulacije standardnih indikatorskih biljaka i autohtone sorte 'Tribidrag' virusom GLRaV-3 samostalno ili u koinfekciji utvrđene su promjene u relativnoj koncentraciji GLRaV-3 ovisno o starosti biljke, fenofazi dormancije i prisutnosti drugih virusa. Pojava i jakost simptoma, kao i fiziološke promjene biljaka vinove loze, ovisile su o sorti i sastavu virusnog inokuluma, pri čemu su se simptomi uvijenosti lista razvili na svim sortama vinove loze.

(123 stranice, 20 tablica, 42 slike, 144 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: GLRaV-3, pojavnost virusa, populacijska struktura, relativna kvantifikacija, simptomi, fiziološke promjene, bolest uvijenosti lista vinove loze

Mentorice:

Dr. sc. Katarina Hančević, viša znanstvena suradnica

Izv. prof. dr. sc. Silvija Černi

Ocjenjivači:

Doc. dr. Marin Ježić

Prof. dr. sc. Dijana Škorić

Prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Doctoral thesis

**MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED  
VIRUS 3 FROM DALMATIAN INDIGENOUS VARIETIES**

Mate Čarija

Institute for Adriatic Crops and Karst Reclamation, Split  
Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3, *Closteroviridae*) is the causal agent of grapevine leafroll disease, one of the most important diseases affecting grapevine. The prevalence of economically harmful grapevine viruses was determined, with special reference to genomic variants of GLRaV-3. In the sample of 16 indigenous Dalmatian varieties and clonal candidates of 'Plavac Mali', the predominance of GLRaV-3 and its frequent coinfections were determined. Population structure analysis of GLRaV-3 variants confirmed their clustering into phylogenetic groups I and II. To better elucidate GLRaV-3 and its effect on the host, after inoculation of standard indicator plants and indigenous variety 'Tribidrag' with GLRaV-3 singly or in coinfection, differences in the relative GLRaV-3 concentration were determined as a result of plant-host age, dormancy stage and interactions with other viruses. The appearance and severity of symptoms as well as physiological changes were variety and inoculum dependant, while leafroll symptoms developed in all grapevine varieties.

(123 pages, 42 figures, 20 tables, 144 references, original in Croatian)

Key words: GLRaV-3, virus prevalence, population structure, relative quantification, symptoms expression, physiological changes, grapevine leafroll disease

Supervisors:

Katarina Hančević, PhD, Senior research associate  
Silvija Černi, PhD, Associate professor

Reviewers:

Marin Ježić, PhD, Assistant professor  
Dijana Škorić, PhD, Professor  
Jasminka Karoglan Kontić, PhD, Professor

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Cilj istraživanja .....	3
2. LITERATURNI PREGLED.....	5
2.1. Bolest uvijenosti lista vinove loze i njezini uzročnici .....	5
2.2. Simptomi GLRaV- 3 i ostalih uzročnika bolesti uvijenosti lista .....	6
2.3. Rasprostranjivanje GLRaV-3.....	8
2.4. Organizacija genoma GLRaV-3.....	9
2.5. Replikacija GLRaV-3.....	11
2.6. Genomska varijabilnost GLRaV-3 .....	11
2.7. Detekcija i karakterizacija GLRaV-3.....	14
2.8. Ostali uzročnici značajnih virusnih bolesti vinove loze.....	16
2.9. Strategije suzbijanja rasprostranjivanja GLRaV-3 i ostalih ekonomski značajnih virusa .....	19
2.10. Uzgoj vinove loze i istraživanje virusa vinove loze u Dalmaciji .....	20
3. MATERIJALI I METODE.....	23
3.1. Kemikalije, kompleti reagensa, enzimi, puferi i otopine .....	23
3.1.1. Popis kemikalija.....	23
3.1.2. Kompleti reagensa.....	24
3.1.3. Enzimi.....	24
3.1.4. Standard za određivanje molekularne mase DNA.....	24
3.1.5. Puferi, otopine i mediji .....	24
3.1.6. Početnice.....	26
3.1.7. Programi za računalne analize .....	28
3.2. Biljni materijal za utvrđivanje prisutnosti ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze.....	28
3.3. Biljni materijal za biološku karakterizaciju GLRaV-3 .....	30
3.3.1. Postupak ukorjenjivanja reznica.....	30
3.3.2. Njegovanje biljaka .....	31
3.3.3. Inokuliranje sorti vinove loze odabranim inokulumima koji sadrže GLRaV-3.....	32
3.4. Serološke analize.....	33
3.5. Molekularne analize .....	35
3.5.1. Izolacija ukupne RNA iz vinove loze.....	35
3.5.2. Reverzna transkripcija .....	37
3.5.3. Detekcija virusnih gena lančanom reakcijom polimerazom .....	38
3.5.4. Molekularna karakterizacija izolata virusa uvijenosti lista vinove loze 3 .....	40
3.5.5. Relativna kvantifikacija virusa .....	44

3.6. Morfološki i fiziološki pokazatelji .....	47
3.6.1. Pojavnost i intenzitet simptoma.....	47
3.6.2. Mjerenje porasta biljke.....	47
3.6.3. Permeabilnost membrane .....	47
3.6.4. Relativni sadržaj vode .....	48
3.6.5. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata .....	48
3.6.6. Određivanje sadržaja prolina .....	49
3.7. Statistička obrada rezultata .....	50
3.7.1. Statistička obrada rezultata dobivenih relativnom kvantifikacijom virusa.....	50
3.7.2. Statistička obrada rezultata morfoloških i fizioloških pokazatelja .....	51
4. REZULTATI.....	53
4.1. Pojavnost najznačajnijih virusa vinove loze u uzorcima autohtonih dalmatinskih sorti .....	53
4.1.1. Serološka detekcija osam ekonomski najznačajnijih virusa u odabranim uzorcima autohtonih dalmatinskih sorti .....	53
4.1.2. Pojavnost deset ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze utvrđena molekularnim metodama .....	54
4.1.3. Usporedna analiza rezultata dobivenih preliminarnim serološkim istraživanjem i reakcijom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom s više parova početnica .....	59
4.2. Populacijska raznolikost virusa uvijenosti lista vinove loze 3 .....	61
4.2.1. Umnažanje dijela genomske regije HSP70h GLRaV-3.....	61
4.2.2. Detekcija različitih genomskih varijanti virusa GLRaV-3 .....	61
4.3. Biološka karakterizacija izolata koji sadrže GLRaV-3 u kontroliranim uvjetima na sortama vinove loze.....	67
4.3.1. Uspješnost zaraze cijepljenjem „na zeleno" različitim inokulumima koji sadrže GLRaV-3 ..	67
4.3.2. Relativna kvantifikacija virusa kod odabranih sorti u kontroliranom pokusu u stakleniku ..	68
4.3.3. Rezultati analiza fizioloških i morfoloških parametara u različitim sortama vinove loze ....	80
5. RASPRAVA.....	91
6. ZAKLJUČCI.....	104
7. POPIS LITERATURE .....	105
8. ŽIVOTOPIS.....	122
PRILOZI .....	I
Prilog 1. ....	I
Prilog 2. ....	V
Prilog 3. ....	VI
Prilog 4. ....	X
Prilog 5. ....	XI
Prilog 6. ....	XVII

## 1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura u svijetu. Tijekom dugotrajne kultivacije, koegzistira s brojnim patogenima te se smatra višegodišnjom kulturom najpodložnijom virozama s više od 80 identificiranih virusnih vrsta (Fuchs, 2020). Od opisanih viroza dosada su kao ekonomski najznačajnije izdvojene: kompleks infektivne degeneracije, uvijenost lista, jamičavost drva i pjegavost lista podloge (Martelli, 2017). Virus uvijenosti lista vinove loze 3 (*grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3) je najvažniji uzročnik bolesti uvijenosti lista i općenito jedan od najznačajnijih virusa vinove loze (Maree *i sur.*, 2013). Ovaj pripadnik roda *Ampelovirus* (Martelli, 2019) iz porodice *Closteroviridae* prisutan je u svim značajnim vinogradarskim područjima, gdje se rasprostranio vegetativnim razmnožavanjem zaraženim reznicama (Naidu *i sur.*, 2015). Na kraćim udaljenostima, unutar vinogradarskog područja, uglavnom se prenosi insektnim vektorima iz porodica *Pseudococcidae* i *Coccidae* (Almeida *i sur.*, 2013).

Biologija GLRaV-3, interakcije s domaćinskom biljkom, okolišni faktori, eventualna prisutnost drugih virusa te interakcije koje se odvijaju tijekom infekcije, određuju konačni oblik i intenzitet simptoma na domaćinskoj biljci (Martelli, 2009). Karakteristični simptomi zaraze virusom GLRaV-3 najjasnije se očituju kod crnih sorti gdje se prvo javlja crvenilo u međuzilnom prostoru lista u ljetnim mjesecima, a s napretkom vegetacijske sezone list se postupno uvija prema svom naličju. Od ostalih promjena u fiziologiji vinove loze opisani su poremećaji u biosintezi ugljikohidrata, organskih kiselina i polifenolnih spojeva (Naidu *i sur.*, 2014; Alabi *i sur.*, 2016). S vremenom zaražena biljka fiziološki slabi, zaostaje u razvoju, smanjenog je prinosa i kvalitete grožđa te joj je u konačnosti smanjen životni vijek (Martelli, 2001).

Sastav virusne populacije, kao i različite virusne varijante unutar izolata, neovisno o njihovoj zastupljenosti, mogu također imati važan utjecaj na razvoj simptoma bolesti (Černi *i sur.*, 2008). Molekularna raznolikost RNA virusa, pa tako i GLRaV-3, posljedica je velike stope replikacije virusa i nemogućnosti popravka grešaka virusne RNA ovisne RNA polimeraze (RdRP) (Domingo *i sur.*, 2006). U bazi NCBI dostupno je preko 40 potpunih sekvenci genoma GLRaV-3 koji su svrstani u osam osnovnih filogenijskih skupina (Diaz-Lara *i sur.*, 2018). Iako je kod jednog drugog virusa iz porodice *Closteroviridae* dokazana povezanost zaraze specifičnom

varijantom virusa i odgovora domaćina (Černi *i sur.*, 2008; Hančević *i sur.*, 2013), na GLRaV-3 do sada nisu provedena sustavna istraživanja ove problematike (Maree *i sur.*, 2013).

Dosadašnja istraživanja vinove loze *in situ* u Republici Hrvatskoj, bazirana na serološkim (Karoglan Kontić *i sur.*, 2009; Vončina *i sur.*, 2019) i molekularnim metodama (Vončina *i sur.*, 2017; Hančević *i sur.*, 2021; Čarija *i sur.*, 2022) ukazuju na vrlo loše sanitarno stanje vinove loze. Zabilježena je dominantna prisutnost GLRaV-3 u odnosu na ostale viruse, prisutne su različite virusne varijante, učestale koinfekcije GLRaV-3 s više virusa iz skupina koje uzrokuju infektivnu degeneraciju, prisutna je uvijenost lista i jamičavost drva u autohtonim dalmatinskim sortama, a slično stanje nalazimo i u drugim mediteranskim zemljama (Digiario *i sur.*, 2000; Rizzo *i sur.*, 2015).

Metodologija koja se primjenjuje u proučavanju virusnih infekcija vinove loze prvenstveno nam omogućava preciznu detekciju virusnih uzročnika oboljenja, a tu se posebno ističu serološke metode, uglavnom ELISA test (*enzyme-linked immunosorbent assay*; Clark i Adams, 1977), te metode otkrivanja virusne RNA koje omogućuju detekciju virusa prisutnih u malom broju kopija (Gambino i Gribaudo, 2006; Hančević *i sur.*, 2021). Pri genotipizaciji GLRaV-3 nužno je utvrđivanje nukleotidnog slijeda, a često je potrebna i karakterizacija populacijske strukture pojedinih izolata, što je važno u predviđanju njegovog patogenog potencijala tj. u identifikaciji varijanti veće virulencije. Istraživanja virusnih varijanti standardnim pristupom podrazumijevaju primjenu metode lančane reakcije polimerazom (*polymerase chain reaction* - PCR) zajedno s kloniranjem dobivenih produkata u bakterijske stanice te identifikaciju razdvojenih varijanti metodom polimorfizma konformacija jednolančane DNA (*single-strand conformation polymorphism* – SSCP), nakon čega slijedi određivanje nukleotidnog slijeda te filogenijska analiza (Turturo *i sur.*, 2005; Černi *i sur.*, 2009; Jooste *i sur.*, 2011; Hančević *i sur.*, 2021; Čarija *i sur.*, 2022). Uz primjenu u detekciji, metoda kvantitativne lančane reakcije polimerazom (*quantitative PCR* - qPCR), omogućuje i kvantifikaciju virusa u zaraženoj biljci (Pacifico *i sur.*, 2011; Bester *i sur.*, 2014), što može biti koristan alat u proučavanju tijeka infekcije i eventualnoj identifikaciji virusnih varijanti analizom krivulje disocijacije amplikona (*high resolution melting curve analysis* - HRM; Bester *i sur.*, 2012).

## 1.1. Cilj istraživanja

Glavni cilj ove doktorske disertacije je molekularna i biološka karakterizacija virusa uvijenosti lista vinove loze 3 u samostalnim i miješanim virusnim infekcijama u autohtonim dalmatinskim sortama vinove loze s naglaskom na našu najznačajniju crnu sortu 'Plavac Mali'. Dug životni vijek i tradicionalan način uzgoja vinove loze u Dalmaciji utemeljen na autohtonim sortama preduvjeti su za pojavu čestih virusnih infekcija. Prvi dio istraživanja obuhvaćen ovom doktorskom disertacijom bazirat će se na istraživanju pojavnosti 10 najznačajnijih virusa vinove loze te definiranju njihovih najčešćih kombinacija u autohtonim sortama. U tu svrhu, obraditi ću dvije skupine uzoraka. Uzorke 16 autohtonih sorata vinove loze s područja Dalmacije ću preliminarno testirati serološkim testom ELISA, a konačnu potvrdu prisutnosti virusa će provesti metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR). Posebno ću obraditi i uzorke klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' koje ću testirati na prisutnost virusa PCR utemeljenom metodom. Uslijed veće osjetljivost molekularnih testova očekuje se pouzdanija detekcija različitih virusa vinove loze RT-PCR metodom. Jedna od glavnih hipoteza ovog istraživanja je široka rasprostranjenost analiziranih virusa, a naročito GLRaV-3 u autohtonim dalmatinskim sortama vinove loze, kao samostalnog patogena ili u koinfekciji s drugim ekonomski značajnim virusima.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja je utvrđivanje populacijske strukture GLRaV-3 u autohtonim dalmatinskim sortama. Vinova loza, jednom zaražena virusom GLRaV-3, ostaje trajno zaražena tijekom cijelog svog životnog vijeka. Dugotrajnost infekcije, široka rasprostranjenost GLRaV-3 i nagomilavanje pogrešaka pri replikaciji RNA genoma virusa, kao posljedica nemogućnosti popravka grešaka RdRP, može dovesti do formiranja novih varijanti različitih bioloških svojstava. U tu svrhu, analizirat ću populacijsku strukturu GLRaV-3 temeljem nukleotidnog slijeda genomske regije homologa proteina toplinskog šoka (HSP70h), važnog u formiranju „glave“ viriona i kretanju virusa između stanica, na odabranim uzorcima autohtonih dalmatinskih sorti vinove loze s posebnim naglaskom na 'Plavac Mali' u kojima je prethodno potvrđena zaraza virusom GLRaV-3.

Kako bih istražio utjecaj virusne populacije i domaćinske biljke na replikaciju GLRaV-3, najučestalije kombinacije GLRaV-3 s drugim ekonomski značajnim virusima koje su ranije detektirane preglednim istraživanjem sanitarnog stanja vinove loze, bit će prenesene na

standardne indikatorske sorte vinove loze ('Cabernet Franc', 'Pinot Noir', 'Merlot'; Martelli, 1993) i na autohtonu sortu 'Tribidrag'. Kroz različite fenološke faze pratit ću dinamiku replikacije GLRaV-3 u samostalnoj infekciji i koinfekciji metodom kvantitativnog PCR-a (qPCR). Uslijed nepostojanja specifičnih početnica za kvantifikaciju različitih genotipova virusa GLRaV-3 prisutnih u koinfekciji u ovu će svrhu ću provesti analizu krivulja disocijacije virusnih amplikona (*high resolution melt curve analysis* - HRM). Usporedno ću na biljkama pratiti pojavu i intenzitet simptoma te ću i analizirati relativan sadržaj vode, permeabilnost membrane, sadržaj fotosintetskih pigmenata i prolina te porast biljke. Polazna hipoteza ovog dijela istraživanja je da su tip i intenzitet simptoma virusne infekcije ovisni o sastavu virusnog inokuluma i odgovoru domaćinske biljke, pri čemu će standardni indikatori pokazati karakteristične simptome zaraze.

Zbog velikih ekonomskih gubitaka koje uzrokuje GLRaV-3 i razjašnjavanja nedosljednosti interakcija virus-biljka, ovo istraživanje je od globalnog značaja te može pomoći doprinijeti razumijevanju i predviđanju epidemijskih scenarija.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Bolest uvijenosti lista vinove loze i njezini uzročnici

Bolest uvijenosti lista vinove loze predstavlja najvažniju virozu vinove loze zbog štetnih posljedica koje uzrokuje na vinovoj lozi (Naidu *i sur.*, 2008), i široke rasprostranjenosti. Prisutnost bolesti je dokazana u svim područjima svijeta gdje se komercijalno uzgaja vinova loza (Almeida *i sur.*, 2013). Smatra se da bolest uvijenosti lista vinove loze potječe iz Starog svijeta gdje opise simptomatologije nalazimo u talijanskoj i francuskoj literaturi s početka 20. stoljeća (Maree *i sur.*, 2013). Nadalje, u prikupljenim herbarijskim uzorcima vinove loze sa Sicilije krajem 19. stoljeća Martelli i Piro (1975) su opisali simptome povezane s ovom bolesti vinove loze. Etiologija bolesti je bila nepoznata sve dok Namba *i sur.* (1979) nisu elektronskim mikroskopom detektirali i opisali duge filamentozne virusne čestice u presjeku floema loza s izraženim simptomima te je tada definitivno potvrđeno da je uzročnik ove bolesti virusnog podrijetla.

Dosada je definirano nekoliko virusa iz porodice *Closteroviridae* povezanih s ovom bolesti, a kao glavni uzročnik je definiran virus uvijenosti lista vinove loze 3 (*grapevine leafroll-associated virus 3*; GLRaV-3; Maree *i sur.*, 2013). GLRaV-3 prema važećoj taksonomskoj podjeli spada u rod *Ampelovirus* unutar porodice *Closteroviridae*. Dosada je utvrđena njegova pojavnost u svim važnijim vinorodnim područjima kao i njegova povezanost s intenzivnim simptomima bolesti uvijenosti lista na vinovoj lozi te posljedično značajnih ekonomskih šteta (Atallah *i sur.*, 2012; Martelli, 2014; Song *i sur.*, 2021). Zbog ovog razloga GLRaV-3 je najbolje istražen od svih uzročnika bolesti uvijenosti lista (Song *i sur.*, 2021).

Od ostalih uzročnika ove bolesti ističe se virus uvijenosti lista vinove loze 1 (GLRaV-1, rod *Ampelovirus*), koji je, kao i GLRaV-3, prisutan globalno te je njegova povezanost sa simptomima na vinovoj lozi značajna iako, kao i u slučaju GLRaV-3, njegovi učinci na fiziologiju vinove loze još nisu dovoljno istraženi (Naidu, 2017). Virus uvijenosti lista vinove loze 2 (GLRaV-2; rod *Closterovirus*) također spada u uzročnike bolesti uvijenosti lista, iako je u većoj mjeri naglašena njegova povezanost sa smanjenom uspješnosti cijepjenja u rasadničkoj proizvodnji (Bertazzon *i sur.*, 2010). Od ostalih virusa, uzročnika bolesti uvijenosti lista dosada su opisani virus uvijenosti lista vinove loze -4, -7 i -13 (GLRaV-4, -7 i -13) na temelju njihovog nukleotidnog slijeda i organizacije genoma, ali nije utvrđena jasna povezanost između

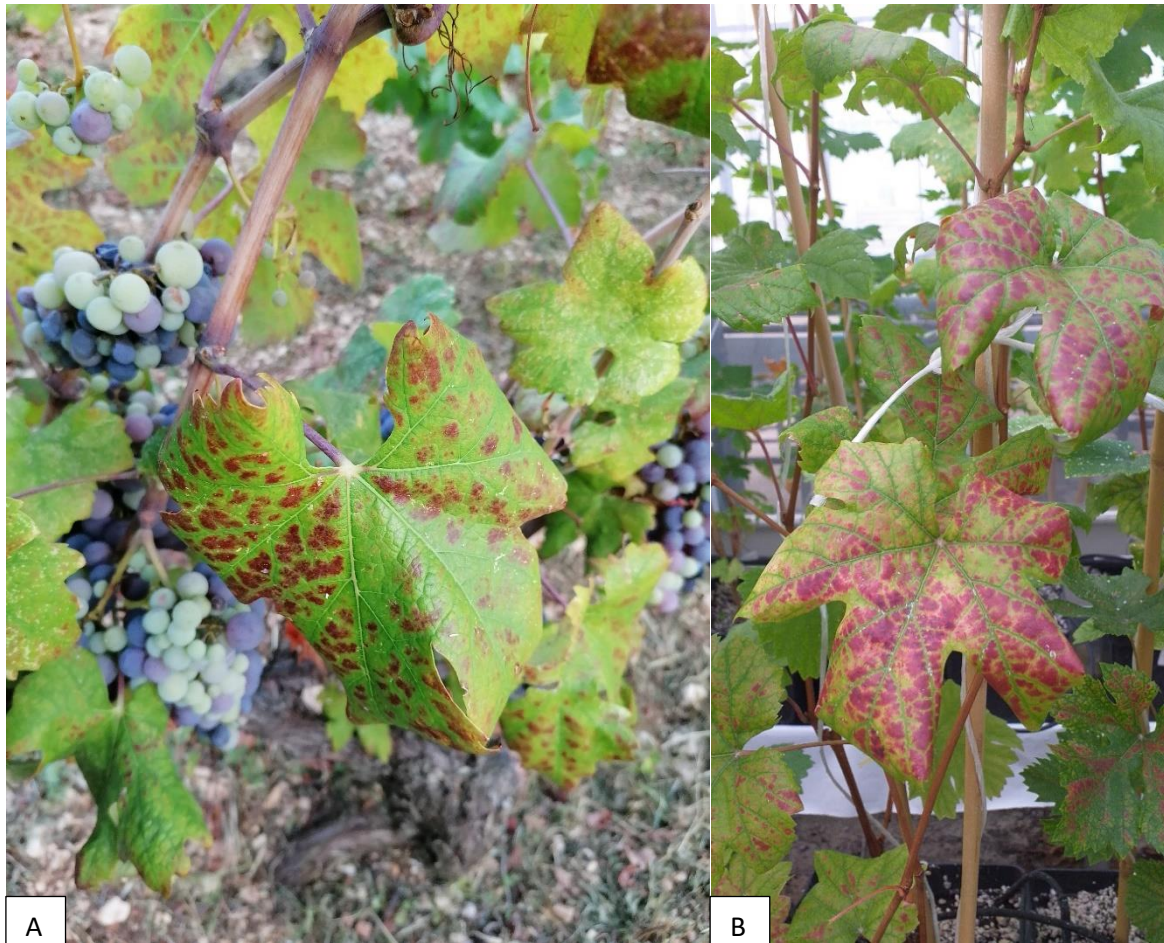
prisutnosti navedenih virusa i izazivanja simptoma kod domaćina roda *Vitis* (Martelli *i sur.*, 2012; Ito i Nakaune, 2016; Martelli, 2019).

Uslijed milijunskih površina pod vinogradima i globalnog širenja uzgoja vinove loze, sve više se raspravlja o negativnim posljedicama koje virusna oboljenja imaju na postizanje uniformnih nasada koji daju grožđe visoke kvalitete. U tom kontekstu posebno se ističe bolest uvijenosti lista vinove loze čiji su štetni efekti gotovo usporedivi s gljivičnim oboljenjima (Naidu *i sur.*, 2014; Armijo *i sur.*, 2016). Ekonomske procjene kumulativnih višegodišnjih gubitaka koje uzrokuje zaraza virusima uvijenosti lista u vinogradu starom 25 godine kreću se između 25000-40000 USD po hektaru (Atallah *i sur.*, 2012) uz 50 % smanjenje prinosa i 10 % smanjenje kvalitete. Zbog kompleksnosti ove bolesti i brojnih faktora koji definiraju intenzitet simptoma kao što su klima uzgojnog područja, sorta vinove loze, podloga i sastav virusnog inokuluma (Martelli, 2009), naše znanje o ovoj bolesti još je uvijek ograničeno (Naidu *i sur.*, 2014).

## **2.2. Simptomi GLRaV- 3 i ostalih uzročnika bolesti uvijenosti lista**

Naidu *i sur.* (2014) navode da samo sorte *Vitis vinifera* i neke azijske vrste (*Vitis coignetiae*) pokazuju karakteristične simptome zaraze bolesti uvijenosti lista vinove loze (Slika 1.), dok je zaraza američkih vrsta (*V. rupestris*, *V. labrusca*, *V. berlandieri* i *V. riparia*) bez simptoma. Karakteristični simptomi ove bolesti javljaju se kod vinove loze u razdoblju nakon „šare“ (fra. *véraison*) tj. nastupom promjena u boji kože grožđa gdje na starijem lišću crnih sorti dolazi do crvenila u međužilnom prostoru. S odmakom vegetacijske sezone crvenilo postaje sve izraženije, a simptomatični listovi se postupno uvijaju prema svom naličju te uvijenost postaje najizraženija u razdoblju kasnog ljeta. U toj fazi kod crnih sorti list može biti već u potpunosti crven, dok lisne žile ostaju zelene. Kod bijelih sorti nedostatak pigmenata antocijana u listovima ne izaziva pojavu crvenila, pa se umjesto njega rani simptomi mogu manifestirati pojavom klorotičnih pjega na listovima. Kod grozdova crnih sorti kao posljedica ove bolesti vidljiva je diskoloracija u grozdu zbog nejednolikog dozrijevanja.





Slika 1. Karakteristični simptomi bolesti uvijenosti lista vinove loze na (A) sorti 'Plavac Mali' u vinogradu (fotografija: Mate Čarija), (B) sorti 'Pinot Noir' u uvjetima staklenika (fotografija: Katarina Hančević).

Osim razlika u pojavi i ekspresiji simptoma između crnih i bijelih sorti, postoje velike razlike u ekspresiji simptoma između pojedinih sorti, gdje crne sorte pokazuju jače simptome u odnosu na bijele. Kod bijelih sorti najizraženiji simptomi uvijanja listova su opisani kod sorte 'Chardonnay' (Naidu *i sur.*, 2014). Nadalje, pojava varijabilnost u ekspresiji simptoma unutar iste sorte promatrane u različitim uvjetima govori o kompleksnosti interakcija koje sudjeluju u formiranju simptoma (Constable *i sur.*, 2013). Iako je GLRaV-3 izdvojen kao glavni uzročnik bolesti uvijenosti lista (Maree *i sur.*, 2013), ova bolest ima veći broj uzročnika te se osim biološkog testiranja cijepljenjem potencijalno zaražene biljke bezvirusnom lozom preporuča provedba seroloških ili molekularnih testova za preciznu detekciju (Constable *i sur.*, 2013; Burger *i sur.*, 2017).

Karakteristični simptomi zaraze virusom GLRaV-3 su posljedica djelovanja virusa na stanične i fiziološke procese vinove loze gdje se posebno ističu poremećaji u metabolizmu šećera i antocijana (Song *i sur.*, 2021). Nakupljanje šećera u listovima direktna je posljedica djelovanja virusa koji onemogućava njihov transport iz lista. Posljedično dolazi do sinteze antocijana u listovima i daljnjih poremećaja u metabolizmu biljke vidljivih kroz smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata i fotosintetske aktivnosti u listu (Bertamini *i sur.*, 2004, 2005; Montero *i sur.*, 2016). Uslijed poremećenog transporta asimilata od mjesta njihove sinteze u listovima do grožđa, smanjen je udio ugljikohidrata u bobicama, što direktno utječe na sintezu antocijana, kao i povećanje ukupne kiselosti grožđa (Alabi *i sur.*, 2016). Poznato je da infekcija dovodi do promjena u parametrima oksidativnog stresa kod vinove loze (Cui *i sur.*, 2016; Hančević *i sur.*, 2023) i smanjenog sadržaja topljivih proteina (Bertamini *i sur.*, 2004). Sve promjene uzrokovane zarazom GLRaV-3 imaju za posljedicu smanjenu kondiciju biljke, što skraćuje životni vijek biljke, odnosno vinograda čime se dovodi u pitanje isplativost proizvodnje (Song *i sur.*, 2021). Iako postoje određene pravilnosti koje su utvrđene kod vinove loze zaražene s GLRaV-3, definiranje mehanizama koji prethode promjenama pojedinih fizioloških parametara još su u velikoj mjeri nepoznanica. Glavni uzroci tome leže upravo u kompleksnosti interakcija biljka-patogen-okoliš koji definiraju intenzitet i tip reakcija na prisutnost virusnog patogena (Martelli, 2009).

### **2.3. Rasprostranjivanje GLRaV-3**

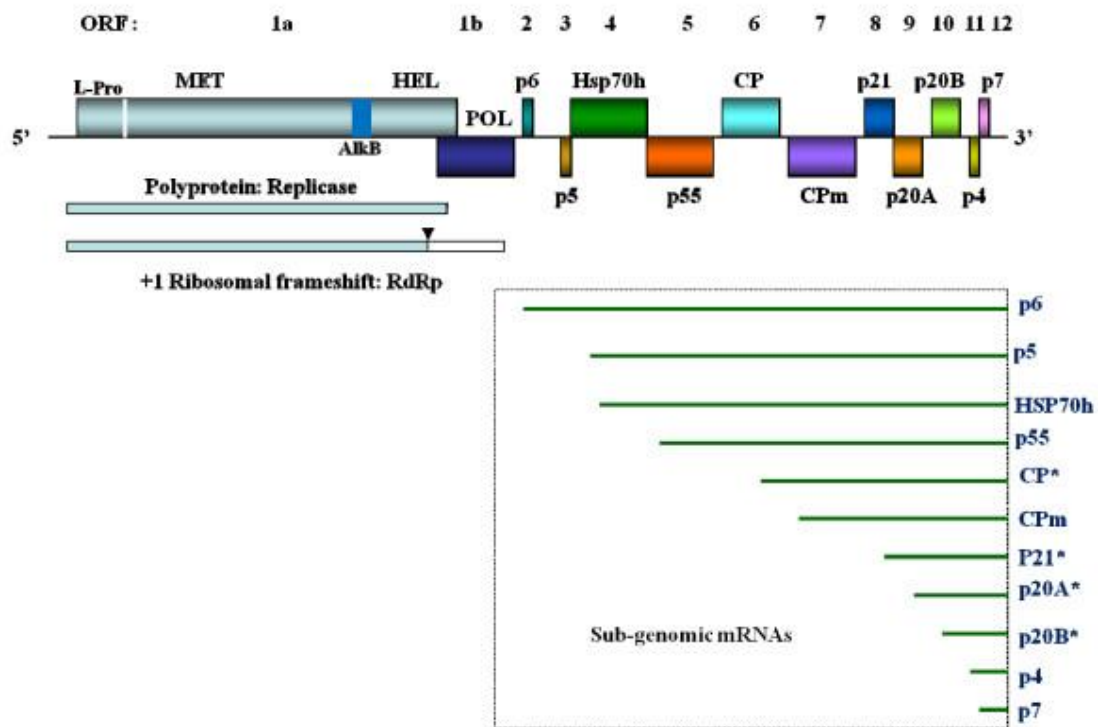
Virus GLRaV-3 rasprostranjuje se na kratke udaljenosti unutar proizvodnog područja (vinogorja) pomoću štitastih ušiju iz porodica *Coccidae* i *Pseudococcidae*. Svi virusi iz porodice *Clsteroviridae* prenose se vektorima semiperzistentno (Karasev, 2000; Tsai *i sur.*, 2008), a postoje razlike u efikasnosti prijenosa među različitim vektorima (Almeida *i sur.*, 2013). Štitaste uši karakterizira spolni dimorfizam. Ženke imaju usni aparat prilagođen sisanju te mogu prenositi viruse, ali nemaju sposobnost letenja, dok mužjaci mogu letjeti, ali ne i prenositi viruse (Vea i Grimaldi, 2016). Od dokazanih vektora prijenosnika GLRaV-3 najveća efikasnost je zabilježena kod zvjezdaste štitaraste uši (*Pseudococcus longispinus*; Almeida *i sur.*, 2013), a slijedi je smokvin crvac (*Planococcus ficus*; Tsai *i sur.*, 2008) i javorova štitarasta uš (*Phenacoccus aceris*; Almeida *i sur.*, 2013). Studija u Južnoafričkoj Republici dokazala je da u vinogradu s ponekim zaraženim trsom, uslijed vektorskog prijenosa, godišnje se broj zaraženih trsova poveća 1,94 puta (Almeida *i sur.*, 2013 prema Pietersen, 2006). Također su utvrđene

razlike između pojedinih generacija štitastih ušiju u efikasnosti prijenosa pa tako Mahfoudhi *i sur.* (2009) navode veću efikasnost prijenosa kod ličinki prve i druge generacije u odnosu na odrasle oblike *Planococcus ficus*. S obzirom da su ženke štitastih ušiju spore u kretanju kroz vinograd jer nemaju sposobnost letenja, njihovo rasprostranjivanje unutar vinograda je potpomognuto vjetrom, mravima i čovjekom koji ih može prenijeti tijekom obavljanja ampelotehničkih zahvata u vinogradu (Burger *i sur.*, 2017).

Drugi značajan način rasprostranjivanja virusa, pogotovo na veće udaljenosti, primjerice između proizvodnih područja, regija i država, je posljedica upotrebe zaraženih reznica. Prilikom podizanja novih nasada ili zamjene dotrajalih trsova vrlo često se upotrebljavaju reznice neprovjerenog sanitarnog statusa čime se povećava rizik rasprostranjivanja virusa. Iz navedenog razloga upotreba certificiranog sadnog materijala predstavlja najvažniji preduvjet u sprječavanju rasprostranjivanja virusa vinove loze (EPPO *Bulletin*, 2008; Maree *i sur.*, 2013; Naidu *i sur.*, 2015).

#### **2.4. Organizacija genoma GLRaV-3**

Genom GLRaV-3 je jednolančana RNA pozitivnog smisla (+RNA) dugačka oko 18,5 kilobaza podijeljena u 13 otvorenih okvira čitanja (*open reading frame* - ORF; Slika 2.). Na 5' kraju genoma smješteni su ORF1a i ORF1b koji kodiraju vodeću (*leading*) proteazu nalik papainu, metiltransferazu, helikazu i RNA ovisnu RNA polimerazu (RdRP), uz pomak okvira čitanja prilikom translacije RdRP-a. U ovoj regiji se nalazi i alkilirajuća domena (AlkB) za koju se pretpostavlja da sudjeluje u RNA demetilaciji i popravku RNA (Van den Born *i sur.*, 2008). Vodeća proteaza nalik papainu ima ulogu u akumulaciji RNA molekula i sistemskom rasprostranjivanju virusa kako je dokazano u srodnih klosterovirusa poput virusa žutice šećerne repe (*beet yellows virus* – BYV) i GLRaV-2 (Peng *i sur.*, 2001; Liu *i sur.*, 2009). Preostali ORF-ovi (2-13) repliciraju se preko subgenomskih RNA (sgRNA), a kodiraju redom proteine: p6, p5, HSP70h, p55, CP, CPm, p21, p20A, p20B, p4 i p7. Uloga p6 proteina je nepoznata, a zanimljivo je da nije prisutan u svim izolatima GLRaV-3 (Bester *i sur.*, 2012b).



Slika 2. Organizacija genoma virusa uvijenosti lista vinove loze 3, kao i subgenomskih RNA koje se sintetiziraju u procesu replikacije genoma. Slika je preuzeta iz Maree *i sur.* (2013).

Genomske regije (ORF 3-7) koje kodiraju redom proteine p5, HSP70h, p55, CP i CPm sačinjavaju takozvani „quintuple gene block“. Ovaj blok tj. cjelina od pet proteina karakterističan je za sve filamentozne viruse porodice *Closteroviridae* (Dolja *i sur.*, 2006). Poznato je da je p5 mali transmembranski protein koji ima ulogu kod kretanja virusa između stanica, a usmjeren je na endoplazmatski retikulum. ORF 4 kodira protein HSP70h, homolog biljnog proteina toplinskog šoka, koji sudjeluje u formiranju „glave“ viriona i kretanju između stanica putem plazmodezmija. ORF 5 kodira protein p55 koji ima ista svojstva kao i HSP70h te se pretpostavlja da ova dva proteina sudjeluju zajedno u kretanju virusa i formiranju „glave“ viriona. Kapsidni protein, CP (produkt ORF 6) obavlja glavnu ulogu u kretanju virusa, dok je CPm (produkt ORF 7) manji kapsidni protein koji obavlja „glavu“ viriona smještenu na 5'-kraju. Osim ove uloge, CP i CPm također sudjeluju u kretanju viriona između stanica. Uloga produkata preostalih ORF-ova (ORF 8-12) zasada nije jasno definirana iako su njihovi proteini karakteristični za rod *Ampelovirus*. Poznato je da p20B sudjeluje u utišavanju obrambenog odgovora domaćina (Gouveia *i sur.*, 2012). ORF-ovi 11 i 12 kodiraju male proteine, različite između pojedinih izolata te se smatra da nemaju konzerviranu ulogu.

## 2.5. Replikacija GLRaV-3

GLRaV-3 posjeduje mehanizam replikacije karakterističan za sve +RNA viruse. Replikacija virusa je složen proces koji započinje ulaskom virusa u stanicu uslijed mehaničkog oštećenja tkiva domaćina, što se u prirodi događa uglavnom putem vektora. Sam proces replikacije se može podijeliti u četiri koraka: proces svlačenja kapside za izlaganje virusa replikacijskoj/translacijskoj mašineriji stanice, sinteza strukturnih i nestrukturnih proteina, replikacija genoma i inkapsidacija, tj. sastavljanje novih virusnih čestica (Dolja *i sur.*, 2006). ORF 1a i 1b kodiraju proteine replikacijskog kompleksa čija se translacija odvija direktno s genomske RNA uz pomak okvira čitanja prilikom translacije RdRP. Replikacija genoma u prvom koraku se odvija tako da se od genomske +RNA sintetizira komplementarna RNA negativnog smisla (-RNA) koja služi kasnije kao kalup za sintezu novih genomskih i subgenomskih +RNA. ORFovi 2-12 se eksprimiraju preko sgRNA koje su 3' kolinearne s genomskom RNA i služe kao monocistronske mRNA za translaciju odgovarajuće genomske regije. Većina podataka o replikaciji GLRaV-3 proizlazi iz studija homolognih proteina provedenih na srodnim virusima (Naidu *i sur.*, 2015) te je razumijevanje replikacije GLRaV-3 na molekularnom nivou još uvijek nedovoljno (Naidu *i sur.*, 2015). Potencijalnom rasvjetljavanju mehanizama bi trebalo doprinijeti konstruiranje infektivnih klonova GLRaV-3 (Naidu *i sur.*, 2015), međutim, dosad je samo jednom, i to s djelomičnim uspjehom, ova metoda primijenjena u istraživanju GLRaV-3 (Jarugula *i sur.*, 2018).

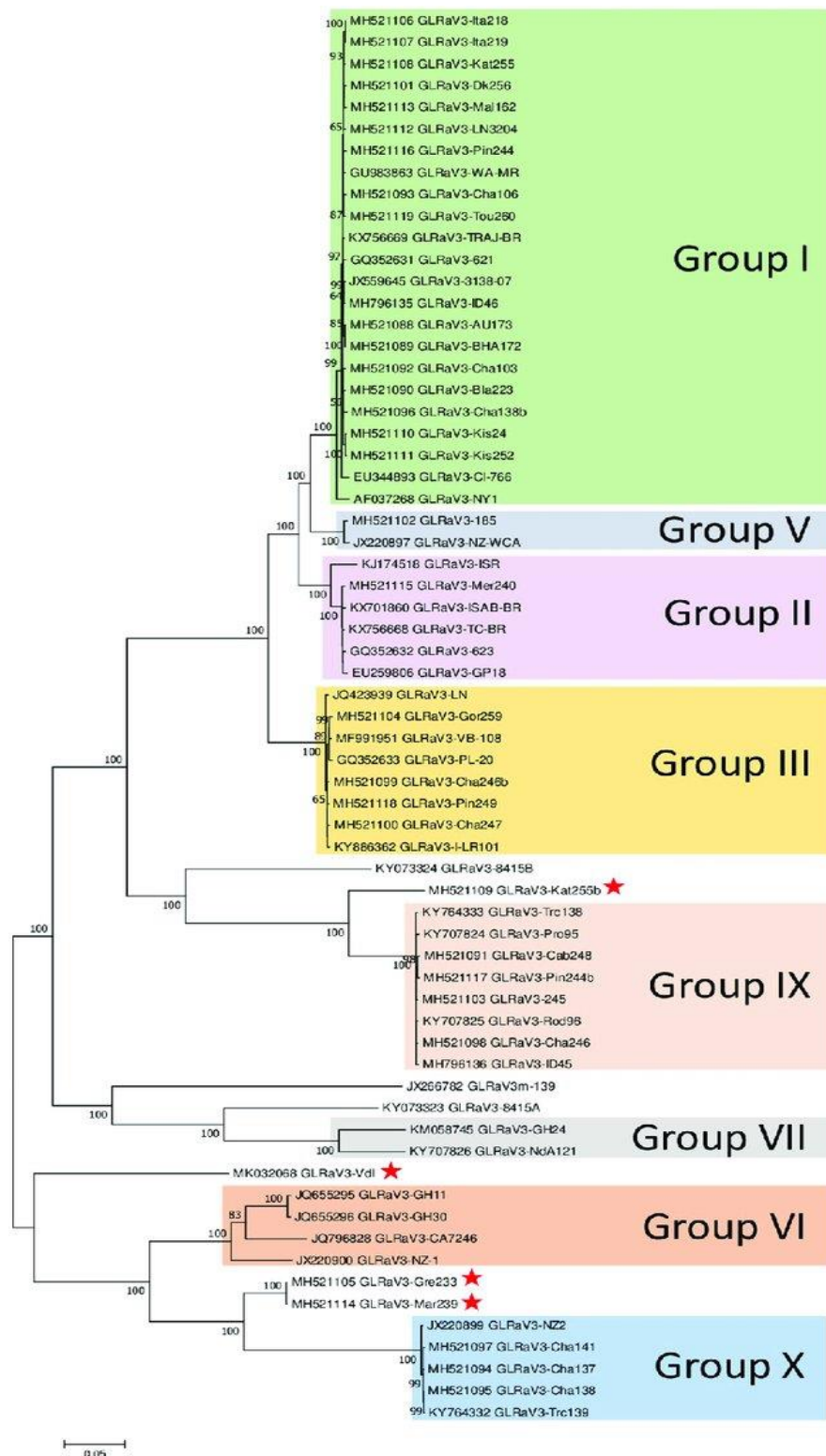
## 2.6. Genomska varijabilnost GLRaV-3

Virusi s RNA genomom, pa tako i GLRaV-3 formiraju kompleksne populacije različitih genomskih varijanti poznate kao „kvazivrste“. Nastanak novih varijanti direktna je posljedica visoke stope replikacije virusa i nemogućnosti popravka grešaka enzimom RdRP (Domingo *i sur.*, 2006). Kao posljedica brojnih mutacija, u kratkom vremenu unutar domaćina nastaju nove varijante virusa koje mogu rezultirati povećanjem virulencije. To može imati značajne ekonomske posljedice kako je dokazano kod srodnih virusa iz porodice *Closteroviridae* (Černi *i sur.*, 2008; Hančević *i sur.*, 2013). Uz mutacije, genskoj varijabilnosti GLRaV-3 mogu dodatno doprinijeti i rekombinacijski događaji između različitih virusnih varijanti prisutnih u koinfekciji (Farooq *i sur.*, 2013). Genomska varijabilnost kao posljedica mutacija i rekombinacija pod snažnim je utjecajem evolucijskih faktora: prirodne selekcije i genetičkog skretanja (*drift*;

Moya *i sur.*, 2004). Upravo ovi evolucijski događaji, usprkos varijabilnosti, razlog su relativne stabilnosti virusnih populacija koja je dokazana kod virusa iz porodice *Closteroviridae* kao posljedica interakcija s domaćinskom biljkom i vektorima (Rubio *i sur.*, 2013).

Dosada su u bazi GenBank objavljeni nukleotidni sljedovi čitavog genoma za više od 40 izolata GLRaV-3. Oni su na temelju filogenijskih analiza svrstani u osam osnovnih filogenijskih skupina (Slika 3.; Diaz-Lara *i sur.*, 2018). Kontinuirana istraživanja dovode do otkrića novih varijanti (Thompson *i sur.*, 2019) te će zasigurno u budućnosti biti potrebe za revizijom dosadašnjih srodstvenih odnosa. Razlike između pojedinih genomskih varijanti analiziranih do sada temelji se na razlikama u nukleotidnim sljedovima, ali i nejednakim duljinama između pojedinih genomskih regija (Jarugula *i sur.*, 2010; Bester *i sur.*, 2012b; Chooi *i sur.*, 2013). Promatrano na razini cjelokupnog genoma, moguća je razlika i više od 20 % u nukleotidnom slijedu pojedinih genomskih varijanti (Diaz-Lara *i sur.*, 2018), a prema podacima prezentiranim od istog autora najveće su razlike među filogenijskim skupinama I i VI (Slika 3.). Najsličnije varijante su one koje pripadaju filogenijskim skupinama I i II. One u ovisnosti o promatranoj genomskoj regiji mogu imati sličnost preko 95 % (Maree *i sur.*, 2013).

Globalna distribucija pojedinih genomskih varijanti GLRaV-3 se kontinuirano istražuje diljem svijeta još od prve studije koju su na temelju nukleotidnog slijeda triju genomskih regija (RdRP, CP i HSP70h) proveli Turturo *i sur.* (2005). U Portugalu i Kini su pronađeni predstavnici pet filogenijskih skupina temeljem razlika u nukleotidnom slijedu CP genomske regije GLRaV-3, uz najveću pojavnost varijante I (Gouveia *i sur.*, 2011; Farooq *i sur.*, 2013). U Kaliforniji (SAD), na temelju sekvenci iste genomske regije utvrđena je također najveća pojavnost varijante I, uz učestale koinfekcije s varijantama II i III (Sharma *i sur.*, 2011). Istraživanje provedeno u Južnoafričkoj Republici potvrdilo je prisutnost pet filogenijskih skupina (I, II, III, VI i VII), a dominantne su varijante iz skupina I i VI koje se učestalo javljaju u miješanim infekcijama (Jooste *i sur.*, 2015). Na Novom Zelandu utvrđena je najveća pojavnost varijanti iz skupina I i VII, uz visoku pojavnost varijanti skupine VI u pojedinim uzgojnim područjima (Chooi *i sur.*, 2013b). Iako postoji velik broj istraživanja na ovu temu generalni je zaključak da ne postoji jasna pravilnost u globalnoj distribuciji pojedinih varijanti te da distribucija varira između promatranih regija uzgoja (Burger *i sur.*, 2017).



Slika 3. Filogenijsko stablo za izolate virusa uvijenost lista vinove loze 3 (GLRaV-3) konstruirano na temelju sekvenci čitavih genoma s oznakama pripadnosti pojedinim filogenijskim skupinama. Izolati označeni crvenom zvijezdom ne pripadaju niti jednoj definiranoj filogenijskoj skupini. Slika preuzeta iz Diaz-Lara *i sur.* (2018).

## 2.7. Detekcija i karakterizacija GLRaV-3

Povijesno gledano, vizualna detekcija predstavlja prvu metodu otkrivanja simptoma virusnih infekcija u zaraženim lozama, pa tako i uzročnika bolesti uvijenosti lista (Zherdev *i sur.*, 2018). Ova metoda u velikoj mjeri ovisi o iskustvu ocjenjivača, a njen glavni nedostatak je nemogućnost određivanja potencijalne zaraze kod biljaka bez vidljivih simptoma (Naidu *i sur.*, 2014). Biološko testiranje (indeksiranje) je metoda koja se danas primjenjuje pri određivanju bioloških značajki pojedinog virusa kao što su izazivanja simptoma na različitim domaćinima, a primjenjivala se i u detekciji virusa (Zherdev *i sur.* 2018). Primjenom biološkog testiranja u detekciji potencijalno zaražena biljka se cijepi zdravom indikatorskom biljkom za koju je poznato da ima najbolju ekspresiju simptoma te se radi vizualno promatranje u trajanju od dvije do tri godine u kontroliranim uvjetima (Maletić *i sur.*, 2008). Za biološko testiranje bolesti uvijenosti lista primjenjuju se crne indikatorske sorte vinove loze kao što su 'Cabernet Franc', 'Pinot Noir' i 'Merlot' (Martelli, 1993).

ELISA test (*enzyme-linked immunosorbent assay*), kao rutinski primjenjivana serološka metoda u detekciji virusa vinove loze predstavlja standard u masovnom testiranju (Rowhani *i sur.*, 1997; Naidu *i sur.*, 2014). Unatoč tome što se smatra jednostavnom i pouzdanom, njeni nedostaci su najbolje uočljivi pri niskim koncentracijama virusa kada se za pozitivan uzorak ne može detektirati signal tj. obojenje u jažicama mikrotitarske plitice (Weber *i sur.*, 2002; Bruisson *i sur.*, 2017). Nadalje, nepostojanje komercijalno ili istraživačima dostupnih dijagnostičkih antitijela za pojedini virus isključuje mogućnost testiranja uopće za taj određeni virus. Također, moguća je pojava križnih reakcija, odnosno nedovoljne specifičnosti pojedinih antitijela koji mogu reagirati s više od jednog virusa (Weber *i sur.*, 2002). Usprkos tome, ELISA test se zbog svoje jednostavnosti i primjenjivosti i dalje masovno primjenjuje u istraživanju prisutnosti virusa, a dostupnost velikog broja komercijalnih kompleta reagensa za viruse vinove loze doprinosi daljnjoj primjeni ovog testa.

Molekularne metode podrazumijevaju detekciju virusnih genoma ili njihovih dijelova. One nam prvenstveno omogućavaju preciznu detekciju virusne RNA, i to u značajno nižim koncentracijama nego kod ELISA testa. Smatra se da su ovakve analize 100 i 1000 puta osjetljivije u odnosu na serološke testove (Osman *i sur.*, 2008). Kod molekularnih metoda najčešće govorimo o različitim izvedbama lančane reakcije polimerazom (*polymerase chain*



*reaction* - PCR) kojima prethodi reakcija reverzne transkripcije (*reverse transcription* - RT) za RNA viruse. Ova metoda nam omogućava prvenstveno preciznu detekciju virusa u reakciji s jednim parom početnica (MacKenzie *i sur.*, 1997; Saldarelli *i sur.*, 2015) ili u reakciji s više parova početnica za simultanu, tj. istovremenu detekciju većeg broja virusa (Gambino i Gribaudo, 2006; Fuchs *i sur.*, 2009). Kombinacijom RT-PCR metode s metodom polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (*single-strand conformation polymorphism analysis*- SSCP) provedena su brojna istraživanja o genomskoj varijabilnosti GLRaV-3 (Turturo *i sur.*, 2005; Jooste *i sur.*, 2010; Gouveia *i sur.*, 2011; Lehad *i sur.*, 2015; Hančević *i sur.*, 2021). Metoda reverzne transkripcije i kvantitativne lančane reakcije polimerazom (*quantitative polymerase chain reaction* – RT-qPCR) koristi posebno razvijene boje koje interkaliraju u PCR produkt, a prisutnost pojedinih virusa biva detektirana očitanjem fluorescencije na posebnom uređaju za PCR u stvarnom vremenu reakcije (Zherdev *i sur.*, 2018). Detekcija RT-qPCR metodom ima značajno veću osjetljivost od seroloških metoda, ali i klasičnog RT-PCR, čime postupno sve više dobiva na važnosti (Osman *i sur.*, 2008; Pacifico *i sur.*, 2011). Osim u detekciji, metoda RT-qPCR koristi se i u kvantifikaciji virusa u domaćinskoj biljci u stvarnom vremenu, što uvelike doprinosi rasvjetljavanju odnosa biljka-patogen (Boyd *i sur.*, 2012; Bester *i sur.*, 2014; Velasco *i sur.*, 2014).

Metode visokoprotočnog sekvenciranja (*high throughput sequencing* – HTS) nam omogućavaju preciznu detekciju i genotipizaciju svih patogena prisutnih u uzorku vinove loze (Zherdev *i sur.*, 2018). Primjenom ove metode u detekciji virusa vinove loze dovelo je prethodnih godina do značajnog porasta broja novootkrivenih virusa (Vončina i Almeida, 2018; Zherdev *i sur.*, 2018; Diaz-Lara *i sur.*, 2019) od kojih su neki izdvojeni kao posebno opasni za vinovu lozu (Cieniewicz *i sur.*, 2020). Ova metoda još uvijek nije u široj upotrebi zbog visoke cijene same analize, kao i potrebe za obradom dobivenih podataka složenim bioinformatičkim postupcima.

## 2.8. Ostali uzročnici značajnih virusnih bolesti vinove loze

### Infektivna degeneracija vinove loze

Zbog štetnih posljedica koje uzrokuju, infektivna degeneracija vinove loze se smatra jednom od najvažnijih viroza vinove loze (Maliogka *i sur.*, 2015). Prisutnost i simptomatologija ove bolesti je poznata u Starom svijetu odakle se i smatra da je potekla i bila prenesena u sve vinogradarske regije svijeta. (Martelli, 2017). Glavni uzročnici ove bolesti su virus lepezastosti lista (*grapevine fanleaf virus* - GFLV) i virus mozaika gušarke (*arabis mosaic virus* - ArMV). Oba virusa su pripadnici roda *Nepovirus*. Oni se rasprostranjuju semiperzistentno uz pomoć nematoda na manje udaljenosti, a na veće upotrebom zaraženog sadnog materijala (Martelli, 2017). Karakteristični simptomi se javljaju već u ranim ljetnim mjesecima, a očituju se na listovima gdje dolazi do asimetričnog rasta uz pojavu nazubljenih rubova lisne plojke i tu se formira list u obliku lepeze (Slika 4.). Kod rasta mladice dolazi do pojave fascijacije, dvostrukog grananja i takozvanog „cik-cak" rasta (Andret-Link *i sur.*, 2004). Grožđe isto biva značajno pogođeno ovom virozom koja uzrokuje deformiran rast grozda, smanjen udio šećera i titracijske kiselosti, a vinogradi imaju smanjen vijek trajanja što dovodi u pitanje isplativost proizvodnje (Andret-Link *i sur.*, 2004; Martelli, 2017).



Slika 4. Karakteristični folijarni simptomi zaraze virusima iz skupine infektivne degeneracije (lijevo) u usporedbi sa zdravim listom (desno) vinove loze. Slika preuzeta s: [shorturl.at/pxOR8](http://shorturl.at/pxOR8).

### Pjegavost lista podloge

Pjegavost lista podloge predstavlja virusu koja izaziva značajne štete u proizvodnji visokokvalitetnog sadnog materijala podloga vinove loze. Glavni uzročnik ove bolesti je virus pjegavosti lista podloge (*grapevine fleck virus*- GFkV) koji spada u rod *Maculavirus* (Sabanadzovic i sur., 2017). Simptomi se najbolje očituju na podlogama *Vitis rupestris* i njegovim križancima gdje dolazi do pjegavosti lista što može rezultirati uvijanjem lista prema licu i njegovim deformiranim rastom (Slika 5.; Martelli, 2017).



Slika 5. Karakteristični folijarni simptomi zaraze virusom pjegavosti lista podloge (GFkV) na podlozi Kober 5BB. Fotografija: Giovanni P. Martelli.

### Uzročnici jamičavosti drva vinove loze

Bolest jamičavost drva vinove loze (Slika 6.) predstavlja naziv za zbir simptoma opisanih na različitim indikatorima uslijed zaraze. U ovom kompleksu bolesti razlikujemo velik broj simptoma (Cvjetković i Mirošević, 2007) opisanih kao: jamičavost podloge *Rupestris du Lot* (*Rupestris stem pitting*), izljebljenost drveta podloge Kober (*Kober stem grooving*), plutavost kore vinove loze (*corky bark*) i izljebljenost hibrida LN-33 (*LN-33 stem grooving*). Od dosada jasno opisanih uzročnika pojedinog simptoma koji se javljaju na podlogama vinove loze potvrđeno je da virus vinove loze A (*grapevine virus A* - GVA) uzrokuje izljebljenost podloge Kober, a plutavost kore vinove loze virus vinove loze B (*grapevine virus B* - GVB). Naboranost drveta podloge *Rupestris du Lot* je uzrokovana virusom naboranosti drva te podloge (*grapevine Rupestris stem pitting-associated virus* - GRSPaV). Veliki broj novih virusa iz roda *Vitivirus* je otkriven u recentnom razdoblju primjenom visokoprotlačnog sekvenciranja (Diaz-Lara i sur., 2019), ali njihov utjecaj na domaćinsku biljku je još uvijek nepoznanica.



Slika 6. Karakteristični simptomi jamičavosti drva vinove loze. Fotografija: G.P. Martelli.

#### Novootkriveni štetni virusi vinove loze

Kontinuirana otkrića novih virusa na vinovoj lozi predstavljaju novu potencijalnu opasnost za ekonomski isplativu vinogradarsku proizvodnju. Među brojnim novootkrivenim virusima na vinovoj lozi, zbog svog dokazano štetnog utjecaja na biljku, ističu se *grapevine red blotch virus* (GRBV), *grapevine vein clearing virus* (GVCV) i *grapevine Pinot gris virus* (GPGV; Cieniewicz *i sur.*, 2020). I dok su prva dva uglavnom vezana za Sjevernu Ameriku, virus sivog pinota (*grapevine pinot gris virus* - GPGV), predstavnik roda *Trichovirus*, je virus vinove loze čije određene genomske varijante imaju potvrđen visoki patogeni potencijal u vidu štetnosti koje uzrokuje kod vinove loze na Europskom kontinentu (Saldarelli *i sur.*, 2015; Bertazzon *i sur.*, 2017). Smatra se da je GPGV uvezen iz Azije trgovinom sadnog materijala (Hily *i sur.*, 2020), a karakteristični simptomi koje uzrokuje su išaranost i deformiranost listova (Slika 7.), kao i zaostajanje u rastu (Vončina i Grozić, 2017).



Slika 7. Karakteristični simptomi zaraze virusom sivog pinota (GPGV). Fotografija preuzeta s: [shorturl.at/zSTY9](http://shorturl.at/zSTY9).

## **2.9. Strategije suzbijanja rasprostranjivanja GLRaV-3 i ostalih ekonomski značajnih virusa**

Suzbijanje rasprostranjivanja GLRaV-3 i ostalih ekonomski značajnih virusa predstavlja jedan od glavnih preduvjeta uspostavljanja zdravog i uniformnog vinograda koji će kontinuirano davati grožđe visoke kvalitete. Kod svih virusa vinove loze, pa tako i kod GLRaV-3, najvažnija je prevencija unosa virusa u vinograd upotrebom certificiranog sadnog materijala. Materijal treba biti iz provjerenih rasadnika u kojima se provodi kontinuirano promatranje i testiranje, uz primjerenu selekcijsku shemu (Naidu *i sur.*, 2014). Osim upotrebe zdravog sadnog materijala, važno je u već uspostavljenom vinogradu primjenjivati kontinuirane mjere praćenja pojavnosti simptoma, kao i suzbijanje vektora koji mogu biti prenosioci zaraze na zdrave trsove. Suzbijanje vektora provodi se različitim mjerama, od primjene repelenata i insekticida, kao i kontrole populacije mrava u vinogradima koji pridonose rasprostranjivanju štitastih ušiju kao vektora (Almeida *i sur.*, 2013). Kada se zaraza pojavi, teško ju je potpuno suzbiti. Kombinacijom izdvajanja zaraženih trsova vizualnom selekcijom i masovnim testiranjem, uz primjenu mjera suzbijanja vektora zarazu se može održavati na niskoj razini (Sokolsky *i sur.*, 2013).

U Republici Hrvatskoj za kontrolu virusa vinove loze na snazi je Direktiva Europske komisije 2005/43/EZ o stavljanju na tržište materijala za vegetativno umnažanje vinove loze. Ovom direktivom u matičnim nasadima je obavezna kontrola uzročnika infektivne degeneracije (GFLV i ArMV), uzročnika uvijenosti lista vinove loze (GLRaV-1 i GLRaV-3) te virusa pjegavosti vinove loze (GFkV) samo za podloge. Ukoliko se ovi virusi detektiraju u biljkama, one moraju biti isključene iz daljnje reprodukcije u matičnim nasadima.

## **2.10. Uzgoj vinove loze i istraživanje virusa vinove loze u Dalmaciji**

Vinova loza predstavlja jednu od najvažnijih poljoprivrednih kultura u Dalmaciji, regiji Republike Hrvatske, u čijem je uzgoju prisutna još od antičkog doba. Ovdje se razvila pod utjecajem doseljenika iz Grčke, a kasnija vladavina Rimskog Carstva daje dodatan poticaj razvoju vinogradarstva i vinarstva ovog područja (Maletić *i sur.*, 2015). Dolaskom Hrvata na ove prostore i njihovim prihvaćanjem vinogradarstva, te uslijed velike važnosti vina u crkvenim obredima, proizvodnja grožđa i vina se nastavlja. Tome svjedoče brojni povijesni zapisi između kojih se ističe Vinodolski zakonik iz 13. stoljeća u kojem su jasno definirani propisi u vinogradarskoj proizvodnji. U statutima svih važnijih dalmatinskih urbanih središta srednjeg vijeka (Splita, Zadra i Trogira) brojni su propisi vezani upravo za proizvodnju grožđa i vina koje je činilo značajni dio dohotka tih gradova. Najstariji spomen naših autohtonih sorti seže u 1385. godinu gdje liječnik Bartolo traži od Velikog vijeća Dubrovačke Republike da mu dopusti kupnju jedne kvinte (5,5 l) Malvasije ('Malvasija Dubrovačka'; Maletić *i sur.*, 2015).

Dalmatinsko vinogradarstvo doživljava svoj vrhunac u 19. stoljeću kada se u isto vrijeme u Europi pojavljuje trsov ušenac (*Viteus vitifoliae* Fitch) poznatiji kao filoksera. On uzrokuje propadanje vinogradarske proizvodnje u državama zapadne Europe, a potražnja za dalmatinskim vinima postaje značajno veća. Iako su podaci iz tog doba nepouzdana, generalno se smatra da je vrhunac dalmatinskog vinogradarstva postignut 1900. godine. Tada bilježimo 90 000 ha pod vinogradima (Bulić, 1949; Andabaka *i sur.*, 2016) kao posljedicu intenzivne sadnje nauštrb drugih poljoprivrednih kultura uslijed velike potražnje. Dolaskom filoksere u ove krajeve, kao i tada novih gljivičnih oboljenja (plamenjače i pepelnice), te političkim okolnostima (Vinska klauzula 1893. godine), dolazi do pada vinogradarske proizvodnje koja je rezultirala migracijom brojnog stanovništva u inozemstvo uslijed gubitka dohotka od ove kulture. Kasnije društvene okolnosti nisu doprinijele vraćanju vinogradarstva na razine s kraja

19 i početka 20. stoljeća. Zahvaljujući novim znanstvenim dostignućima u vinogradarstvu i vinarstvu, tek uspostavom neovisnosti u 90-im godinama prošlog stoljeća ponovno raste svijest o važnosti vinogradarstva, naročito onog baziranog na autohtonom sortimentu, koje postupno doživljava svoj oporavak.

Autohtone sorte regije Dalmacije su brojne i dobro opisane i to prvenstveno možemo zahvaliti Stjepanu Buliću, ampelografu s početka 20. stoljeća, koji je posvetio svoj životni rad prikupljanju i opisivanju sortimenta ovog područja. Ovaj rad rezultirao je kapitalnim djelom *Dalmatinska ampelografija*. To je svojevrsna enciklopedija dalmatinskih autohtonih sorata objavljena posthumno 1949. godine. U svojem djelu Bulić je opisao 200 različitih sorti koje su bile u uzgoju na ovom području, a od kojih su danas brojne nestale uslijed pojave filoksere i gljivičnih bolesti, kao i propadanja vinograda uslijed nepovoljnih socio-ekonomskih okolnosti. Danas je poznato 76 autohtonih genotipova s područja Dalmacije (Zdunić *i sur.*, 2013), a važnosti autohtonog sortimenta u prilog dodatno govori činjenica da je od svih crnih sorti u Republici Hrvatskoj upravo autohtona sorta 'Plavac Mali' i dalje najzastupljenija sorta (*Vinogradarski registar*, 2021).

Važnost očuvanja autohtonih sorti zbog njihove jedinstvenosti i potencijalnih izuzetnih svojstava u proizvodnom smislu prenosi se i na proučavanje virusnih bolesti koje su prisutne u vinovoj lozi. Prvo izvješće o prisutnosti uzročnika infektivne degeneracije vinove loze u Republici Hrvatskoj dolazi od Šarić i Corte (1959) iz uzoraka istarskih vinograda. Usporedno s početkom provođenja masovne klonske selekcije na autohtonim sortama u Republici Hrvatskoj dolazi i do prvih studija širih razmjera pojavnosti najznačajnijih viroza primjenom ELISA testa koje nam sve govore o visokoj stopi zaraze u autohtonom sortimentu, s posebnim naglaskom na autohtonim dalmatinskim sortama gdje je zabilježen najmanji broj ELISA negativnih biljaka, kao i najveća pojavnost virusa GLRaV-3 (Karoglan Kontić *i sur.*, 2009; Vončina *i sur.*, 2011, 2019; Zdunić *i sur.*, 2012). Uvođenjem molekularnih metoda u proučavanje virusa u autohtonom sortimentu dolazi do potvrde ovakvog zabrinjavajućeg stanja uslijed otkrivanja i drugih ekonomski značajnih virusa (Vončina *i sur.*, 2017; Hančević *i sur.*, 2021; Čarija *i sur.*, 2022). S potvrdom GLRaV-3 kao virusa s najvećom pojavnosti u autohtonim dalmatinskim sortama dolazi do prvih studija njegove genomske varijabilnosti gdje je pronađeno da dominira genomska varijanta II, uz nešto manju pojavnost genomske varijante I (Vončina *i sur.*, 2017; Hančević *i sur.*, 2021; Čarija *i sur.*, 2022). Također, Vončina *i*

sur. (2017) pronašli su uzorke u Kaštelanskom vinogorju koji su sadržavali i genomsku varijantu III kao raritetan pronalazak. Osim genotipizacije poznatih virusa vinove loze, u uzorcima autohtonih dalmatinskih sorti pronađen i jedan novi *Badnavirus (grapevine badnavirus 1;* Vončina i Almeida, 2018) primjenom metode HTS. Ovakvi pronalasci nam govore o kompleksnosti stanja virusnih patogena vinove loze u Republici Hrvatskoj, s posebnim naglaskom na autohtonim dalmatinskim sortama. Kako bismo razvijali vinogradarsku proizvodnju utemeljenu na autohtonim sortama nužno je uz sve ostale mjere provoditi i sustavnu kontrolu virusa, kao i osigurati dovoljnu količinu certificiranog sadnog materijala naših autohtonih sorti.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije, kompleti reagensa, enzimi, puferi i otopine

##### 3.1.1. Popis kemikalija

- agaroza, Sigma Chemical, SAD
- Agrilit 3, Perlite espansa Italiana, Italija
- akrilamid-bisakrilamid 29:1, Merck, SAD
- amonijev persulfat, Sigma Chemical, SAD
- ampicilin, Sigma Chemical, SAD
- $\beta$ -merkaptotanol, Acros Organics, SAD
- bakto-tripton, Biolife, Italija
- bromfenol-plavo, Sigma Chemical, SAD
- borna kiselina, Kemika, Hrvatska
- goveđi serumski albumin, Sigma Aldrich, SAD
- supstrat *Brill Substrate typical 5*, GmbH & Co.KG, Njemačka
- deoksinukleozid-trifosfati (dNTPs, svaki 100 mM), Promega, SAD
- dietanolamin, Carl Roth, Njemačka
- dinatrijev hidrogenfosfat, Gram-Mol, Hrvatska
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), Acros Organics, SAD
- ekstrakt kvasca, AppliChem Panreac, Njemačka
- etanol 100 %, Gram-Mol, Hrvatska
- etidijev bromid, Sigma Chemical, SAD
- formamid, Fluka Chemie, Švicarska
- formaldehid, Gram-Mol, Hrvatska
- fosforna kiselina 6 M, Gram-Mol, Hrvatska
- glukoza, Kemika, Hrvatska
- supstrat *Gramoflor sondermischung substrate*, GmbH & Co. KG, Njemačka
- gvanidinijev izotiocijanat, Thermo Scientific, SAD
- indol-3-maslačna kiselina (IBA), Sigma Aldrich, SAD
- izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid (IPTG), Sigma Aldrich, SAD
- kalcijev klorid, Gram-Mol, Hrvatska
- kvarcni pijesak, Lasselberger-Knauf, Hrvatska
- magnezijev klorid (25mM), Promega, SAD
- monokalijev fosfat, Gram-Mol, Hrvatska
- natrijev klorid, Gram-Mol, Hrvatska
- natrijev karbonat, Gram-Mol, Hrvatska
- natrijev tiosulfat, Gram-Mol, Hrvatska
- nitratna kiselina, Gram-Mol, Hrvatska
- nihidrin, Sigma Aldrich, SAD
- octena kiselina, T.T.T. doo, Hrvatska
- octena kiselina glacijalna, Sigma Aldrich, SAD

- polietilen glikol (MW 60000), Sigma Aldrich, SAD
- polivinil-pirolidon (K25), Sigma Aldrich, SAD
- prolin, Sigma Aldrich, SAD
- srebrov nitrat, Sigma Aldrich, SAD
- sulfosalicilna kiselina, Sigma Aldrich, SAD
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin), Fluka Chemie, Švicarska
- Tris (Tris(hidroksimetil)aminometan), Sigma Aldrich, SAD
- Tris-HCl, VWR Chemicals, SAD
- Tween 20, Sigma Aldrich, SAD
- X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktopiranozid), Fermentas, Litva

### 3.1.2. Kompleti reagensa

- *AgriTest Grapevine CS 6 virus SET*, Valenzano, Italija
- *AgriTest Grapevine GLRaV-2 ELISA*, Valenzano, Italija
- *AgriTest Grapevine GVB ELISA*, Valenzano, Italija
- *Invitrogen™ M-MLV Reverse Transcriptase*, Thermo Scientific, SAD
- *RNeasy Plant Mini Kit*, Qiagen, Njemačka
- *pGEM®-T Easy Vector Systems*, Promega, SAD
- *SYBR Green PCR Master Mix*, Applied Biosystems, SAD
- *Kapa HiFi HotStart ReadyMix*, Roche, Švicarska
- *LCGreen® Plus Melting Dye*, Bioke, Nizozemska

### 3.1.3. Enzimi

- inhibitor RNaze *RNase Inhibitor*, Applied Biosystems, SAD
- reverzna transkriptaza iz *Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)*, Thermo Scientific, SAD
- polimeraza *Platinum™ Taq DNA Polymerase*, Thermo Scientific, SAD
- polimeraza *GoTaq DNA Polymerase*, Promega, SAD
- polimeraza *Taq DNA Polymerase*, Takara, Japan

### 3.1.4. Standard za određivanje molekularne mase DNA

*BenchTop 100bp DNA Ladder*, Promega, SAD- sadrži 11 fragmenata duljine (izražene u bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 i 1500.

### 3.1.5. Pufferi, otopine i mediji

- ampicilin: matična otopina koncentracije 50 mg/ml u deioniziranoj vodi, sterilizirati filtracijom kroz filter pora 0,22  $\mu$ m
- denaturacijski puffer: 950  $\mu$ l formamida (95 %-tni), 40  $\mu$ l EDTA (0,5 mM, pH 8), zrnice bromfenol-plavog
- ekstrakcijski puffer za ELISA test: 37,2 g TRIS – HCl, 24 g TRIS, 8 g natrijev klorida, 10 g PEG, 20 g PVP (K25) i 0,5 ml Tweena 20. Otopiti u deioniziranoj vodi do ukupnog volumena od 1 l, podesiti pH na 8,2 i držati na hladnom do upotrebe
- etidijev bromid: 0,75 mg otopiti u redestiliranoj vodi do ukupnog volumena od 1 l

- IPTG otopina: otopina koncentracije 20mg/ml u deioniziranoj vodi, sterilizirati filtiranjem
- karbonatni pufer: 1,59 g natrijevog karbonata i 2,93 natrijevog hidrogenkarbonata otopiti u redestiliranoj vodi do ukupnog volumena od 1 l i podesiti pH na 9,6
- konjugirajući pufer: 20 g PVP (K25), 2g goveđeg seruma albumina, 0,5 ml Tweena 20 otopiti u PBS puferu do volumena od 1 l i podesiti pH na 7,4
- LB-medij (tekući): 10 g *Bacto Tryptone*, 5 g *Bacto-yeast extract*, 10 g natrijev klorid. otopiti u redestiliranoj vodi do volumena 1 l i podesiti pH na 7,5, sterilizirati autoklaviranjem
- LB-medij (kruti): tekućem LB-mediju dodati 15 g agara na 1 litru
- MacKenzie pufer za ekstrakciju RNA iz vinove loze: 472 g gvanidinijev izotiocijanat, 16,4 g natrijev acetat, 9,2 g EDTA i 25 g PVP (K25) otopiti u deioniziranoj vodi, nadopuniti do 1 l, podesiti pH na 5 i sterilizirati autoklaviranjem
- otopina srebrovog nitrata: 0,6 g srebrov nitrat, 489 µl formaldehid (35 %), nadopuniti do 300 ml deioniziranom vodom
- otopina razvijača za bojanje poliakrilamidnih gelova srebrom: natrijev karbonat 18 g, formaldehid (35 %) 489 µl, 600 µl natrijev tiosulfat, nadopuniti do 300 ml deioniziranom vodom
- PBS pufer: 8 g natrijevog klorida, 0,2 g monokalijeveg fosfata, 1,15 g dinatrijevog hidrogenfosfata i 0,2 g kalijeveg klorida otopiti u redestiliranoj vodi do volumena 1 l i podesiti pH na 7,4
- poliakrilamidni gel (8 %-tni, za jedan gel): 1,96 ml 40 %-tna smjesa akrilamida i bisakrilamida (29:1), 0,6 ml TBE, 3,44 ml deionizirana voda, 6 µl TEMED, 60 µl APS (10 %-tni)
- pufer za ispiranje ELISA mikrotitarskih pločica: 0,5 ml Tweena 20 u 1 l PBS pufera
- supstratni pufer: otopiti 97 ml dietanolamina u 800 ml redestilirane vode, podesiti pH na 9,6 i nadopuniti do 1 l
- TBE pufer: 108,00 g Tris, 55,00 g borna kiselina, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8), otopiti do volumena od 1 l
- X-gal: matičnu otopinu otopiti u formamidu u koncentraciji 20 mg/ml
- L-prolin standard: matičnu otopinu otopiti u deioniziranoj vodi u koncentraciji 1mg/ml
- Ninhidrin otopina: 0,293 g ninhidrina otopiti u 70,31 mL glacijalne octene kiseline i dodati 4,688 mL fosforne kiseline (6M).

### 3.1.6. Početnice

#### Početnice za PCR-detekciju virusa vinove loze

Tablica 1. Popis početnica za detekciju devet virusa vinove loze.

Početnica	Nukleotidni slijed 5'-3'	Naziv virusa	Genomska regija koju umnožava par početnica	Koncentracija u PCR-reakciji	Veličina ampikona
18S-F	CGCATCATTCAAATTTCTGC	/	18S rRNA <i>Vitis</i> .	0,08 µM	844 bp
18S-R	TTCAGCCTTGCACCATACT				
GLRaV2-F	GGTGATAACCGACGCCTCTA	virus uvijenosti lista vinove loze 2	CP*	0,8 µM	543 bp
GLRaV2-R	CCTAGCTGACGCAGATTGCT				
GVB-F	GTGCTAAGAACGTCTTCACAGC	virus vinove loze B	RNA vezujući protein	0,16 µM	460 bp
GVB-R	ATCAGCAAACACGCTTGAACCG				
ArMV-F	TGACAACATGGTATGAAGCACA	virus mozaika gušarke	RdRP	0,8 µM	402 bp
ArMV-R	TATAGGGCCTTTCATCACGAAT				
GLRaV3-F	TACGTTAAGGACGGGACACAGG	virus uvijenosti lista vinove loze 3	CP	0,6 µM	336 bp
GLRaV3-R	TGCGGCATTAATCTTCATTG				
GVA-F	GAGGTAGATATAGTAGGACCTA	virus vinove loze A	CP	0,6 µM	272 bp
GVA-R	TCGAACATAACCTGTGGCTC				
GLRaV1-F	TCTTTACCAACCCCGAGATGAA	virus uvijenosti lista vinove loze 1	CP	0,3 µM	232 bp
GLRaV1-R	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG				
GFKV-F	TGACCAGCCTGCTGTCTCTA	virus pjegavosti lista vinove loze	CP	0,4 µM	179 bp
GFKV-R	TGGACAGGGAGGTGTAGGAG				
GRSPaV-F	GGGTGGGATGTAGTAACTTTTGA	virus naboranosti drva podloge <i>Rupestris du Lot</i>	RdRP	0,6 µM	155 bp
GRSPaV-R	GCAAGTGAAATGAAAGCATCACT				
GFLV-M3	ATGCTGGATATCGTGACCCTGT	virus lepezastosti lista vinove loze	RdRP	0,6 µM	118 bp
GFLV-M4	GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG				
GPGV-DetF	TGGTCTGCAGCCAGGGGACA	virus sivog pinota	MP/CP	0,4 µM	588 bp
GPGV-DetR	TCACGACCGGCAGGGAAGGA				

\*Značenje kratica za proteine koje kodira pojedina genomska regija: CP- kapsidni protein, RdRP- RNA ovisna RNA polimeraza, MP- protein za pokretanje virusa

#### Početnice za molekularnu karakterizaciju genomske regije HSP70h virusa uvijenosti lista vinove loze 3

LC1 (uzvodna) 5'-CGCTAGGGCTGTGGAAGTATT-3'

LC2 (nizvodna) 5'-GTTGTCCCGGGTACCAGATAT-3'

Početnice za određivanje ekspresije referentnih domaćinskih gena u kvantitativnoj PCR reakciji

Tablica 2. Popis početnica za kandidate referentnih domaćinskih gena.

Početnica	Nukleotidni slijed (5'-3')	Genomska regija koju umnožava par početnica	Koncentracija u reakcijskoj smjesi	Veličina ampikona
Vv actin-F	CTTGCATCCCTCAGCACCTT	<i>Vitis vinifera</i> aktin	0,4 µM	82 bp
Vv actin-R	TCCTGTGGACAATGGATGGA			
Vv tubulin-F	CAGCCAGATCTTCACGAGCTT	<i>Vitis vinifera</i> tubulin	0,4 µM	119 bp
Vv tubulin-R	GTTCTCGCGCATTGACCATA			
Vv GAPDH-F	TTCTCGTTGAGGGCTATTCCA	<i>Vitis vinifera</i> gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza	0,4 µM	70 bp
Vv GAPDH-R	CCACAGACTTCATCGGTGACA			

Početnice za kvantifikaciju virusa vinove loze

Tablica 3. Popis početnica za kvantifikaciju virusa vinove loze.

Početnica	Nukleotidni slijed (5'-3')	Naziv virusa	Genomska regija koju umnožava par početnica	Koncentracija u reakcijskoj smjesi	Veličina ampikona
GLRaV-3_ORF1a-F	GGGRACGGARAAGTGTACC	virus uvijenosti lista vinove loze 3	L-Pro-MET-HEL*	0,4 µM	144 bp
GLRaV-3_ORF1a-R	TCCAAYTGGGTCATRCACAA				
GLRaV-3_CP-F	ATGAAYGARAARGTYATGGC	virus uvijenosti lista vinove loze 3	CP	0,46 µM	140 bp
GLRaV-3_CP-R	CTAAACGCYGTGYCTAG				
GLRaV-2-F	CAAATAGTTTCGGAGAGAGGAATG	virus uvijenosti lista vinove loze 2	CP	0,33 µM	148 bp
GLRaV-2-R	GCGATACAAAAGTCAACGTAAGC				
GVA-F	GACAAATGGCACACTACG	virus vinove loze A	CP	0,33 µM	230 bp
GVA-R	AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG				
GfKv-F	CTAGCTCTCGCTCTGACTCT	virus pjegavosti lista vinove loze	CP	0,33 µM	124 bp
GfKv-R	TCATACCACAGGAACTGGAA				
GLRaV-1-F	TCTTACCAACCCGAGATGAA	virus uvijenosti lista vinove loze 1	CP	0,33 µM	250 bp
GLRaV-1-R	GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG				
GRSPaV-F	AATAATCCCCGATTCAAGGC	virus naboranosti drva podloge <i>Rupestris du Lot</i>	CP	0,33 µM	180 bp
GRSPaV-R	AGGATTTAGCATRGAAGGAATAC				
GPGV-F	TGTCGATTCGTCAGGAGTTG	virus sivog pinota	CP	0,33 µM	170 bp
GPGV-R	GGGTAATTTGTCTCCCTGA				

\*Značenje kratica za proteine koje kodira pojedina genomska regija: L-Pro-MET-HEL- protein replikaznog kompleksa sastavljen od vodeće proteaze nalik papainu, metiltransferaze i helikaze, CP- kapsidni protein

### Početnice za analizu krivulje disocijacije amplikona

Tablica 4. Popis početnica za analizu krivulje disocijacije amplikona virusa uvijenosti lista vinove loze 3 (GLRaV-3).

Početnica	Nukleotidni slijed 5'-3'	Genomska regija koju umnožava par početnica	Koncentracija primera u reakcijskoj smjesi	Veličina amplikona
GLRaV-3_HRM4-F	TAATCGGAGGTTTAGGTTCC	HSP70h*	0,8 μM	226 bp
GLRaV-3_HRM4-R	GTCGGTTCGTTAACAACAC			
GLRaV-3_HRM6-F	GTCACCAGGTGTTCCAAACC	L-Pro-MET-HEL	0,8 μM	305 bp
GLRaV-3_HRM6-R	AACGCCCTGTATGTCCTCTC			

\*Značenje kratica za proteine koje kodira pojedina genomska regija: HSP70h- protein homolog toplinskog šoka, L-Pro-MET-HEL- protein replikaznog kompleksa sastavljen od vodeće proteaze nalik papainu, metiltransferaze i helikaze

#### 3.1.7. Programi za računalne analize

- *Sequencher 4.6* (<http://www.genecodes.com>, Genes Codes Corporation) - za obrađivanje podataka dobivenih postupkom sekvenciranja
- *Clustal W*, verzija 2.0 (Larkin *i sur.*, 2007) - za višestruko sravnjivanje dobivenih sekvenci
- *BioEdit*, verzija 7.2.5. (Hall, 1999) - za uređivanje dobivenih sekvenci
- *MEGA*, verzija 10.1.7 (Tamura *i sur.*, 2011) - za konstrukciju filogenijskih stabala i provođenje filogenijskih analiza
- *geNorm* (Vandesompele *i sur.*, 2002) i *Normfinder* (Andersen *i sur.*, 2004) - dodaci programu *Microsoft Excel* za određivanje domaćinskog gena stabilne ekspresije
- *TIBCO Statistica™*, verzija 14.0.1 (<https://www.statistica.com/en/>) - za provođenje statističkih testova u obradi podataka

#### 3.2. Biljni materijal za utvrđivanje prisutnosti ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze

U Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu podignut je kolekcijski nasad vinove loze gdje su sačuvane najznačajnije sorte vinove loze Dalmacije, hrvatske regije najbogatije autohtonim sortimentom. Kolekcijski nasad sadrži 63 jedinstvena genotipa autohtonih sorti vinove loze ove regije (Zdunić *i sur.*, 2013), kao i veliki broj klonskih kandidata ekonomski najznačajnije crne sorte 'Plavac Mali'. Odabrane sorte korištene u eksperimentu s navedenim vinorodnim područjem iz kojeg su uvedene u kolekcijski vinograd navedene su u

Tablici 5. Navedene sorte su odabrane zbog svoje velike rasprostranjenosti u vinogradima diljem regije i kvalitativnog potencijala kojeg predstavljaju u vinarskoj proizvodnji.

Tablica 5. Popis sorti koleksijskog nasada Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša korištenih u istraživanju prisutnosti ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze.

Sorta	Šifra uzoraka	Vinorodno područje
'Babica Crna'	BC1, BC2, BC3, BC5, BC7	Kaštela
'Babić'	Bab1, Bab2, Bab4, Bab5, Bab6	Primošten
'Crljenak Kaštelanski' ('Tribidrag')	CK092/1, CK093/2, CK093/1, CK092/4, CK094/1	Kaštela
'Dobričić'	Dob6, Dob7, Dob8, Dob9, Dob10	Šolta
'Glavinuša'	Gla1, Gla2, Gla5, Gla7, Gla8	Kaštela
'Grk'	Grk1, Grk4, Grk8, Grk10	Korčula
'Kujundžusa'	K3, K4	Imotski
'Malvasija Dubrovačka'	Mal2, Mal4, Mal6, Mal10	Konavle
'Plavina'	Pla1, Pla3	Drniš
'Pošip Bijeli'	PB1, PB2, PB3, PB4, PB5	Korčula
'Pošip Crni'	PC1, PC4, PC5, PC6, PC7	Korčula
'Prč'	Prc4, Prc5, Prc6, Prc7, Prc8	Hvar
'Rukatac'	Ruk1, Ruk3, Ruk4, Ruk6, Ruk8	Korčula
'Vugava'	Vu1, Vu5, Vu6, Vu7	Vis
'Zlatica Vrgorska'	ZV1, ZV2, ZV3, ZV4, ZV5	Vrgorac
'Plavac Mali'	210/1, 210/5, 214/1, 214/2, 215/1, 215/3, 217/1, 217/2, 217/3, 217/4, 217/5	Vis
'Plavac Mali'	008/1	Čiovo
'Plavac Mali'	010/1, 020/1, 020/2, 026/1, 026/3, 027/3, 027/4	Hvar
'Plavac Mali'	036/1, 036/3	Zemunik
'Plavac Mali'	041/1	Svinišće
'Plavac Mali'	043/1	Labin Dalmatinski
'Plavac Mali'	056/1, 059/3	Pelješac
'Plavac Mali'	091/1, 095/1, 096/4, 096/5	Korčula

'Plavac Mali'	202/3	Vrgorac
'Plavac Mali'	004/3	Šolta
'Plavac Mali'	225/3	Kaštela
'Plavac Mali'	268/1, 268/2	Brač
'Plavac Mali'	TG	Trogir

### 3.3. Biljni materijal za biološku karakterizaciju GLRaV-3

U svrhu biološke karakterizacije GLRaV-3, bezvirusne reznice triju standardnih indikatorskih sorti 'Pinot Noir', 'Cabernet Franc' i 'Merlot' su nabavljene iz bezvirusnog vinograda Visoke škole u poljoprivredi Sveučilišta u Geisenheimu (Savezna Republika Njemačka). Bezvirusne sadnice autohtone sorte 'Tribidrag' su uzete iz bezvirusnog vinograda Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša. Reznice sam prije ukorjenjivanja čuvao u hladnjaku pri 4°C da bih sačuvao dormantnost pupova do prikladnog vremena za ukorjenjivanje.

#### 3.3.1. Postupak ukorjenjivanja reznica

Reznice sam rehidrirao potapanjem u vodu 23 h, nakon čega sam ih čitave uronio u 0,2 %-tnu otopinu fungicida za suzbijanje sive plijesni (*Botrytis cinerea*) trgovačkog naziva *Pyrus 400 SC* u trajanju od 1 h.

Odabrane reznice duljine 2-3 nodija sam pripremio na način da sam im bazalni dio ispod najnižeg pupa odrezao neposredno uz sam nodij, a pup na bazalnom dijelu sam odstranio kako bih potaknuo proces ukorjenjivanja. Bazalni dio reznica neposredno prije sadnje sam uronio na 5 sekundi u svježe pripremljenu otopinu hormona IBA (indol-3-maslačna kiselina) koncentracije 2 000 ppm.

Nakon uranjanja bazalnog dijela reznica u otopinu hormona, iste sam pikirao u prethodno pripremljenu mješavinu perlita (*Grand Quality 2-6 mm*) i treseta (*Supstrat steck*) u omjeru 3:1 kako bih postigao optimalno zadržavanje vlage uz dobru aeraciju važnu za rast kalusa i korijena. Ukorjenjivanje sam proveo na grijanim stolovima u stakleniku, tako da temperatura bazalnog dijela reznica nije prelazila 25 °C. Reznice sam redovito pregledavao i zalijevao, kako bih spriječio isušivanje prije uspostave korijena.



Nakon što sam utvrdio zadovoljavajuću razvijenost korijena i početak rasta zelenog izdanka iz vršnih pupova (otprilike 4 tjedna nakon ukorjenjivanja) reznice sam presadio u prethodno pripremljene lonce volumena 6 l napunjene mješavinom zemlje (smeđe tlo), treseta (*Brill type 5*) i perlita (*Agrilit 3*) u omjeru 1:1:1. Smjesi supstrata sam naknadno dodao 1/3 udjela ukupne mase kvarcnog pijeska (*Lasselberger-Knauf*). Loze sam postavio u komoru eksperimentalnog staklenika (50 m<sup>2</sup>) zaštićenu *insect proof* mrežom gdje su bile tijekom cijelog trajanja pokusa. Loze su u stakleniku bile pod prirodnim osvjetljenjem, a raspon temperatura u stakleniku kretao se od 18-35°C uz vlažnost zraka od 30-80 %, ovisno o godišnjem dobu.

### 3.3.2. Njegovanje biljaka

Pomoću automatskog sustava navodnjavanja ukorijenjenim lozama sam održavao optimalnu vlažnost redovitim zalijevanjem koje je bilo prilagođeno razvojnoj fazi biljke i vremenskim uvjetima. Za zaštitu od gljivičnih bolesti i potencijalnog prodora vektora, prijenosnika virusa, primijenio sam komercijalno dostupne fungicide i insekticide u preporučenim koncentracijama uz poštivanje propisane karence. Fungicide i insekticide sam primjenjivao od trenutka otvaranja pupova pa sve do pojave prvih ljetnih vrućina u razmacima od 3 tjedna između tretiranja. Za ishranu bilja primijenio sam formulaciju vodotopivog gnojiva (*Kristalon special 18-18-18 +3MgO +micro, Yara*) koja je zadovoljavala sve potrebe vinove loze za hranjivom. Ishranu sam primijenio korištenjem automatskog sustava navodnjavanja s početkom vegetacije priređivanjem otopine gnojiva koncentracije 0,25 g/l kojom sam biljke zalijevao dva tjedna, a potom sam ih dva tjedna zalijevao čistom vodom. Po istom obrascu sam radio daljnju ishranu sve do početka ljetnih mjeseci od kada sam biljke zalijevao samo vodom bez dodataka hranjiva.

U prvoj godini loze sam uzgojio na jednu ili dvije mladice zadovoljavajuće duljine (više od 30 cm) uz odstranjivanje svih cvatova i vezivanje grana uz pomoćni potporanj (bambus štap) s ciljem što pravilnijeg razvoja rozgve za iduću godinu. U fazi dubokog zimskog mirovanja, sve loze sam orezao na dva pupa i tako su dočekale narednu vegetacijsku sezonu.

U drugoj godini loze sam uzgojio na dvije dobro razvijene mladice, te sam sustavno primjenjivao mjere zaštite, ishrane i zalijevanja po prethodno opisanom obrascu. Kada su ostvareni preduvjeti, tj. kada je izboj namijenjen za inokuliranje počeo odrvenjavati u svom bazalnom dijelu, loze su zaražene metodom cijepjenja „na zeleno“ koja je detaljno opisana u narednom poglavlju. Da bi se osiguralo rast pupova majčinske biljke u post-inokulacijskom

periodu, biljkama sam osigurao kretanje nove vegetacijske mase intenzivnim zalijevanjem i jednokratne primjene dušičnog gnojiva.

U trećoj godini zaražene biljke sam također uzgojio na dvije dobro razvijene mladice, a rezidbom sam odstranio rozgvu biljaka korištenih u inokulaciji sorti virusima. Primjenom zaštitnih sredstava i fertirigacije biljke sam održavao kroz vegetacijsku sezonu.

### **3.3.3. Inokuliranje sorti vinove loze odabranim inokulumima koji sadrže GLRaV-3**

Sorte vinove loze korištene u ovom pokusu ('Cabernet Franc', 'Pinot Noir', 'Merlot' i 'Tribidrag') inokulirane su metodom cijepjenja „na zeleno“ s inokulumima različitog sastava. Postupak cijepjenja izvodili su specijalizirani radnici, takozvani cjepljari, s iskustvom u ovakvom tipu posla. Grane reznica tj. podloga namijenjenih za cijepjenje su skraćene na duljinu od oko 15 cm, a svo lišće i zaperci su uklonjeni. Plemke su neposredno prije cijepjenja uzete iz kolekcijskog nasada koji se nalazi u blizini objekta u kojem se provodi eksperiment. Plemke su pripremljene na način da im je odstranjeno lišće, ali ne i peteljka te je napravljena selekcija na temelju debljine plemke radi što bolje kompatibilnosti s podlogom. Plemke su zatim skraćene na duljinu od 1-2 nodija te su kosim rezom cijepjene na podlogu, po jedan cijep na svaku podlogu. Podlogama u ovom slučaju nisu odstranjeni preostali pupovi radi kasnije potrebe za novim porastom matične biljke. Uspješnost cijepjenja inicijalno je potvrđena pojavom kapljice na vrhu plemke koja se dogodila unutar nekoliko minuta od samog trenutka cijepjenja. Biljke sam nakon cijepjenja obilno zalio vodom da bih potaknuo tjeranje pupova plemke i podloge, što sam nastavio narednih tjedan dana. U slučaju uspješnog cijepjenja nakon nekoliko dana bi se zaostala peteljka lista s plemke trebala lako odvojiti pri dodiru, a pupovi početi s rastom. Također, u ovom slučaju bitno je bilo osigurati tjeranje pupova i zadovoljavajući porast podloge, što sam osigurao redovitim zalijevanje i jednokratnom primjenom dušičnog gnojiva (Amonij-nitrat, Petrokemija Kutina, koncentracija 1 %) u fazi kada je veličina porasta iz plemke prešla 10 cm. Korišteni inokulumi su navedeni u Tablici 6.

Tablica 6. Inokulumi za eksperimentalno zaražavanje biljaka vinove loze različitih sorti metodom cijepljenja „na zeleno“.

Naziv inokuluma	Sastav virusne populacije	Oznake inokuliranih uzoraka vinove loze			
		'Tribidrag'	'Pinot Noir'	'Cabernet Franc'	'Merlot'
II	GLRaV-3*	TRII	PNII	CFII	MII
X	GLRaV-3, GVA, GPGV, GRSPaV	TRX	PNX	CFX	MX
Y	GLRaV-3, GVA, GLRaV-1, GPGV, GRSPaV	TRY	PNY	CFY	MY
Z	GLRaV-3, GVA	TRZ	PNZ	CFZ	MZ
Q	GLRaV-3, GVA, GLRaV-2, GFkV, GPGV, GRSPaV	TRQ	PNQ	CFQ	MQ

\*kratice pojedinih virusa su navedene redom za: GLRaV-3- virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA- virus vinove loze A, GPGV- virus sivog pinota, GRSPaV- virus jamičavosti podloge Rupestris du Lot, GLRaV-1- virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2- virus uvijenosti lista vinove loze 2, GFkV- virus pjegavosti lista podloge.

### 3.4. Serološke analize

U svrhu preliminarnog istraživanja prisutnosti ekonomski značajnih virusa u kolekcijском nasadu Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša i preliminarne potvrde uspješnosti inokulacije biljaka u kontroliranom pokusu primijenio sam ELISA metodu upotrebom dostupnih komercijalnih kompleta reagensa proizvođača Agritest (Valenzano BA, Italija) i to za slijedeće viruse: virus uvijenosti lista vinove loze 1, 2 i 3 (GLRaV-1, GLRaV-2 i GLRaV-3), virus vinove loze A i B (GVA i GVB), virus mozaika gušarke (ArMV), virus lepezastosti lista vinove loze (GFLV) i virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV).

Ekstrakciju virusnog antigena za provođenje ELISA testa (Clark i Adams, 1977) na prisutnost virusa vinove loze napravio sam tako da sam sterilnim skalpelom ostrugao floemsko tkivo s reznice vinove loze kojeg sam usitnio u prethodno priređenim sterilnim i ohlađenim tarionicima. Homogeniziranom tkivu sam dodao ekstrakcijski pufer u omjeru 1:10 (masa:volumen). Uzorke sam pohranio u hladnjaku pri 4°C gdje se tkivo maceriralo u ekstrakcijskom puferu najmanje 3 sata prije daljnjeg postupanja. Reakcije sam provodio za

svaki virus posebno na mikrotitarskim pliticama primjenom *Double Antibody Sandwich* ELISA metode (DAS-ELISA).

DAS-ELISA protokol za detekciju virusa vinove loze primijenio sam za viruse: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, ArMV, GFLV i GFkV. Protokol sam započeo pripremom antigen-specifičnih antitijela koje sam razrijedio u karbonatnom puferu (1:500 za GLRaV-1, -2 i GFkV, 1:1000 za GLRaV-3, ArMV i GFLV) te sam pipetirao 100 µl po jažici mikrotitarske plitice. Uslijedila je inkubacija 2 h pri 37°C, nakon koje sam mikrotitarsku pliticu isprao tri puta puferom za ispiranje te sam pliticu dobro osušio nakon svakog ispiranja lupkanjem u laboratorijski papirnati ručnik. Potom sam dodao 100 µl uzorka u svaku jažicu te ih ostavio na inkubaciji preko noći pri 4°C. Sutradan sam, nakon tri ispiranja, dodao 100 µl konjugiranog specifičnog antitijela u svaku jažicu, prethodno razrijedivši antitijelo u konjugacijskom puferu (1:500 za GLRaV-1, -2, i -3 i ArMV, 1:1000 za GFLV i GFkV), te sam reakciju inkubirao 2 h pri 37°C. Nakon ispiranja tri puta puferom za ispiranje, dodao sam 100 µl supstratnog pufera u svaku jažicu.

Modificiranu DAS-ELISA-u primijenio sam za detekciju GVB gdje sam na mikrotitarsku pliticu prvo dodao 200 µl uzorka u svaku jažicu. Ovakva metoda se naziva *double antibody sandwich Indirect* ELISA (DASI-ELISA). Nakon što sam dodao uzorke uslijedila je inkubacija 2 h pri 37°C te ispiranje puferom za ispiranje mikrotitarske plitice. Otopivši specifično antitijelo u konjugacijskom puferu (1:1000) dodao sam po 200 µl u svaku jažicu mikrotitarske plitice te inkubirao 2 h pri 37°C. Poslije inkubacije pliticu sam tri puta isprao, dobro osušio i u nju dodao po 200 µl konjugiranog antitijela u svaku jažicu koje sam prethodno razrijedio u konjugacijskom puferu (1:500) te inkubirao 2 h pri 37°C. Prethodno dodavanju 200 µl supstratnog pufera u svaku jažicu, pliticu sam isprao tri puta puferom za ispiranje i dobro osušio.

Drugu modifikaciju DAS-ELISA-e primijenio sam u detekciji GVA gdje sam kao prvi korak dodao specifično antitijelo (100 µl po jažici) koje sam prethodno otopio u karbonatnom puferu (1:500). Nakon inkubacije od 2 h pri 37°C i ispiranja plitice slijedi dodavanje uzorka (100 µl po jažici) uz kojeg sam u isto vrijeme dodao i isti volumen konjugiranog specifičnog antitijela koje sam prethodno otopio u konjugacijskom puferu (1:1000). Ovu reakciju sam inkubirao preko noći pri 4°C. Sutradan sam pliticu isprao tri puta puferom za ispiranje, dobro osušio i dodao joj supstratni pufer (100 µl po jažici).

U svim prethodno opisanim postupcima sam osim uzoraka uključio pozitivnu i negativnu kontrolu reakcije koje su bile dostupne u komercijalnom kompletu reagensa. Nakon

dodavanja supstratnog pufera za sve prethodno opisane reakcije proveo sam očitavanje razvoja obojenja pri valnoj duljini od 405 nm na čitaču za mikrotitarske pločice Thermo Scientific Multiskan™ FC (Fisher Scientific, Švedska). Očitavanja sam proveo jedan i dva sata nakon dodavanja pufera, a uzorci koji su imali 2,5 puta veću absorbanciju od negativne kontrole pri valnoj duljini od 405 nm sam označio kao pozitivne.

### **3.5. Molekularne analize**

Molekularne analize sam provodio u Molekularnom laboratoriju Zavoda za biljne znanosti Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša, na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u Laboratoriju za nasljedni rak na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Svaki od pojedinih koraka su detaljno opisani u narednim poglavljima.

#### **3.5.1. Izolacija ukupne RNA iz vinove loze**

Ekstrakciju ukupne RNA iz vinove loze za potrebe ovog rada napravio sam koristeći *RNeasy Plant mini kit* prema modificiranoj proceduri opisanoj u MacKenzie *i sur.* (1997.).

##### Liziranje i homogeniziranje biljnog materijala

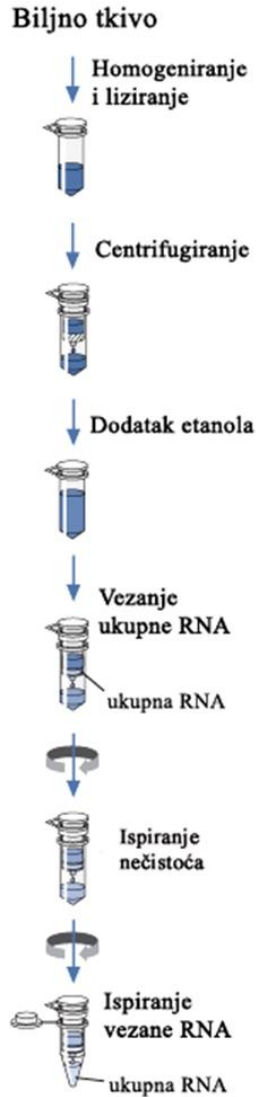
Kao biljni materijal koristio sam jednogodišnju rozgvu vinove loze s koje sam sterilnim skalpelom sastrugao 250 mg floemskog tkiva. U ohlađenim, prethodno autoklaviranim tarionicima, sam uz dodatak tekućeg dušika floemsko tkivo usitnio u fini prah te sam isti prebacio u epruvete od 2 ml uz dodatak 1,7 ml Mackenzie pufera i 17  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptetoanola. Uzorke sam zatim promiješao na vrtložnoj miješalici i centrifugirao pri 12000 rpm tijekom 6 minuta u centrifugi hladenoj na 4°C. Jedan mililitar supernatanta sam potom prebacio u novu epruvetu od 1,5 ml te mu dodao 100  $\mu$ l natrijevog lauroil sarkozinata, a uzorke sam inkubirao na termobloku pri 70°C tijekom 10 min uz periodično miješanje. Pipetirao sam po 700  $\mu$ l sadržaja epruvete u kolone namijenjene homogeniziranju uzoraka (*QIA shredder*, Qiagen) i centrifugirao ih 2 min pri 14000 rpm uz hlađenje pri 4°C. Ovim postupkom sam uklonio grube stanične dijelove i lizat dodatno homogenizirao. Dobivene supernatante sam zatim prebacio u nove epruvete, pazeći da ne dodirnem talog na dnu epruvete, i svaki pomiješao s 500  $\mu$ l apsolutnog etanola. Ovakvim postupanjem stvoreni su uvjeti za selektivno vezivanje RNAmolekula na *RNeasy* membranom od silika-gela.

### Vezivanje ukupne RNA na membranu od silika-gela

Kako bih razdvojio RNA molekule od nečistoća, 700 µl mješavine lizata i dodanog etanola sam nanio na kolone s *RNeasy* membranom od silika-gela te potom centrifugirao pri 10000 rpm 1 minutu. Eluat dobiven centrifugiranjem sam zatim uklonio i postupak ponovio za preostali volumen mješavine. Slijedilo je ispiranje RW1 i RPE puferom prema uputama proizvođača za uklanjanje nečistoća na membrani. Na kraju, kako bih osigurao uklanjanje sve zaostale tekućine iz kolone, pristupio sam centrifugiranju pri 14000 rpm 1 min bez dodavanja pufera te sam eluat uklonio, a kolonu sam prebacio u novu epruvetu.

### Ispiranje ukupne RNA s membrane od silika-gela

Kolone prethodno prebačene u nove sterilne epruvete sam isprao s po 50 µl vode oslobođene RNaza te centrifugirao pri 10000 rpm 1 min. Postupak sam ponovio kako bih dobio ukupni volumen eluiranog RNA ekstrakta od 100 µl. Uzorke sam pohranio pri -80°C do daljnjeg korištenja. Cjelokupan postupak ekstrakcije RNA upotrebom komercijalnog kompleta reagensa sam sažeto prikazao na Slici 8.



Slika 8. Shematski prikaz ekstrakcije ukupne RNA upotrebom kompleta reagensa *RNeasy plant minikit* (Qiagen).

### 3.5.2. Reverzna transkripcija

Sintezu komplementarne DNA (cDNA) iz izolirane ukupne RNA sam napravio upotrebom komercijalnog kompleta reagensa *Invitrogen™ M-MLV Reverse Transcriptase*. Reakciju sinteze komplementarne DNA sam provodio tako da sam u 12  $\mu\text{L}$  RNA ekstrakta dodao 1  $\mu\text{L}$  mješavine dNTP (10mM svakog dNTP-a) i 1  $\mu\text{L}$  nasumičnih nonamera (50  $\mu\text{M}$ ) te sam tako dobivenu smjesu inkubirao na termobloku 5 minuta pri 65°C, a zatim sam uzorke prenio na led. U istu smjesu sam potom dodao 4  $\mu\text{L}$  pufera (*First strand puffer*, 5 puta koncentriran), 2  $\mu\text{L}$  DTT (0,1 M), 1  $\mu\text{L}$  inhibitora RNaza (50mM) i 1  $\mu\text{L}$  reverzne transkriptaze (*M-MLV Reverse Transcriptase*, 200 U/ $\mu\text{L}$ ).

Ovako dobivenu reakcijsku smjesu sam inkubirao u PCR uređaju (*2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems*) 10 minuta pri 25°C, 60 minuta pri 37°C i 15 minuta pri 70°C. Dobivenu cDNA sam uskladištio pri -20°C do daljnje upotrebe.

### **3.5.3. Detekcija virusnih gena lančanom reakcijom polimerazom**

Za detekciju najznačajnijih virusa vinove loze primijenio sam dvije metode detekcije virusnih gena u uzorcima RNA. Za detekciju GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFkV i GRSPaV (Tablica 1.) primijenio sam metodu PCR s više parova početnica (*multiplex PCR*) koja omogućuje simultanu detekciju prethodno navedenih virusa u jednoj PCR reakcijskoj smjesi za svaki uzorak kako je opisana u Gambino i Gribaudo (2006). Za detekciju GPGV primijenio sam standardni PCR kako je opisano u Saldarelli *i sur.* (2015) jer nije obuhvaćen prethodno navedenim testom.

#### **3.5.3.1. Lančana reakcija polimerazom s više parova početnica**

Reakcija PCR s više parova početnica primjenjena u detekciji virusa GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, GFkV i GRSPaV (Tablica 1.) predstavlja metodu u kojoj se u jednoj reakcijskoj smjesi može detektirati navedene viruse zbog specifično konstruiranih početnica koje umnožavaju virusne genske regije različite veličine što olakšava vizualizaciju rezultata. Kao unutarnju kontrolu reakcije primijenio sam početnice za 18S ribosomsku RNA vinove loze.

Reakcijska smjesa od 25 µl sadržavala je 2,75 µl reakcijskog pufera (10 puta koncentriranog), 3,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM mješavine dNTP, 3,25 µl mješavine početnica, 0,25 µl polimeraze *Platinum™ Taq Polymerase* (5 U/µl; Invitrogen) i 2 µl cDNA kalupa. Reakcijski ciklusi u kojima se odvijao PCR sa više parova početnica prikazani su u Tablici 7.



Tablica 7. Ciklusi lančane reakcije polimerazom u reakciji s više pari početnica za detekciju devet virusa vinove loze.

Ciklus	Temperatura	Trajanje	Broj ponavljanja
Početna denaturacija	94°C	2 min	1
Denaturacija	94°C	30 s	35
Sparivanje početnica	55°C	1 min	
Produljenje lanaca	72°C	90 s	
Završno produljenje lanaca	72°C	10 min	1

Produkte reakcije sam vizualizirao u 2,5 % agaroznom gelu u kojeg sam prethodno dodao etidij bromid. Agarozu sam otopio u TBE puferu kojeg sam koristio i kao elektroforetski pufer. Horizontalnu elektroforezu agaroznog gela sam provodio uz jakost električnog polja od 6 V/cm najmanje 60 min uz primjenu odgovarajućeg molekularnog standarda (*BenchTop 100bp DNA Ladder*).

### 3.5.3.2. Detekcija virusa sivog pinota

Detekciju virusa GPGV sam provodio prema protokolu opisanom u Saldarelli *i sur.*, (2015). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µl sadržavala je 2,75 µl reakcijskog pufera (10 puta koncentriranog), 3,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM mješavine dNTP, 0,2 µM obje početnice i 0,25 µl polimeraze *DNA Polymerase* (2,5 U/µl; Takara). Reakcijski ciklusi koje sam koristio su prikazani u Tablici 8.

Tablica 8. Ciklusi lančane reakcije polimerazom u detekciji virusa sivog pinota (GPGV).

Ciklus	Temperatura	Trajanje	Broj ponavljanja
Početna denaturacija	94°C	2 min	1
Denaturacija	94°C	30 s	35
Sparivanje početnica	60°C	40 s	
Produljenje lanaca	72°C	45 s	
Završno produljenje lanaca	72°C	7 min	1

Produkte reakcije sam vizualizirao na 1 %-tnom agaroznom gelu (s dodanim etidij bromidom) uz prethodno provedenu horizontalnu elektroforezu jakosti električnog polja od 6 V/cm u trajanju od 30 minuta uz primjenu odgovarajućeg molekularnog markera (*BenchTop*

100bp DNA Ladder). Kao elektroforetski pufer korišten je TBE pufer. U svaki pokus sam uključio negativu i pozitivnu kontrolu reakcije.

### 3.5.4. Molekularna karakterizacija izolata virusa uvijenosti lista vinove loze 3

Za potrebe molekularne karakterizacije izolata virusa uvijenosti lista vinove loze 3 (GLRaV-3) odabranim uzorcima koji su dokazano pozitivni na GLRaV-3 molekularno je karakterizirana genomska regija koja kodira za protein HSP70h. U tu svrhu provedeni su sljedeći koraci: umnožavanje dijela genomske regije HSP70h specifičnim početnicama iz GLRaV-3 pozitivnih uzoraka vinove loze, ugradnja amplikona u plazmidni vektor s ciljem razdvajanja pojedinih genomskih varijanti GLRaV-3 virusa, transformacija kompetentnih bakterijskih stanica i selekcija odabranih kolonija te analiza polimorfizma konformacije jednolančane DNA (SSCP metoda). Odabrane kolonije koje su pokazale specifične SSCP profile su potom sekvencirane i dobivenim sekvencama su određeni filogenijski odnosi.

#### 3.5.4.1. Umnožavanje dijela genomske regije HSP70h virusa GLRaV-3 lančanom reakcijom polimerazom

Umnožavanje dijela genomske regije HSP70h provodio sam prema protokolu opisanom u Turturo *i sur.* (2005.). Reakcijska smjesa je sadržavala 2,75 µl reakcijskog pufera (10 puta koncentriranog), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM mješavine dNTP, 0,2 µM obje početnice i 0,25 µl polimeraze *DNA Polymerase* (2,5 U/µl; Takara) te 2,5 µl cDNA. Ukupni volumen reakcijske smjese bio je 25 µl. Reakcijski ciklus na PCR uređaju naveden je u Tablici 9.

Tablica 9. Ciklusi lančane reakcije polimerazom u umnožavanju dijela genomske regije HSP70h.

Ciklus	Temperatura	Trajanje	Broj ponavljanja
Početna denaturacija	94°C	5 min	1
Denaturacija	94°C	30 s	35
Sparivanje početnica	52°C	30 s	
Produljenje lanca	72°C	50 s	
Završno produljenje lanca	72°C	15 min	1

### 3.5.4.2. Ugradnja umnoženih gena u plazmidni vektor

Umnožene varijante gena HSP70h svakog izolata sam razdvojio na način da sam ih ugradio u pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector plazmidni vektor sadržan u kompletu reagensa *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System* (Promega, SAD) u skladu s uputama proizvođača. Reakcijsku smjesu pripremio sam kako je navedeno u Tablici 10.

Tablica 10. Sastav reakcijske smjese za ugradnju amplikona u plazmidni vektor.

Reakcijski pufer (2 puta koncentriran)	5 µl
Plazmidni vektor pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector (50 ng)	1 µl
amplikon	3 µl
T4 DNA ligaza (3 U/µl)	1 µl

Reakciju ligacije sam provodio inkubirajući reakcijsku smjesu pri 4°C preko noći te sam istu primijenio za transformaciju bakterijskih stanica unutar 24 h od priređivanja smjese. Za postupak kontrole ligacije primijenio sam kontrolni insert DNA sadržan u kompletu reagensa *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System*.

### 3.5.4.3. Transformacija bakterijskih stanica

Kompetentne bakterijske stanice transformirao sam plazmidima *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector* koji su sadržavali razdvojene varijante virusnog gena od interesa. Kompetentne stanice bakterije *Escherichia coli* (JM109 High-Efficiency Competent Cells) bile su sadržane u komercijalnom kompletu reagensa *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System*. Kompetentne bakterijske stanice sam nakon otapanja ostavio na ledu 5 minuta dok sam u međuvremenu 2 µl ligacijskog produkta prebacio u epruvete od 1,5 ml pojedinačno za svaki uzorak. U iste epruvete dodao sam po 50 µl kompetentnih stanica te sam uzorke stavio na led 20 minuta. Slijedio je postupak temperaturnog šoka tako da sam epruvete s uzorcima prebacio u vodenu kupelj prethodno ugrišanu na 42°C 50 sekundi, nakon čega sam uzorke stavio na led 2 minute. Uzorcima sam dodao 950 µl SOC medija za brzi rast bakterijskih stanica, prethodno ugrišanog na sobnu temperaturu, te sam ih zatim inkubirao pri 37°C 90 minuta uz trešnju na 150 rpm u inkubatoru s tresilicom. Transformirane stanice nacijepio sam na Petrijeve zdjelice koje su sadržavale selektivnu hranidbenu podlogu tako da sam na svaku dodao 100 µl transformiranih stanica (po 4 za svaki uzorak).

Hranidbena podloga priređena je tako da sam kruti LB medij, prethodno steriliziran autoklaviranjem, otopio i ohladio do temperature koja nije prelazila 55°C te mu dodao ampicilin (50 mg/ml), X-Gal (40 mg/ml) i IPTG (20 mg/ml) te ga izlio u Petrijeve zdjelice. Za kontrolu transformacije bakterijskih stanica koristio sam kontrolni plazmid s ugrađenim insertom iz komercijalnog kompleta reagensa. Sve korake opisane u ovom poglavlju izvodio sam u sterilnim uvjetima.

#### **3.5.4.4. Analiza transformiranih bakterijskih kolonija**

Bakterijske kolonije s ugrađenim plazmidom identificirao sam kao bijele kolonije na Petrijevoj zdjelici. Ovakva vrsta podloge zbog dodanog antibiotika ampicilina omogućava rast samo onim bakterijama koje su rezistentne na njegovo djelovanje, tj. transformiranim bakterijskim stanicama koje sadrže plazmid s genom za otpornost na ampicilin. Dodani X-Gal omogućava selekciju onih kolonija u kojima je inaktiviran gen za  $\beta$ -galaktozidazu ugradnjom DNA amplikona, pošto iste ostanu bijele jer ne dolazi do metaboličke obrade X-Gala.

Kao provjeru ugradnje željenog fragmenta proveo sam reakciju PCR upotrebom specifičnih početnica (LC1 i LC2) gdje sam u kao kalup koristio malu količinu bijelih kolonija uzorkovanih sterilnim nastavkom za pipetu. Reakcijska smjesa od 25  $\mu$ l sadržavala je 2,5  $\mu$ l reakcijskog pufera (10 puta koncentriranog), 2 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM mješavine dNTP, 0,2  $\mu$ M obje početnice i 0,25  $\mu$ l polimeraze *DNA Polymerase* (2,5 U/ $\mu$ l; Takara). Reakcijski ciklusi su isti kao u poglavlju 3.4.4.1. s iznimkom skraćene posljednje ekstenzije koja traje 5 min u ovom slučaju. Uspješnost PCR reakcije potvrđena je vizualizacijom u 1 %-tnom agaroznom gelu, a u svaku reakciju je uključena pozitivna i negativna kontrola reakcije. Dvadeset kolonija po svakom uzorku sam sterilnom ezom precijepio u novu Petrijevu zdjelicu, a njihove amplikone sam analizirao SSCP metodom.

#### **3.5.4.5. Analiza polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (SSCP)**

U svrhu identifikacije različitih genomskih varijanti virusa prisutnih u pojedinom uzorku 20 nasumično odabranih kolonija kod kojih sam potvrdio ugradnju plazmida sam podvrgnuo analizi polimorfizma konformacije jednolančanih molekula DNA (*Single-strand conformation polymorphism* - SSCP). Ovim pristupom omogućeno je potencijalno razlikovanje različitih genomskih varijanti na temelju razlika u sekundarnoj strukturi jednolančanih lanaca DNA, odnosno SSCP profilu.

Prvotno sam amplikonima koji sadrže dvolančanu DNA istu denaturirao 5 minuta pri 92°C tako da sam prethodno pomiješao 2 µl PCR produkta i 8 µl denaturacijskog pufera. Denaturacijski pufer sadrži formamid koji služi za snižavanje temperature denaturacije dvolančane DNA. Produkte sam potom prebacio na led gdje sam ih držao najmanje 5 minuta. Vertikalnu elektroforezu provodio sam u hladnjaku (4°C) na poliakrilamidnom gelu (8% PAGE) kojemu je omjer akrilamida i bisakrilamida 29:1 pri jakosti električnog polja od 10 V/cm 2,5 sata u TBE puferu.

Za vizualizaciju SSCP profila primijenio sam bojanje srebrom prema metodi opisanoj u Beidler *i sur.* (1982). Nakon vertikalne elektroforeze slijedila je fiksacija gela u 10 %-tnoj otopini octene kiseline 20 minuta ili preko noći. Potom sam gelove isprao tri puta po tri minute u deioniziranoj vodi nakon čega je uslijedila inkubacija u 1 %-tnoj otopini dušične kiseline tri minute. Ponovno sam isprao gelove tri puta po tri minute u deioniziranoj vodi. Slijedila je inkubacija gelova u otopini srebrovog nitrata koju sam provodio 30 minuta u mraku nakon čega sam gelove isprao 4 min u deioniziranoj vodi. Potom sam dodao otopinu razvijaača u kojoj su se gelovi inkubirali sve do pojave obojenja. Reakciju sam zaustavio inkubacijom gelova u 10 %-tnoj otopini octene kiseline u trajanju od 5 min, nakon čega sam gelove ispirao s deioniziranom vodom sve dok se više nije mogao osjetiti miris octene kiseline. Gelove sam zatim osušio i s njih su očitani različiti elektroforetski obrasci, tzv. SSCP profili.

#### **3.5.4.6. Priprema uzoraka za sekvenciranje i obrada sekvenci**

Bakterijske kolonije koje su sadržavale specifične SSCP profile od interesa sam priredio za sekvenciranje dodatnom PCR reakcijom uz upotrebu univerzalnih početnica M13 koje se specifično vežu na regiju plazmida (*colony PCR*), tj. uzvodno i nizvodno od ugrađenog amplikona. PCR produkte ove reakcije poslao sam na sekvenciranje u tvrtku Macrogen Europe BV (Amsterdam, Nizozemska) gdje je napravljeno Sangerovo sekvenciranje u oba smjera.

Za utvrđivanje nukleotidnog slijeda kromatogramne dobivene postupkom sekvenciranja sam analizirao u programu *Sequencher* te sam dobivene sekvence pohranio u formatu FASTA. Duljina analiziranog fragmenta za sve uzorke iznosila je 480 parova baza. Višestruko sravnjivanje dobivenih sekvenci s referentnim sekvencama sam napravio uz pomoć programa *Clustal W* (Larkin *i sur.*, 2007). Referentne sekvence su određene u Diaz-Lara *i sur.* (2018), a njihove sam sekvence preuzeo iz NCBI baze podataka (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pripadajući pristupni brojevi referentnih sekvenci

su: MH521115, MH521102, MH796135, MH521104, MH521091, KM058745, JQ655296 i MH521094. Uređivanje srađenjenih sekvenci sam radio u programu *BioEdit* (Hall, 1999). Filogenijske analize, kao i konstrukciju filogenijskih stabala sam radio u programskom paketu *MEGA* (Tamura *i sur.*, 2011). Za računanje genetičke udaljenosti među nukleotidnim sekvencama koristio sam model Tamura-Nei, a filogenijska stabla sam generirao metodom povezivanja susjeda (*neighbour-joining*, N-J). Kvalitetu generiranog stabla ocijenio sam metodom samoučitavanja (*bootstrapping*) uz 1000 ponavljanja. Također, uz pomoć programskog paketa *MEGA* odredio sam stupanj genske raznolikosti za svaku filogenijsku skupinu zasebno, kao i za sve sekvence zajedno.

### **3.5.5. Relativna kvantifikacija virusa**

Relativnu kvantifikaciju svih spomenutih virusa provodio sam na uzorcima RNA odabranih sorti iz stakleničkog pokusa metodom reverzne transkripcije i kvantitativne lančane reakcije polimerazom (RT-qPCR) na uređaju *7300 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, SAD). Ovaj dio eksperimenta sam radio na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci RNA su ekstrahirani u tri fenološke faze: duboko zimsko mirovanje (5 mjeseci nakon inokulacije cijepljenjem u „zeleno“), suženje ili „plač“ vinove loze (8 mjeseci nakon inokulacije) te u fazi pripreme za zimsko mirovanje (16 mjeseci nakon inokulacije).

#### **3.5.5.1. Procjena efikasnosti početnica za relativnu kvantifikaciju**

Evaluaciju početnica koje sam koristio u pokusu proveo sam tako da sam prvotno napravio qPCR analizu sa serijskim razrjeđenjima cDNA (0, 5 puta, 10 puta i 20 puta) u triplikatu. Za kreiranje razrjeđenja uzeo sam uzorke u kojima sam prisutnost pojedinog virusa prethodno utvrdio standardnom RT-PCR reakcijom. Združivanjem dva uzorka kojima je potvrđena prisutnost pojedinog virusa standardnom PCR reakcijom predstavljao je ishodišnu točku za kreiranje razrjeđenja. Isti način sam primijenio i kod domaćinskih gena stabilne ekspresije gdje sam isto združio dva uzorka od kojih sam kreirao razrjeđenja. Nakon što je određena prosječna ct vrijednost svakog pojedinog uzorka, konstruirana je jednadžba pravca u kojoj nagib služi za izračun procjene efikasnosti početnica (E) prema formuli:

$$E = 10^{(-1/\text{nagib pravca})}$$

### 3.5.5.2. Određivanje domaćinskih gena stabilne ekspresije

Za odabrane kandidate koristio sam domaćinske gene koji kodiraju za aktin, tubulin i gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH) koristeći početnice za navedene genske regije kako je opisano u Bester *i sur.* (2014) i navedeno u Tablici 3. Reakcijska smjesa za qPCR volumena 30 µl sadržavala je 15 µl predmiks pufera *SYBR Green*, 0,4 µM primera te 1 µl cDNA. Sve reakcije sam izveo u triplicatu. Reakcijski ciklusi su navedeni u Tablici 11.

Tablica 11. Ciklusi lančane reakcije polimerazom u umnožavanju domaćinskih gena stabilne ekspresije.

Ciklus	Temperatura	Trajanje	Broj ponavljanja
Inicijacija reakcije	50,0 °C	2 min	1
Početna denaturacija	95,0 °C	10 min	1
Denaturacija	95,0 °C	15 s	45
Sparivanje početnica i kalupa	55,0 °C	15 s	
Produljenje lanca	60,0 °C	1 min	
Formiranje krivulje disocijacije	95,0 °C	15 s	1
	60,0 °C	1 min	
	95,0 °C	1 min	
	60,0 °C	15 s	

Odabir domaćinskog gena stabilne ekspresije sam napravio uz pomoć programskih paketa *geNorm* (Vandesompele *i sur.*, 2002) i *Normfinder* (Andersen *i sur.*, 2004) posebno dizajniranih kao dodaci Microsoft Excelu za ovu namjenu.

### 3.4.5.3. Određivanje relativne koncentracije virusa

Nakon odabira domaćinskih gena stabilne ekspresije pristupio sam relativnoj kvantifikaciji virusa, s posebnim naglaskom na GLRaV-3. Prvi korak u relativnoj kvantifikaciji koji sam napravio je bio provođenje reakcije sa specifičnim početnicama za svaki pojedini virus, prethodno evaluiranih kako je opisano u poglavlju 3.4.5.1. Sve reakcijske smjese za svaki testirani virus ukupnog volumen 30 µl sadržavale su 15 µl *SYBR Green*-a i 1 µl cDNA, dok su koncentracije početnica u smjesi za svaki testirani virus navedene u tablici 3. Uvjeti reakcije koje sam koristio su isti kao oni opisani u prethodnom poglavlju. Dobivene ct vrijednosti su normalizirane u odnosu na domaćinske gene stabilne ekspresije i određena im je relativna koncentracija izražena kao *fold change* prema formuli:

$$\text{fold change} = 2^{(ct(\text{domaćinskog gena}) - ct(\text{virusnog gena}))}$$

Kasniju statističku obradu proveo sam u računalnom programu *Statistica*.

### 3.5.5.4. Analiza krivulje disocijacije PCR produkata

U svrhu određivanja i potencijalnog kvantificiranja genomskih varijanti virusa GLRaV-3 pristupio sam metodi analize krivulje disocijacije PCR produkata (*High resolution melt analysis*-HRM). Ovaj dio eksperimenta sam provodio u Laboratoriju za nasljedni rak na Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Prethodno samom generiranju krivulje disocijacije napravio sam PCR reakciju u uzorcima prethodno pozitivnima na prisutnost GLRaV-3 i poznatog sastava virusne populacije navedenog virusa koristeći metodu kako je opisana u Bester *i sur.*, 2012. Reakcijska smjesa od 25  $\mu$ l sadržavala je 12,5  $\mu$ l *Kapa HiFi HotStart Ready Mix*a, 0,4  $\mu$ M svake početnice i 2  $\mu$ l cDNA. Reakcijski uvjeti su navedeni u Tablici 12.

Tablica 12. Reakcijski uvjeti za PCR s početnicama dizajniranim za analizu krivulje disocijacije PCR produkata (HRM) koje umnožavaju dijelove genomskih regija HSP70h (HRM4) i ORF1a (HRM6).

Ciklus	Trajanje	Temperatura	Broj ponavljanja
Početna denaturacija	5 min	94,0 °C	1
Ponavljajući ciklus	10 s	94,0 °C	45
	10 s	HRM4: 60,0°C HRM6: 65,0°C	
	20 s	72,0 °C	
Završna ekstenzija	7 min	72,0 °C	1

PCR produkte sam zatim pomiješao s posebnom bojom *LCGreen Plus* na način da sam 9  $\mu$ l produkta dodao 1  $\mu$ l boje. Ova boja se fino ugrađuje u dvolančane lance DNA što je važan preduvjet za ovakav tip analize. Pomiješanu boju i PCR produkt sam zatim zagrijao pri 98 °C 1 minutu i potom pri 40 °C 5 minuta da bih osigurao pravilno vezivanje boje za dvolančanu DNA. Uzorke sam potom analizirao na uređaju *High-Resolution Melter instrument* (HR-1, Idaho Technology) pri temperaturnom rasponu od 77°C do 91°C.



### **3.6. Morfološki i fiziološki pokazatelji**

#### **3.6.1. Pojavnost i intenzitet simptoma**

Evaluaciju pojavnosti i intenziteta simptoma sam radio na biljkama u kontroliranom stakleničkom pokusu sustavnim praćenjem tijekom cijelog vegetacijskog perioda vinove loze. Evaluaciju sam provodio na svim replikatima biljaka zaraženih pojedinim inokulumom, kao i na kontrolnim biljkama. Broj biljaka svake sorte zaražene inokulumima ovisio je o uspješnosti inokulacije metodom cijepljenja „na zeleno“. Simptomi su karakterizirani u razdoblju kasnog ljeta i zaražene biljke sam rangirao kao:

- asimptomatične (AS) - biljke bez vidljivih simptoma
- blagi simptomi (MI) - biljke sa blagim međužilnim crvenilom i sporadičnim uvijanjem listova
- srednje izraženi simptomi (MO) - biljke s izraženim međužilnim crvenilom i uvijanjem na više od pola lisne mase
- jaki simptomi (S) - cijela lisna masa biljke zahvaćena međužilnim crvenilom i uvijanjem

#### **3.6.2. Mjerenje porasta biljke**

Mjerenje porasta biljke i ostalih fizioloških parametara sam napravio u jednoj vegetacijskoj sezoni. Mjerenje porasta svih replikata biljaka zaraženih pojedinim inokulumom i kontrolnih biljaka napravio sam pomoću mjerne trake gdje sam mjerio porast svake grane u fenofazi pripreme za zimsko mirovanje. Osim toga, prebrojao sam broj internodija na svakoj grani pojedine biljke. Porast sam u ovom slučaju izrazio kao prosječnu duljinu internodija na svakoj biljci, a izračun sam napravio podijelivši duljinu grane sa brojem internodija. Prosječna duljina internodija izražena je u centimetrima (cm).

#### **3.6.3. Permeabilnost membrane**

Uzeo sam po jedan potpuno razvijeni list (svježi uzorak) svih replikata biljaka zaraženih pojedinim inokulumom i kontrolnih biljaka te sam iz svakoga izrezao po dva lisna diska promjera otprilike 5 mm. Lisni diskovi koje sam izrezao pripadaju srednjoj transverzalnoj sekciji lista. Svaki lisni disk sam stavio u zasebnu epruvetu i tri puta ga isprao u deioniziranoj vodi kako bih uklonio površinski vezane elektrolite. Lisne isječke sam zatim inkubirao u zatvorenoj staklenoj epruveti s 10 ml deionizirane vode u vodenoj kupelji s trešnjom pri 25°C.

Nakon 24 h mjerio sam električni konduktivitet otopine. Epruvete s uzorcima sam ponovno napunio s 10 ml deionizirane vode te sam ih autoklavirao pri 120°C i 103.1 kPa 20 min. Drugo očitavanje konduktiviteta sam mjerio pri 25°C. Permeabilnost membrane sam izračunao po slijedećoj formuli (Tarhanen *i sur.*, 1997):

$$C1/(C1 + C2) (\%)$$

Gdje je C1 konduktivitet izmjeren nakon 24 h rehidracije u deioniziranoj vodi, a C2 konduktivitet izmjeren nakon autoklaviranja i uravnoteženja pri 25°C.

#### **3.6.4. Relativni sadržaj vode**

Relativni sadržaj vode (RWC) sam odredio na uzorkovanim svježim listovima svih replikata biljaka zaraženih pojedinim inokulumom i kontrolnih biljaka kojima sam izrezao lisne diskove promjera 5mm. Individualne lisne diskove (dva po uzorkovanom listu) sam stavio u zasebnu epruvetu za svaki isječak. Svježju masu lisnih diskova sam odredio netom nakon uzorkovanja, a masu nabubrenih diskova nakon rehidracije u mraku najmanje 18 h (Gucci *i sur.*, 1997). Suhu masu sam odredio nakon sušenja lisnih diskova u peći pri 105°C do konstantne mase. RWC sam izračunao iz slijedeće jednadžbe:

$$RWC=100((FW-DW)/(TW-DW))$$

Gdje FW predstavlja masu svježeg lisnog diska, TW predstavlja masu nabubrenih lisnih diskova, a DW suhu masu lisnih diskova.

#### **3.6.5. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata**

Određivanje sadržaja klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida radio sam prema protokolu opisanom u Lichtenthaler (1987). Uzorkovao sam sve potpuno razvijene listove u kasnom ljetu od svih replikata biljaka zaraženih pojedinim inokulumom i kontrolnih biljaka, mjereći svaki replikat zasebno. Uzorkovane listove sam pripremio liofiliziranjem i usitnjavanjem u homogenizatoru. Odvagao sam po 5 mg homogeniziranog tkiva (DW) te sam ga rehidrirao u 100 µl destilirane vode najmanje 10 min. Uzorcima sam zatim dodao 8 ml 96 % etanola i snažno vorteksirao nekoliko puta radi homogeniziranja smjese. Epruvete sam potom omotao u aluminijsku foliju i inkubirao preko noći u mraku na sobnoj temperaturi. Slijedeći dan sam uzorke centrifugirao kratko da bih razdvojio krutu i tekuću fazu. Po 2 ml tekuće faze sam zatim prebacio u kivetu od kvarcnog stakla te sam izmjerio absorbanciju pri valnim duljinama od 470 nm, 648,6 nm, 664,2 nm i 750 nm. Sadržaj pigmenata sam izračunao iz slijedećih formula:

$$a) C_a = ((13,36 * A_{664,2} - 5,19 * A_{648,6}) * 8,1) / DW \text{ (mg/g DW)}$$

$$b) C_b = ((27,43 * A_{648,6} - 8,12 * A_{664,2}) * 8,1) / DW \text{ (mg/g DW)}$$

$$c) C_{a+b} = ((5,24 * A_{664,2} + 22,24 * A_{648,6}) * 8,1) / DW \text{ (mg/g DW)}$$

$$d) C_{x+c} = ((4,785 * A_{470} + 3,657 * A_{664,2} - 12,76 * A_{648,6}) * 8,1) / DW \text{ (mg/g DW)}$$

Gdje je  $C_a$  sadržaj klorofila  $a$ ,  $C_b$  sadržaj klorofila  $b$ ,  $C_{a+b}$  sadržaj ukupnih klorofila, a  $C_{x+c}$  sadržaj ukupnih karotenoida.

### 3.6.6. Određivanje sadržaja prolina

Mjerenja sadržaja prolina u listovima vinove loze sam radio prema principu opisanom u Bates *i sur.* (1973) gdje se za određivanje sadržaja prolina mjeri spektrofotometrijsko očitavanje reakcije ninhidrina i prolina. Uzorke potpuno razvijenih listova svih replikata biljaka zaraženih pojedinim inokulumom i kontrolnih biljaka sam ubrao u kasno ljeto, mjereći svaki replikat zasebno. Nakon branja listove sam liofilizirao i usitnio u homogenizatoru. Odvagao sam po 20 mg usitnjenog lisnog materijala u epruvete od 2 ml kojima sam dodao 1,5 ml 3 %-tne sulfosalicilne kiseline. Uzorke sam najprije snažno promiješao na vrtložnoj miješalici te sam ih potom centrifugirao 5 min pri 14000 rpm. Usporedno s time priredio sam standarde koji služe za konstrukciju baždarne krivulje iz matične otopine prolina koncentracije 1mg/ml (Tablica 13.).

Tablica 13. Priređivanje standarda za konstrukciju baždarne krivulje iz matične otopine prolina (1mg/ml).

Oznaka standarda	Volumen matične otopine prolina ( $\mu$ l)	Volumen 3 %-tne sulfosalicilne kiseline ( $\mu$ l)
0	0	700
1	1	699
2	5	695
3	15	685
4	20	680
5	30	670
6	50	650
7	70	630

Sve uzorke sam zatim prebacio u nove epruvete od 2 ml uzevši 200  $\mu$ l uzorka te sam im dodao po 500  $\mu$ l sulfosalicilne kiseline. Svim uzorcima (uključujući i one za baždarnu krivulju) sam zatim dodao 600  $\mu$ l glacijalne octene kiseline i 700  $\mu$ l otopine ninhidrina te sam uzorke snažno miješao na vrtložnoj miješalici. Slijedila je inkubacija pri 100°C 1 h kako bi se katalizirala reakcija između prolina i ninhidrina nakon koje sam sve uzorke držao na ledu najmanje 5 minuta. Absorbanciju za sve uzorke sam izmjerio na spektrofotometru pri valnoj duljini od 520 nm. Sadržaj prolina ( $\mu$ l/mg DW) je konačno određen prema formuli:

$$\text{Sadržaj prolina } (\mu\text{l/mg DW}) = ((\text{Abs}_{520\text{nm}} + b) / a) / m_{\text{DW}}$$

Gdje je:

$\text{Abs}_{520\text{nm}}$ - vrijednost absorbance svakog pojedinog uzorka pri valnoj duljini od 520 nm

b- vrijednost odsječka na osi y pripadajuće baždarne krivulje

a- vrijednost koeficijenta nagiba pravca pripadajuće baždarne krivulje

$m_{\text{DW}}$ - masa suhe tvari pojedinog uzorka

### **3.7. Statistička obrada rezultata**

#### **3.7.1. Statistička obrada rezultata dobivenih relativnom kvantifikacijom virusa**

Nakon normalizacije Ct vrijednosti za svaki pojedini virus u odnosu na geometrijsku sredinu odabranih domaćinskih gena stabilne ekspresije pristupio sam analizi podataka. Kao set podataka za statističku obradu koristio sam  $\Delta$ Ct vrijednosti koje predstavljaju logaritamski transformirane podatke (log fold change) s normalnom distribucijom, za razliku od izvornih podataka dobivenih formulom  $2^{\Delta\text{Ct}}$ .

#### Relativna kvantifikacija virusa uvijenosti lista vinove loze 3

Normaliziravši Ct vrijednosti dobivene za obje genomske regije virusa uvijenosti lista vinove loze 3 (ORF1a i CP) zasebno s onima odabranih domaćinskih gena stabilne ekspresije dobio sam  $\Delta$ Ct vrijednosti koje sam koristio u statističkoj analizi. Prvo sam usporedio  $\Delta$ Ct vrijednosti dviju genomskih regija u sva tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) provevši Studentov t-test.

Da bih usporedio razlike između relativne koncentracije GLRaV-3 u različitim terminima uzorkovanja koristeći  $\Delta$ Ct vrijednosti proveo sam analizu varijance (ANOVA test) i višestruku

usporedbu Bonfferoni post hoc testom. Ovakvu analizu sam napravio za sve biljke zaražene s GLRaV-3 zajedno, kao i za biljke zaražene s pojedinim inokulumom (II, X, Y, Q, Z) posebno.

Razlike u relativnoj koncentraciji GLRaV-3 između biljaka zaraženih pojedinim inokulumom sam testirao koristeći analizu varijance uz višestruku usporedbu Dunettovim post hoc testom unutar svakog od pojedinih termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije). Dunettov test uspoređuje sve pojedine tretmane s kontrolnim, a kao kontrolu u ovom slučaju sam koristio biljke zaražene samo s GLRaV-3 (inokulum II).

Da bih usporedio razlike između pojedinih sorti u relativnoj koncentraciji GLRaV-3 dobivene  $\Delta Ct$  vrijednosti GLRaV-3 iz svake pojedine biljke zaražene različitim inokulumima kod svake sorte sam normalizirao s  $\Delta Ct$  vrijednosti biljaka zaraženim isključivo s GLRaV-3 (inokulum II) svake pojedine sorte. Time sam dobio  $\Delta\Delta Ct$  vrijednosti koje sam kasnije uspoređivao provevši analizu varijance (ANOVA) i višestruku usporedbu Bonfferoni post hoc testom.

#### Relativna kvantifikacija ostalih virusa

Kod virusa GVA, GPGV, GRSPaV, GFkV, GLRaV-1 i GLRaV-2 odredio sam  $\Delta Ct$  vrijednosti normalizirajući Ct vrijednosti njihove CP genomske regije s onima gemetrijske sredine odabranih domaćinskih gena stabilne ekspresije. Svim virusima kojima su određene  $\Delta Ct$  vrijednosti u svakom pojedinom uzorku sam primjenom analize varijance (ANOVA test) i post hoc testa (višestruka usporedba Bonferroni post hoc testom) testirao razlike između pojedinih termina uzorkovanja. To sam napravio za sve biljke zaražene pojedinim virusom neovisno o sastavu inokuluma, kao i za sve biljke zaražene pojedinim inokulumom posebno.

Da bih usporedio razlike između biljaka zaraženih inokulumima različitog sastava koji sadrže isti virus unutar istog termina uzorkovanja primijenio sam analizu varijance i višestruku usporedbu Bonferroni post hoc testom za  $\Delta Ct$  vrijednosti pojedinog virusa.

#### **3.7.2. Statistička obrada rezultata morfoloških i fizioloških pokazatelja**

Nakon mjerenja sadržaja fotosintetskih pigmenata, prolina, relativnog sadržaja vode, permeabilnost membrane i porasta biljke pristupio sam odabiru primjerenih parametrijskih testova za svaki pojedini parametar zasebno.

Sadržaju fotosintetskih pigmenata (klorofila *a* i *b* te ukupnih karotenoida), prolina i porasta biljke sam testirao normalnost distribucije za svaki pojedini parametar ukupno, kao i

za svaku pojedinu sortu zasebno Shapiro-Wilk testom. U slučaju potvrde normalnosti distribucije za promatrani parametar pristupio sam analizi varijance uz višestruku usporedbu Bonfferoni post hoc testom.

Relativni sadržaj vode i permeabilnost membrane su parametri koje sam nakon mjerenja morao transformirati u primjereni oblik za primjenu parametrijskih testova s obzirom da su isti izraženi u postotcima. To sam napravio koristeći arcus sinus operator, a nakon transformacije sam pristupio testiranju normalnosti distribucije za svaki pojedini parametar ukupno, a kasnije i na razini svake sorte Shapiro-Wilk testom. U slučaju potvrde normalnosti distribucije primijenio sam analizu varijance uz višestruku usporedbu Bonfferoni post hoc testom.

Ekspresiju simptoma sam uspoređivao tako da sam pojedinom intenzitetu simptoma opaženih kod pojedine biljke dodijelio rankove kako slijedi: asimptomatična zaraza (AS) – 0, blagi simptomi (MI) – 1, srednje izraženi simptomi (MO) – 2 i jaki simptomi (S) – 3. Da bih usporedio rankove primijenio sam neparametrijski Kruskal Wallis test ( $p < 0,05$ ) i višestruku usporedbu Dunnovim post hoc testom.

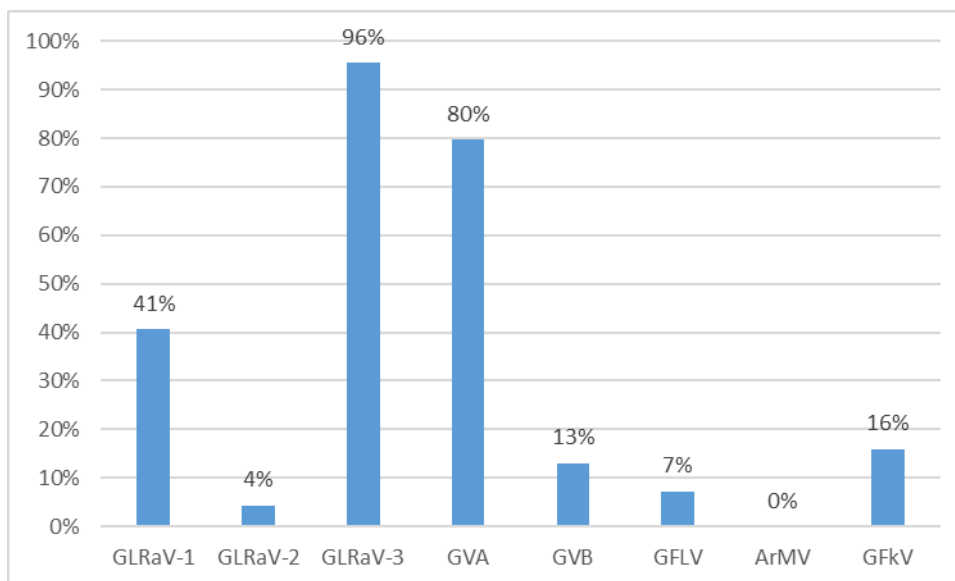
## **4. REZULTATI**

### **4.1. Pojavnost najznačajnijih virusa vinove loze u uzorcima autohtonih dalmatinskih sorti vinove loze**

Pod pretpostavkom da uzorci iz kolekcijskog nasada Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša imaju visoku pojavnost virusa istražena je prisutnost 10 ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze. Rezultati su prikazani za 71 uzorak 16 autohtonih dalmatinskih vinskih sorti te posebno za 35 uzoraka naše najznačajnije crne vinske sorte 'Plavac Mali'. Preliminarno istraživanje je provedeno metodom ELISA na 8 virusa uslijed nepostojanja komercijalnih kompleta reagensa za detekciju virusa sivog pinota (GPGV) i virusa jamičavosti podloge Rupestris du Lot (GRSPaV). Istraživanje metodom ELISA provedeno je na 69 uzoraka autohtonih dalmatinskih sorti dok dva uzorka sorte 'Plavina' nisu uključena u preliminarno serološko istraživanje. Konačna pojavnost najznačajnijih virusa utvrđena je metodama lančane reakcije polimerazom različitih izvedbi.

#### **4.1.1. Serološka detekcija osam ekonomski najznačajnijih virusa u odabranim uzorcima autohtonih dalmatinskih sorti**

U odabranih 69 uzoraka autohtonih dalmatinskih sorti proveo sam preliminarno serološko istraživanje na pojavnosti osam ekonomskih najznačajnijih virusa vinove loze. Istražio sam pojavnost slijedećih virusa: virus uvijenosti lista vinove loze 1 (GLRaV-1), virus uvijenosti lista vinove loze 2 (GLRaV-2), virus uvijenosti lista vinove loze 3 (GLRaV-3), virus vinove loze A (GVA), virus vinove loze B (GVB), virus mozaika gušarke (ArMV), virus lepezastosti lista vinove loze (GFLV) i virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV). Rezultati su prikazani na Slici 9.



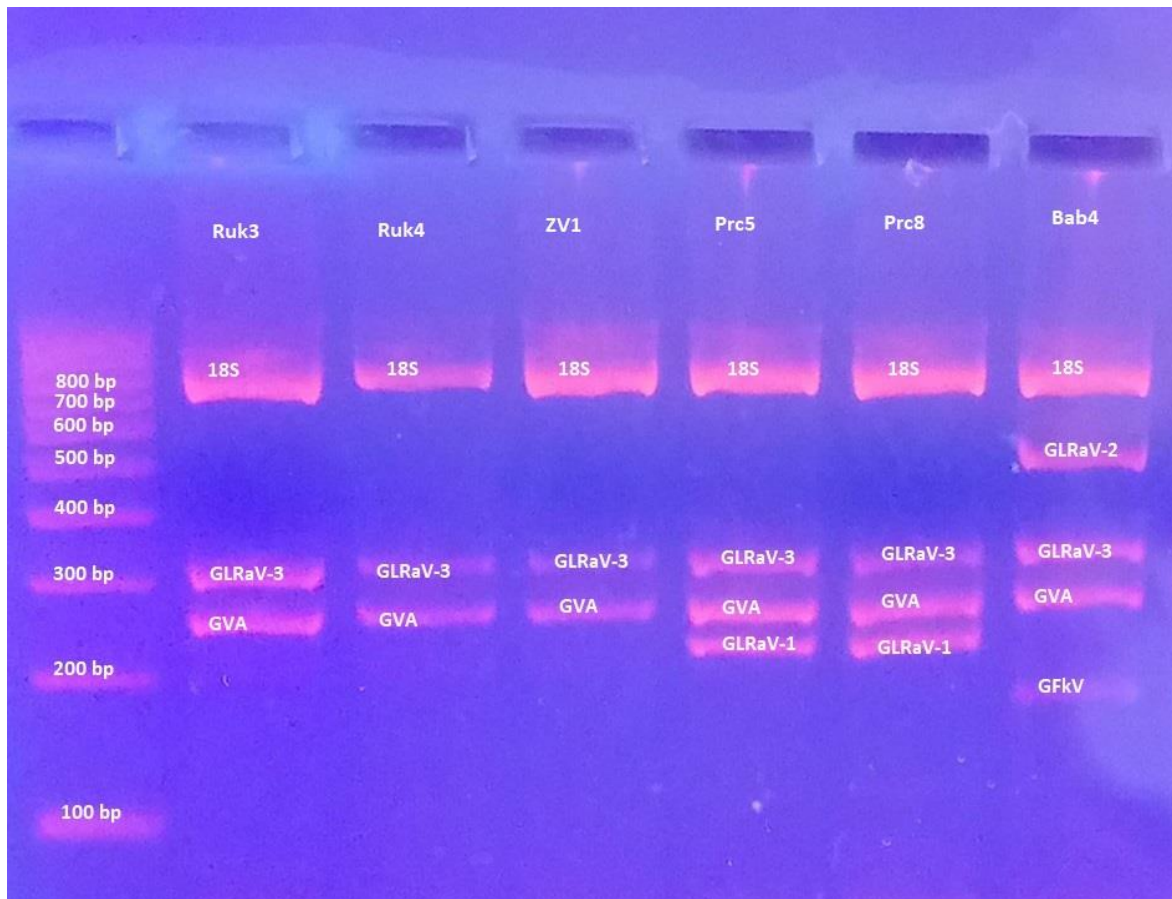
Slika 9. Pojavnost osam ekonomski najznačajnijih virusa u odabranih 69 uzoraka autohtonih dalmatinskih sorti dobivena metodom ELISA. Kratice za nazive pojedinih virusa su kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke i GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze.

Iz Slike 9. vidljivo je da je najveća pojava virusa uvijenosti lista vinove loze 3 (GLRaV-3, 96 %), kojeg sa 80 % slijedi virus vinove loze A (GVA), dok virus mozaika gušarke (ArMV) nije detektiran u promatranom uzorku. Ostali virusi javljaju se u manje od 50% uzoraka.

#### 4.1.2. Pojavnost deset ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze utvrđena molekularnim metodama

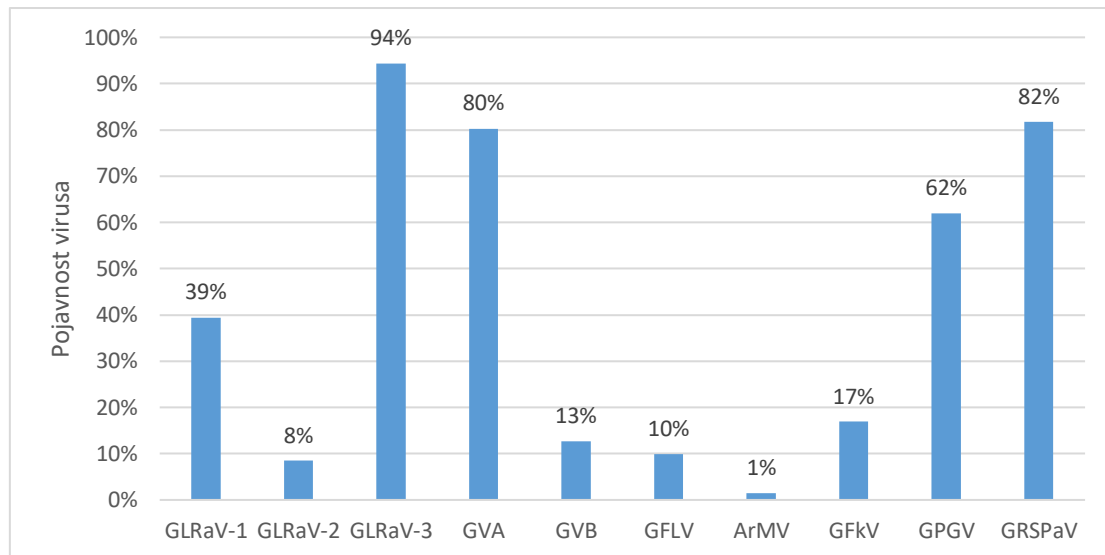
U 71 uzorku 16 različitih autohtonih sorti, kao i u 35 uzoraka različitih klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali', ispitaio sam pojava slijedećih virusa: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB, ArMV, GFLV, GFkV, GRSPaV i GPGV. Pojava svih virusa, osim GPGV-a, je potvrđena RT-PCR reakcijom s više pari početnica (Slika 10.), dok je pojava GPGV-a ispitana zasebnom RT-PCR reakcijom. U odnosu na 69 uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti na kojima je provedeno serološko istraživanje prisutnosti virusa, dva dodatna uzorka koja sam testirao PCR metodama predstavljaju dva trsa sorte 'Plavina', čineći ukupno 71 uzorak.



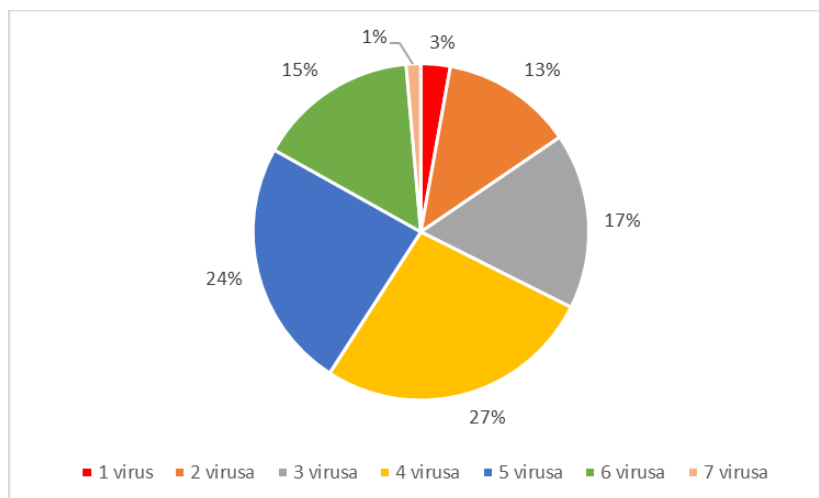


Slika 10. Primjer rezultata agarozne elektroforeze produkata RT-PCR reakcije s više pari početnica za detekciju najznačajnijih virusa vinove loze kod uzoraka sorti 'Rukatac' (Ruk3 i Ruk 4), 'Zlatica Vrgorska' (ZV1), 'Prč' (Prc5 i Prc8) i 'Babić' (Bab4). Kao interna pozitivna kontrola u ovoj reakciji je korištena 18S ribosomska RNA (18S rRNA). Duljine razdvojenih fragmenata bile su 844bp (18S rRNA), 543 bp (GLRaV-2), 336 bp (GLRaV-3), 272 bp (GVA), 232 bp (GLRaV-1) i 179 bp (GFkV).

U 71 uzorku 16 autohtonih dalmatinskih sorti zabilježio sam najveću pojavnost virusa GLRaV-3 (94 %), GRSPaV (82 %) i GVA (80 %) dok je najmanja pojavnost ona virusa ArMV (1 %). Pojavnost pojedinih virusa je prikazana na Slici 11., a nijedan testirani trs nije bio bez virusa. Rezultate pojavnosti po pojedinačno testiranom trsu svake sorte sam prikazao u Prilogu 1.



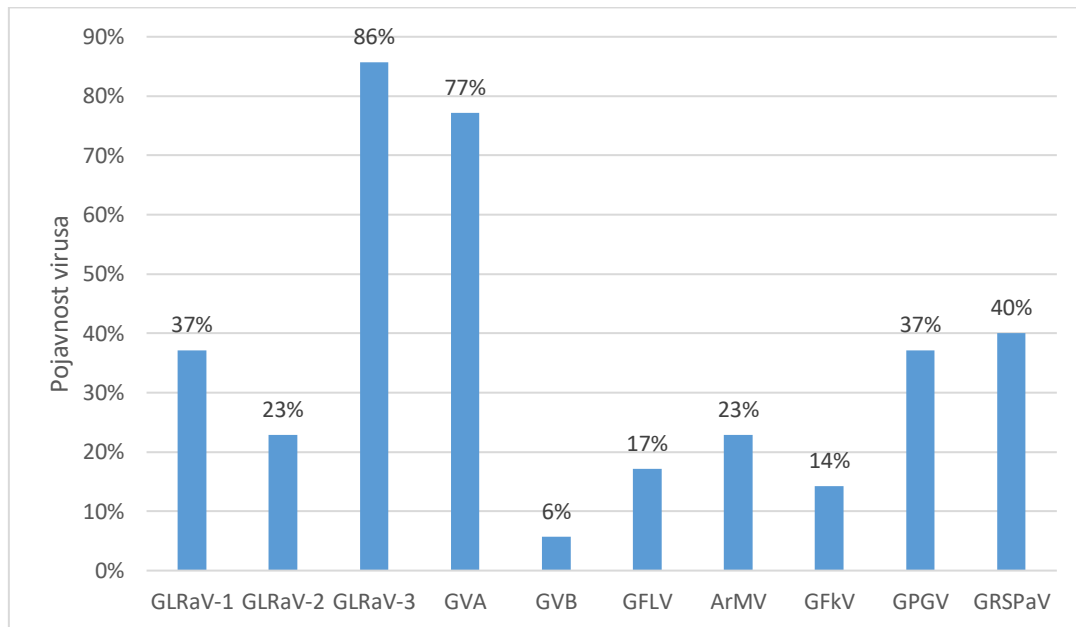
Slika 11. Pojavnost deset testiranih virusa u 71 uzorku 16 autohtonih dalmatinskih sorti. Kratice za nazive pojedinih virusa su kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke, GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze, GPGV - virus sivog pinota i GRSPaV - virus jamičavosti podloge *Rupestris du Lot*.



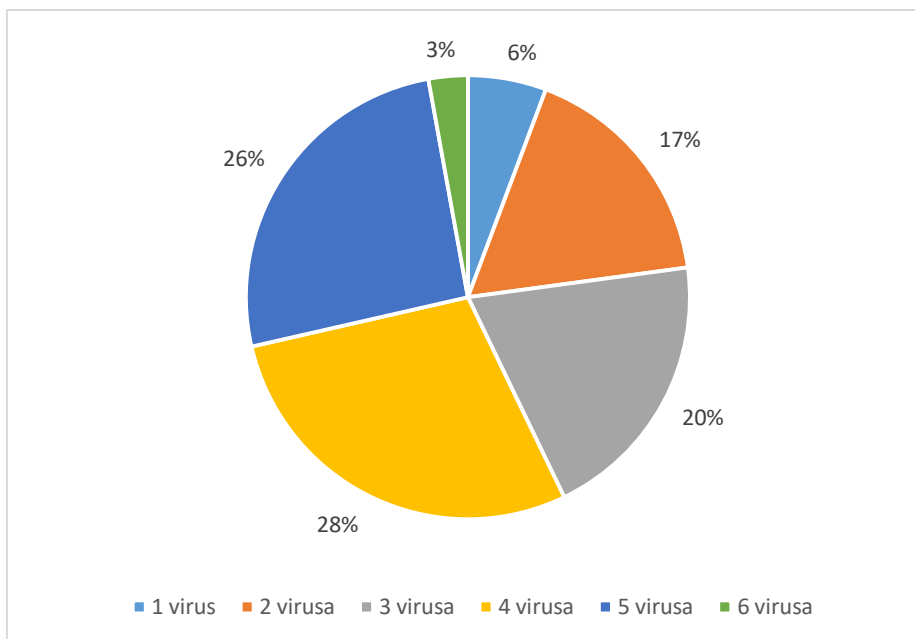
Slika 12. Pojavnost samostalnih i različitih miješanih infekcija u 71 uzorku 16 autohtonih dalmatinskih sorti.

Iz Slike 12. primjetno je da je u testiranih 16 autohtonih dalmatinskih sorti više od 2/3 trsova bilo zaraženo s četiri ili više virusa istovremeno. Najmanje trsova sadrži jedan (3 %) i sedam virusa (1 %; uzorak Vu7). Broj testiranih trsova pojedinih sorti se razlikovao ovisno o dostupnom broju unutar kolekcijskog nasada, a u idealnom slučaju testirano je pet trsova pojedine sorte. Najveći prosječni broj virusa sam detektirao kod sorte 'Babić' (6), a najmanje kod sorte 'Plavac Mali' (2,2; Prilog 1).

I u uzorku 35 klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' zabilježio sam najveću pojavnost GLRaV-3 (86%), GVA (77%) i GRSPaV (40%). Najmanja pojavnost bila je ona GVB (6%). Virusi iz skupine infektivne degeneracije (GFLV i ArMV) su bili zastupljeni u većoj mjeri nego kod uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti. Pojavnost svih testiranih virusa je prikazana na Slici 13., a ni u ovom slučaju nijedan trs nije pronađen bez virusa.



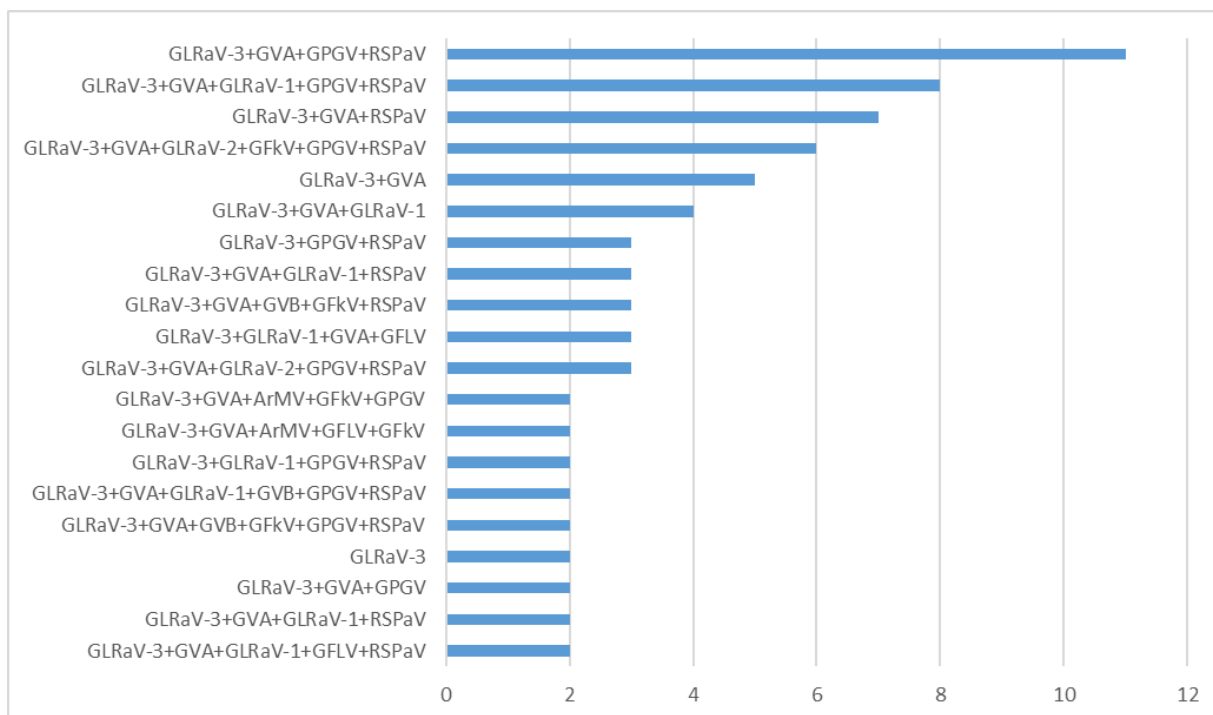
Slika 13. Pojavnost deset testiranih virusa u uzorku 35 klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali'. Kratice za nazive pojedinih virusa su kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke, GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze, GPGV - virus sivog pinota i GRSPaV - virus jamičavosti podloge Rupestris du Lot.



Slika 14. Pojavnost samostalnih i miješanih infekcija u 35 testiranih uzoraka klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali'.

Pojavnost miješanih infekcija je prevladavala i u testiranim klonskim kandidatima sorte 'Plavac Mali' (Slika 14.) gdje kao i u slučaju uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti više od 2/3 testiranih trsova je sadržavalo četiri ili više virusa. Najmanja je pojava bila onih sa šest virusa (3 %; uzorak 043/1). Unatoč velikim razlikama u testiranim uzorcima nisam ustanovio povezanost između geografskog podrijetla pojedinog trsa i broja virusa u njima.

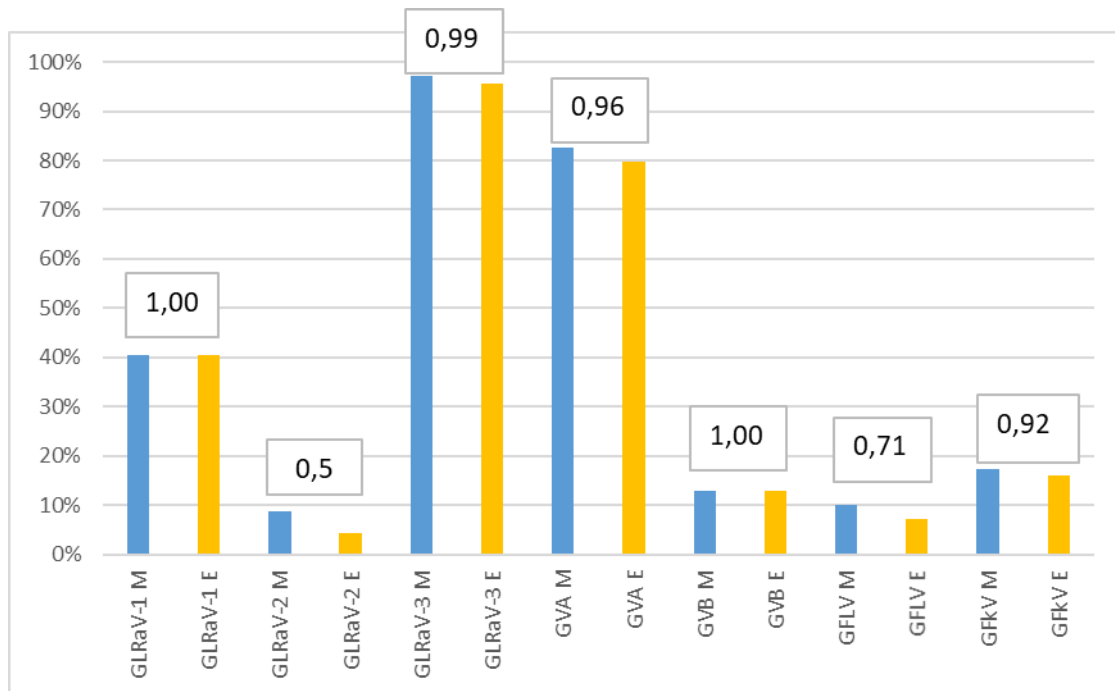
U ukupno 93 trsa u kojima je potvrđena zaraza s GLRaV-3, odredio sam najučestalije koinfekcije ovog virusa s drugim ekonomski najznačajnijim virusima (Slika 15.). GLRaV-3 sam najčešće detektirao u kombinaciji s GVA, GPGV i GRSPaV (11 trsova) te s GVA, GLRaV-1, GPGV i GRSPaV (osam trsova). Posebno bih istaknuo pronalazak čak dva trsa vinove loze zaražena samo s GLRaV-3 (uzorci 217/1 i 217/2; Prilog 1.).



Slika 15. Najučestalije kombinacije GLRaV-3 i drugih ekonomski značajnih virusa u 93 uzorka iz kolekcijskog nasada Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša. Brojevi na apscisi predstavljaju broj trsova zaraženih pojedinom kombinacijom.

#### 4.1.3. Usporedna analiza rezultata dobivenih preliminarnim serološkim istraživanjem i reakcijom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom s više parova početnica

Usporednom analizom rezultata dobivenih preliminarnim serološkim testiranjem i onih dobivenih RT-PCR testom s više parova početnica (Slika 16.) za iste uzorke želio sam utvrditi razlike u osjetljivosti pojedinih metoda u detekciji virusa vinove loze.



Slika 16. Usporedna analiza rezultata dobivenih reakcijom RT-PCR s više parova početnica (M-plavi stupići) i rezultata dobivenih testom ELISA (E-žuti stupići) za svaki pojedini virus. Brojčana vrijednost iznad svakog virusa predstavlja omjer pozitivnih uzoraka dobivenih metodama ELISA i RT-PCR s više parova početnica. Za ArMV ovaj omjer nije prikazan s obzirom da isti nije detektiran ELISA metodom. Kratice za nazive pojedinih virusa su kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze i GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze.

Iako se pojavnost pojedinog virusa u testiranim uzorcima nije promijenila (GLRaV-3 ima najveću pojavnost, a ArMV najmanju) primjetna je veća osjetljivost RT-PCR metode u odnosu na ELISA test. Najveću razliku sam zabilježio kod GLRaV-2 gdje je PCR reakcijom detektiran ovaj virus u dvostruko većem broju uzoraka u odnosu na ELISA test. U slučaju GLRaV-1 i GVB nisam zabilježio nikakve razlike u osjetljivosti detekcije pojedinih metoda gdje sam detektirao zarazu kod jednakog broja trsova objema metodama.

## 4.2. Populacijska raznolikost virusa uvijenosti lista vinove loze 3

### 4.2.1. Umnažanje dijela genomske regije HSP70h GLRaV-3

Iz 33 uzoraka cDNA trsova kojima je prethodno potvrđena zaraza s GLRaV-3 metodom PCR sam umnožio dio genomske regije HSP70h GLRaV-3 duljine 560 bp od 16 autohtonih dalmatinskih sorti (po dva predstavnika od svake sorte) i devet uzoraka klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali'. Amplikone sam vizualizirao u 1 %-tnom agaroznom gelu nakon elektroforeze uz primjenu molekularnog markera (*BenchTop 100bp DNA Ladder*) te je u svaku reakciju bila uključena pozitivna i negativna kontrola reakcije (Slika 17.).

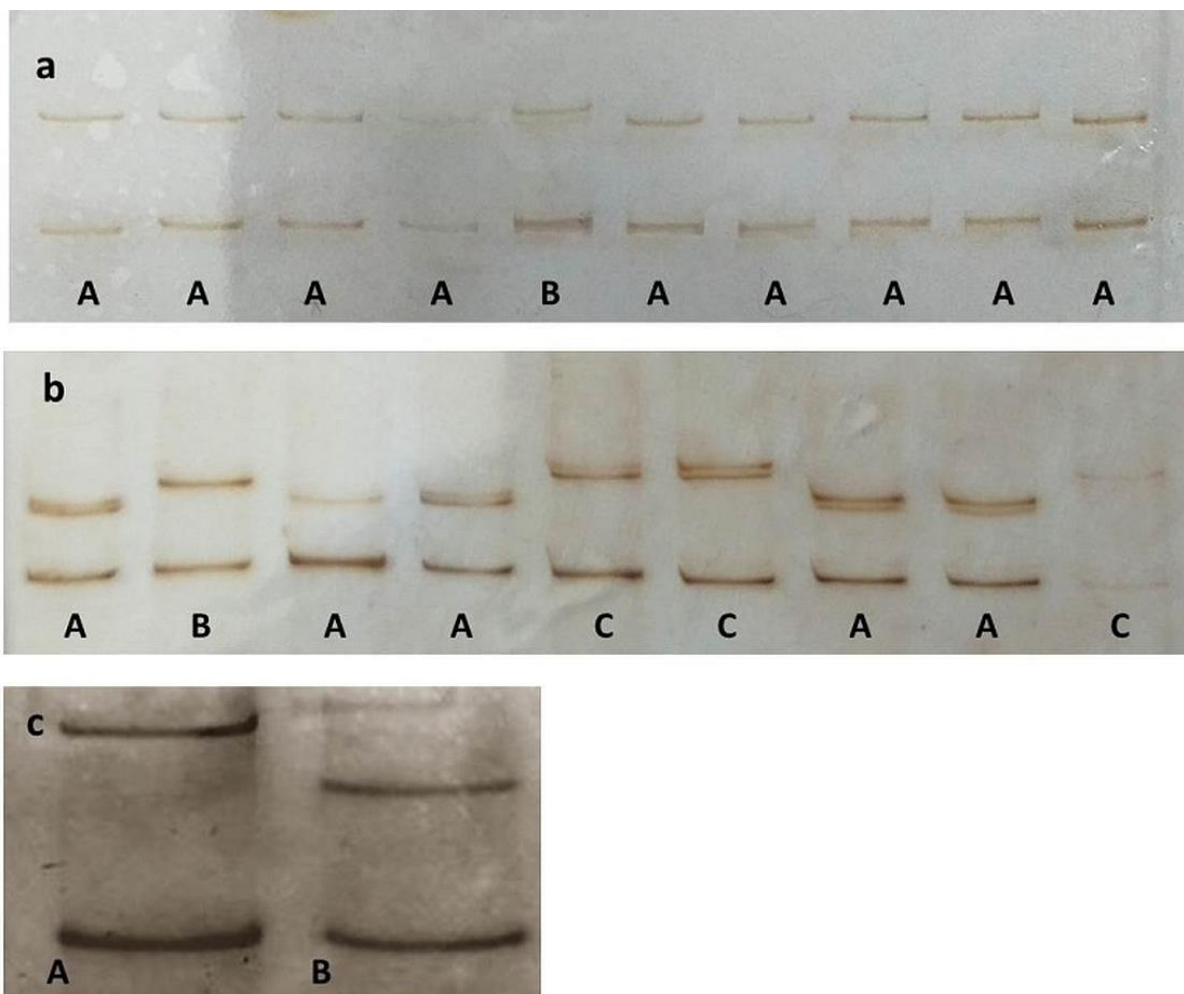


Slika 17. Primjer agaroznog gela s umnoženim produktom dijela genomske regije HSP70h GLRaV-3. U reakciju je uključena pozitivna i negativna kontrola. Duljina produkta je 560 parova baza (bp), a kratice na slici predstavljaju uzorke sorte 'Vugava' (Vu6 i Vu7), pozitivne kontrole reakcije (Poz) i negativne kontrole reakcije (Neg).

### 4.2.2. Detekcija različitih genomskih varijanti virusa GLRaV-3

Nakon transformacije bakterijskih kolonija slijedila je potvrda ugradnje željenog fragmenta (inserta) iz bijelih kolonija odabranih vizualnom selekcijom gdje sam proveo dodatni PCR direktno iz samih kolonija. Produkte sam vizualizirao elektroforezom u 1 %-tom agaroznom gelu uz primjenu odgovarajućeg molekularnog markera. Za sve odabrane uzorke, po dva predstavnika od 16 autohtonih sorti (3 za sortu 'Vugava') i devet uzoraka klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali', sam uspješno dobio transformirane bakterijske stanice. Za svaki uzorak odabrao sam nasumično 20 nasumično bijelih kolonija bakterija uspješno transformiranih plazmidom s odgovarajućim insertom. Kolonije kojima je potvrđena ugradnja

željenog fragmenta (20 kolonija po uzorku) sam izdvojio za SSCP analizu gdje sam njihove PCR produkte najprije obradio u denaturacijskom puferu s ciljem formiranja jednolančanih lanaca DNA, te sam takve produkte razdvojio na vertikalnoj elektroforezi u poliakrilamidnom gelu. Nakon bojanja gelova srebrom identificirao sam različite SSCP profile koji potencijalno odgovaraju različitim genomskim varijantama virusa. Barem po jednog predstavnika svakog profila poslao sam u servis za sekvenciranje (Macrogen) na određivanje nukleotidnog slijeda u oba smjera (Slika 18.).



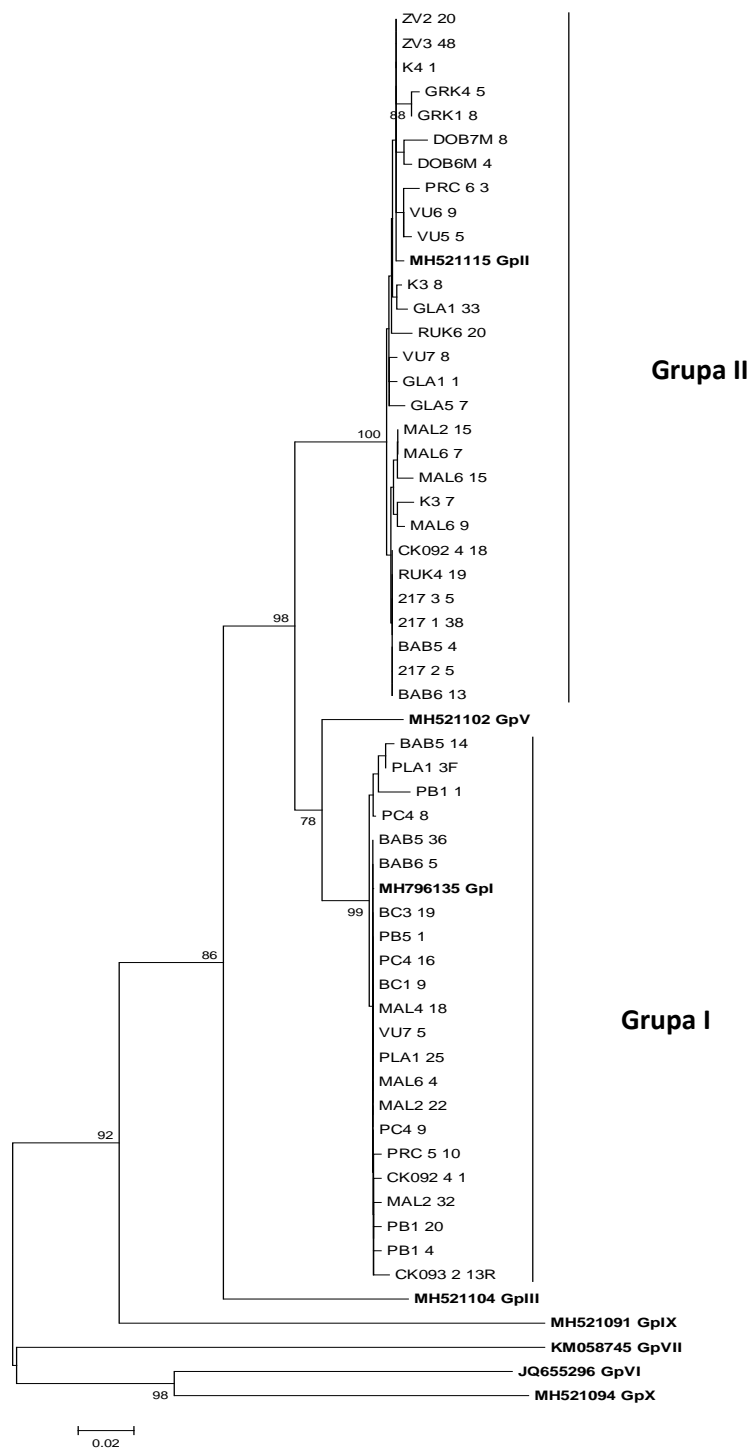
Slika 18. Primjeri različitih SSCP profila dobivenih analizom dijela genomske regije HSP70h GLRaV-3 monofiletskog izolata sorte 'Pošip Bijeli' Pb5 (a), polifiletskog izolata sorte 'Vugava Bijela' Vu7 (b), SSCP profila koji pripadaju različitim filogenijskim skupinama, I i II, iz uzorka sorte 'Plavac Mali' 096/4 (c). Velika slova na slikama (A, B i C) označavaju različite SSCP profile određene za svaki uzorak.



Primjenom programa *Sequencher* sam uredio kromatograme koje sam dobio određivanjem nukleotidnog slijeda u oba smjera te sam odredio nukleotidne sljedove genomske regije HSP70h virusa GLRaV-3 u odabranim uzorcima. Višestruko sravnjivanje dobivenih nukleotidnih sljedova s referentnim sekvencama sam napravio uz pomoć programa *Clustal W*. Referentne sekvence zajedno s njihovim pristupnim brojevima su za svaku pojedinu filogenijsku skupinu: skupina I - MH796135, skupina II - MH521115, skupina III - MH521104, skupina V - MH521102, skupina VI - JQ655296, skupina VII - KM058745, skupina IX - MH521091 i skupina X - MH521094. Upotrebom programa *MEGA* iz sravnjenih nukleotidnih sljedova generirao sam filogenijska stabla.

#### Filogenijske analize nukleotidnih sljedova razdvojenih genomskih varijanti virusa GLRaV-3 iz 16 autohtonih dalmatinskih sorti

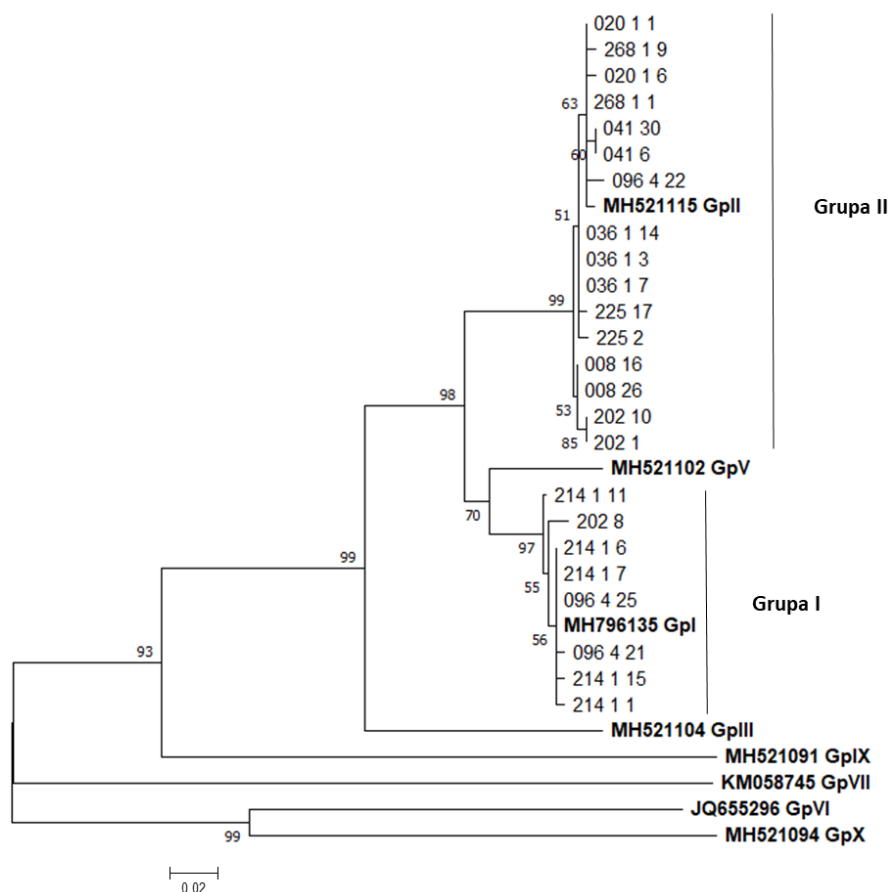
Analizom genomske regije HSP70h GLRaV-3 iz 33 uzorka 16 autohtonih dalmatinskih sorti, ukupno 139 analiziranih genomskih varijanti svrstalo se u dvije filogenijske skupine, I i II (Slika 19.). Od analiziranih trsova, njih 55 % je bilo zaraženo varijantama iz filogenijske skupine II, dok je njih 27 % bilo zaraženo varijantama filogenijske skupine I. Svrstavanje u obje filogenijske skupine sam zabilježio kod 18 % analiziranih trsova. Zbog velikog broja sekvenci, na Slici 19. sam prikazao samo reprezentativne uzorke, a prikazana topologija filogenijskog stabla podržana je visokom vrijednošću dobivenom metodom samoučitavanja (*bootstrap value*) koja je u ovom slučaju iznosila iznad 80 %. Reprezentativni nukleotidni sljedovi dobiveni u ovom istraživanju su dostupni u bazi *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pod pristupnim brojevima MW316065-MW316084.



Slika 19. Filogenijsko stablo dobiveno analizom genomske regije HSP70h GLRaV-3 139 sekvenci iz 33 uzorka 16 autohtonih dalmatinskih sorti. Analiza je provedena metodom susjednog sparivanja (*neighbor joining*) uz primjenu modela Tamura-Nei. Brojevi u čvorištima grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja (bootstrap) u 1000 ponavljanja. Skala predstavlja genetičku udaljenost ( $d=0,02$ ), a podebljane oznake sekvence referentnih izolata su preuzete iz Diaz-Lara *i sur.*, 2018.

Filogenijske analize nukleotidnih sljedova razdvojenih genomskih varijanti virusa GLRaV-3 iz odabranih klonova sorte 'Plavac Mali'

Kod uzoraka iz devet odabranih klonova sorte 'Plavac Mali', analizom genomske regije HSP70h GLRaV-3, od odabranih genomskih varijanti kojima je određen nukleotidni slijed u oba smjera su se svrstali u filogenijske skupine I i II (Slika 20.). Od analiziranih trsova njih 67 % je bilo zaraženo isključivo varijantama filogenijske skupine II, a njih 11 % je bilo zaraženo varijantama filogenijske skupine I. Zarazu sa varijantama filogenijskih skupina I i II sam odredio kod 22 % analiziranih trsova. Topologija filogenijskog stabla podržana je visokom vrijednošću dobivenom metodom samoučitavanja (*bootstrap value*) koja je iznosila iznad 80 %. Nukleotidni sljedovi dobiveni ovim istraživanjem su dostupni pod pristupnim brojevima MZ450926-MZ450948 u bazi *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).



Slika 20. Filogenijsko stablo dobiveno analizom HSP70h genomske regije GLRaV-3 iz uzoraka 9 odabranih klonova sorte 'Plavac Mali'. Analiza je provedena metodom susjednog sparivanja (*neighbor joining*) uz primjenu modela Tamura-Nei. Brojevi u čvorištima grana predstavljaju vrijednosti dobivene metodom samoučitavanja (*bootstrap*) u 1000 ponavljanja. Skala predstavlja genetičku udaljenost, a podebljane oznake sekvence referentnih izolata su preuzete iz Diaz-Lara *i sur.*, 2018.

Genomska raznolikost GLRaV-3 iz uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti i odabranih klonova sorte 'Plavac Mali'

Analiziranim sekvencama dobivenih iz uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti i odabranih klonova sorte 'Plavac Mali' sam izračunao stupanj genomske raznolikosti uz pomoć programa MEGA. Dobivene sekvence, kod svake skupine uzoraka, sam uz pomoć filogenijskih analiza svrstao u skupine, te sam odredio stupanj genomske raznolikosti za svaku skupinu posebno, kao i za sve sekvence zajedno. Referentne sekvence nisam uključio u analizu, a standardnu grešku (SE) sam izračunao metodom samoučitavanja uz 1000 ponavljanja (Tablica 14.).

Tablica 14. Rezultati analize genomske raznolikosti za sekvence iz uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti i odabranih klonova sorte 'Plavac Mali'. Skupine su određene filogenijskim analizama (Slike 19. i 20.), a standardna greška (SE) je izračunata metodom samoučitavanja uz 1000 ponavljanja.

	Uzorci iz 16 autohtonih dalmatinskih sorti		Uzorci iz devet odabranih klonova sorte 'Plavac Mali'	
Filogenijska skupina	Genomska raznolikost ( $\pi$ )	$\pm$ SE	Genomska raznolikost ( $\pi$ )	$\pm$ SE
Sve sekvence	0,033	0,006	0,029	0,005
Skupina I	0,006	0,002	0,002	0,001
Skupina II	0,019	0,004	0,012	0,002

U svim slučajevima sam izračunao veću genomsku raznolikost kod sekvenci iz više različitih sorti u odnosu na sekvence dobivene iz uzoraka sorte 'Plavac Mali'.

#### 4.3. Biološka karakterizacija izolata koji sadrže GLRaV-3 u kontroliranim uvjetima na sortama vinove loze

Od ukupno 38 različitih kombinacija virusa pronađenih u uzorcima promatranih trsova najzanimljivije su izdvojene te sam iste inokulirao na 4 različite sorte vinove loze od kojih su 3 standardne indikatorske sorte vinove loze ('Cabernet Franc', 'Merlot' i 'Pinot Noir') te naša autohtona sorta 'Tribidrag'. Korištene kombinacije (inokulumi) su navedene u Tablici 6. Upotrebljeni inokulumi su sadržavali sve viruse od 10 testiranih ekonomski najznačajnijih virusa osim GVB, ArMV i GFLV koji su imali najmanju pojavnost.

##### 4.3.1. Uspješnost zaraze cijepljenjem „na zeleno” sorata vinove loze različitim inokulumima koji sadrže GLRaV-3

Nakon inokulacije odabranih izolata koji sadrže GLRaV-3 metodom cijepljenje „na zeleno” ustanovio sam 100 % primitak navrtaka, kao i 100 % regeneraciju pojedinih sorti iz pupova matičnih biljaka. Inokulumi kojima sam cijepio biljke i njihov sastav je opisan u Tablici 6. Tri mjeseca nakon cijepljenja potvrdu prijenosa virusa sam napravio ELISA testom za virus GLRaV-3 (Tablica 15.).

Tablica 15. Rezultati ELISA testa za virus GLRaV-3 kod provjera uspješnosti inokulacije sorti u kontroliranom pokusu metodom cijepljenja „na zeleno”.

Inokulum	'Tribidrag'	'Pinot Noir'	'Cabernet Franc'	'Merlot'
II	6/6	2/2	3/3	1/1
X	5/5	2/2	1/1	2/2
Y	5/5	2/2	1/1	2/2
Q	5/5	3/3	1/1	2/2
Z	5/5	2/2	*/	2/2

\*biljke su propale iz nepoznatog razloga

Uspješnost inokulacije GLRaV-3 metodom cijepljenja „na zeleno” je bila 100 %, tj. potvrđena je zaraza GLRaV-3 u svim slučajevima kod svih sorata.

#### 4.3.2. Relativna kvantifikacija virusa kod odabranih sorti u kontroliranom pokusu u stakleniku

##### 4.3.2.1. Određivanje domaćinskih gena stabilne ekspresije

Odabrane kandidate za kontrolne domaćinske gene čija je ekspresija stabilna u različitim terminima uzorkovanja kod različitih sorti, aktin, tubulin i GAPDH sam evaluirao procjenom efikasnosti PCR reakcije njihovih specifičnih početnica i evaluacijom računalnim softverima geNorm i Normfinder (3.5.5.1 i 3.5.5.2.). Kao predložak PCR reakcije koristio sam cDNA svakog uzorka koju sam napravio reverznom transkripcijom kako je opisano u poglavlju 3.5.2. Prema rezultatima efikasnosti reakcije, u reakcijskim uvjetima preporučenim u Bester *i sur.* (2014), najvišu efikasnost replikacije su imale početnice za aktin i tubulin, dok su početnice za GAPDH imale najnižu (Tablica 16.).

Tablica 16. Procjena efikasnosti PCR reakcije početnica kandidata za domaćinske gene stabilne ekspresije.

Početnica	Efikasnost PCR reakcije	Korelacijski koeficijent ( $R^2$ )	Nagib pravca
Aktin	2,03	1	-3.2545
Tubulin	1,98	0,998	-3.3774
GAPDH	1,77	0,9709	-4.0523

Nadalje, evaluacija kandidata za domaćinske gene stabilne ekspresije analizom njihovih Ct vrijednosti primjenom računalnih softvera geNorm i Normfinder, dala je najstabilnije vrijednosti za gene koji kodiraju aktin i tubulin, dok je gen za GAPDH od odabranih pokazao najnižu stabilnost ekspresije (Tablica 17.).

Tablica 17. Rezultati evaluacije domaćinskih gena stabilne ekspresije primjenom softvera Normfinder i geNorm.

Kandidat za domaćinski gen stabilne ekspresije	<i>Normfinder stability value</i>	<i>geNorm stability value</i>
Aktin	0.28	0.454
Tubulin	0.14	0.454
GAPDH	0.70	1.336

U slučaju oba algoritma vrijednosti što bliže nuli odgovaraju genu stabilnije ekspresije. Aktin i tubulin su se pokazali najstabilnije eksprimiranimi u oba slučaja, dok je GAPDH imao najviše vrijednosti kod oba tipa evaluacije. Na temelju dobivenih rezultata odabrao sam aktin i tubulin kao kontrolne domaćinske gene stabilne ekspresije za daljnje analize. Aktinu i tubulinu sam odredio i stabilnost ekspresije u različitim fenološkim točkama tako što sam odredio razliku njihovih Ct vrijednosti za svaki pojedini uzorak i izračunao prosjek za sve uzorke unutar iste točke uzorkovanja. U prvom terminu uzorkovanja (duboka dormancija – pet mjeseci nakon inokulacije) srednja vrijednost razlike njihovih Ct vrijednosti iznosila je  $2.1 \pm 0.1$ , dok je u drugom („suzenje“ vinove loze – osam mjeseci nakon inokulacije) i trećem terminu uzorkovanja (duboka dormancija – 16 mjeseci nakon inokulacije) iznosila  $2.8 \pm 0.15$ . Manje odstupanje ove razlike u prvom terminu vjerojatno je posljedica cijepljenja koje je bilo stresan događaj za biljku i vremenski blizu ovom terminu uzorkovanja.

#### 4.3.2.2. Evaluacija efikasnosti PCR reakcije početnica za virusne gene

Prema metodi evaluacije efikasnosti PCR reakcije početnica opisanih u poglavlju 3.5.5.1. evaluirao sam odabrane početnice za viruse od interesa: GLRaV-3, GVA, GLRaV-1, GLRaV-2, GPGV, GRSPaV i GFkV. Kod svih virusa korištene su početnice za CP regiju genoma, dok su kod GLRaV-3 korištene i početnice za genomsku regiju ORF1a (Tablica 18.). Kao predložak reakcije sam koristio cDNA koju sam za svaki uzorak dobio reakcijom reverzne transkripcije kako je opisano u poglavlju 3.5.2.

Tablica 18. Procjena efikasnosti PCR reakcije početnica za virusne gene.  $R^2$  predstavlja korelacijski koeficijent.

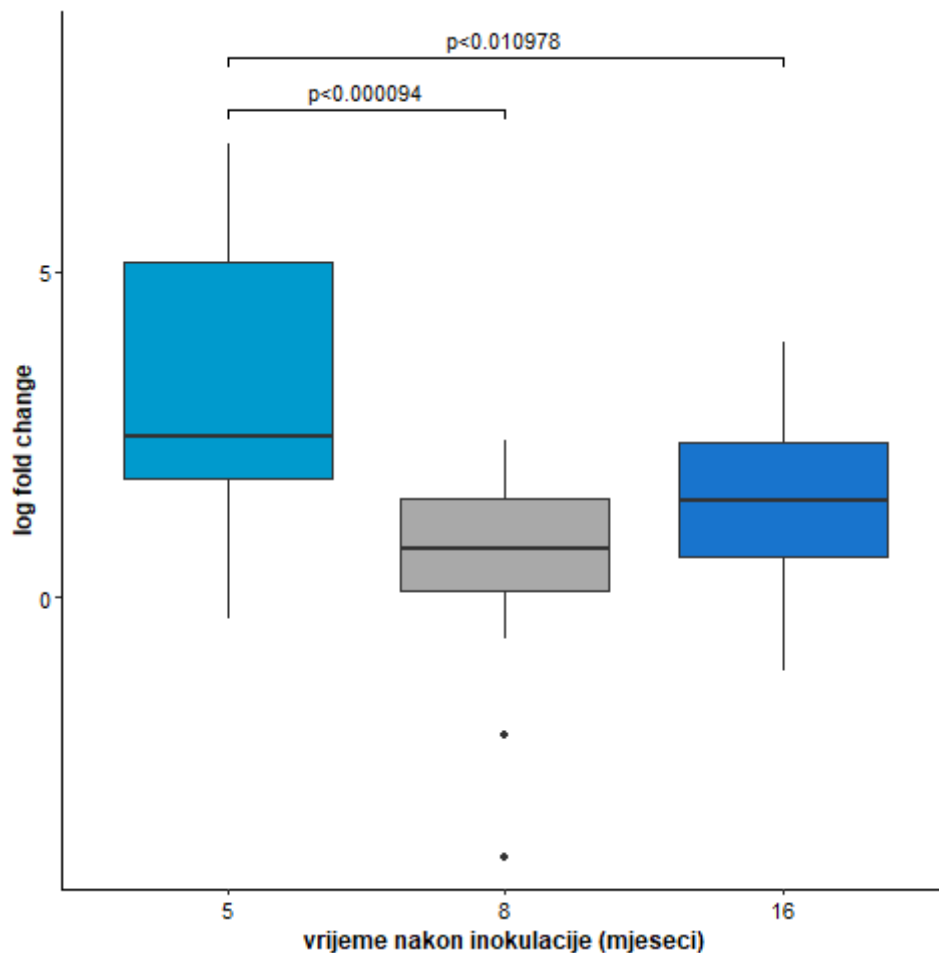
Par početnica	Efikasnost (E)	Korelacijski koeficijent ( $R^2$ )	Nagib pravca
GLRaV-3 ORF1a	1,94	0,9803	-3,4907
GLRaV-3 CP	2,02	0,9929	-3,2574
GVA	1,90	0,991	-3.5888
GRSPaV	1,92	0,991	-3.5379
GPGV	1,93	0,98	-3.4915
GLRaV-1	1,90	0,998	-3.59
GLRaV-2	2	0,997	-3.319
GFkV	1,94	0,986	-3.4698

Sve gore navedene početnice imaju amplifikacijsku efikasnost između 1,8 i 2,2 preporučenu za daljnju upotrebu u qPCR-u (Thornton i Basu, 2011).

### 4.3.2.3. Relativna kvantifikacija GLRaV-3

Nakon što sam odredio  $\Delta Ct$  vrijednosti za svaku od dviju genomskih regija GLRaV-3 zasebno (ORF1a i CP) normaliziravši njihove Ct vrijednosti s onima odabranih domaćinskih gena stabilne ekspresije analizirao sam postoje li razlike između pojedinih regija Studentovim t-testom. Unutar svakog od promatranih termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) nisam pronašao statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

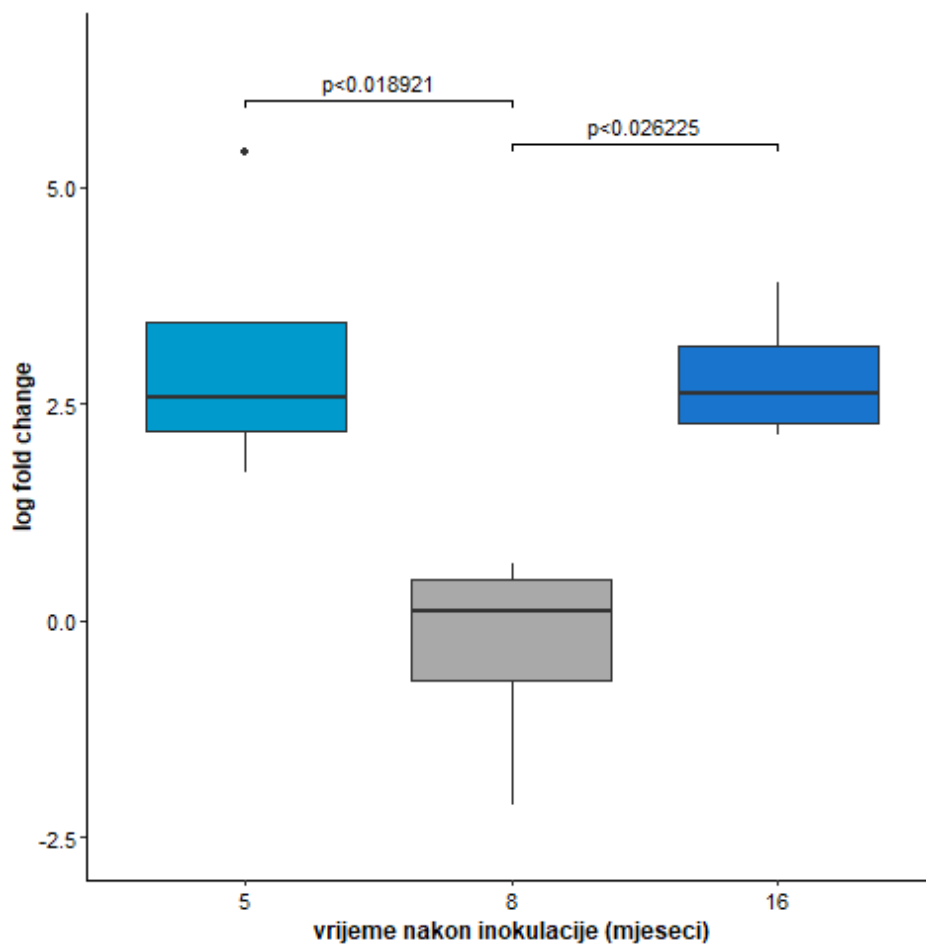
Uspoređujući  $\Delta Ct$  vrijednosti svih biljaka zaraženih s GLRaV-3 zajedno po različitim terminima uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) izračunao sam da prvi termin uzorkovanja ima značajno veću relativnu koncentraciju GLRaV-3 u odnosu na drugi i treći termin uzorkovanja (Slika 21.).



Slika 21. Usporedba replikacije GLRaV-3 izračunata pomoću  $\Delta Ct$  vrijednosti (*log fold change*) dobivenih analizom ORF1a genomске regije GLRaV-3 promatrane u različitim terminima uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) za sve zaražene biljke. Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Točke na grafu predstavljaju individualna mjerenja koja 1,5 puta premašuju gornji ili donji kvartil podataka. Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.



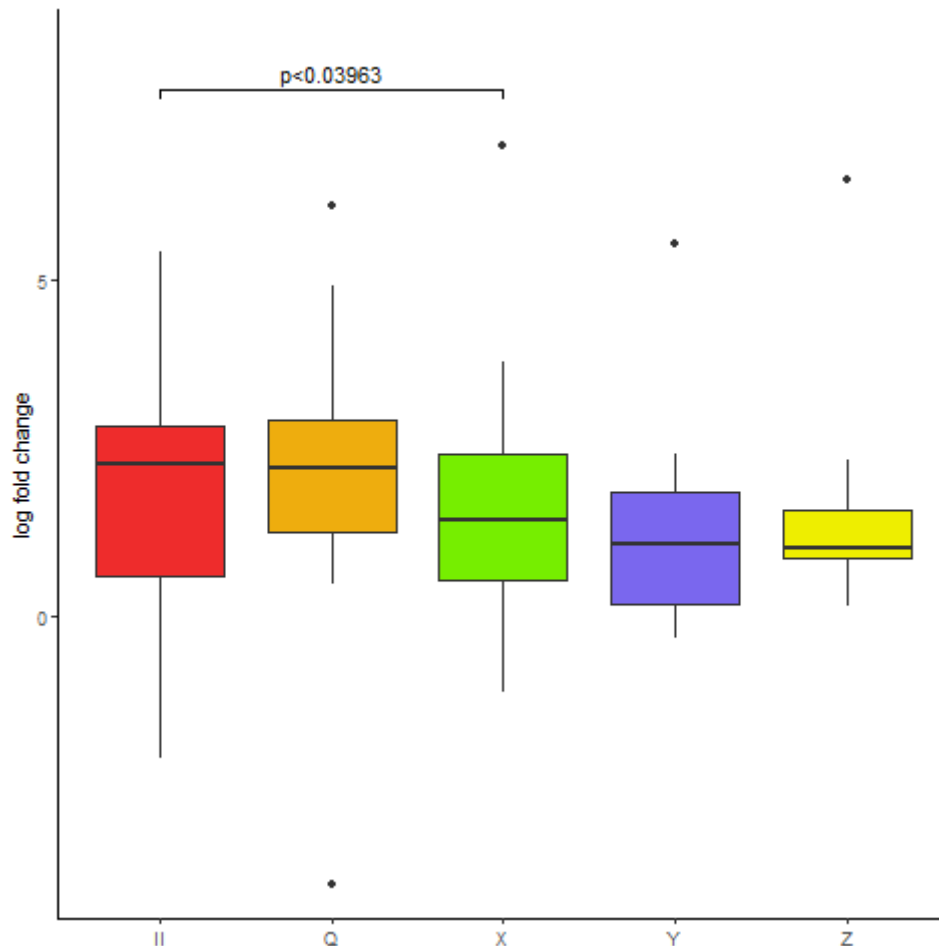
Promatrajući svaki inokulum zasebno, biljke zaražene isključivo s GLRaV-3 (inokulum II) su pokazale razlike u različitim vremenskim točkama uzorkovanja gdje su dvije istovjetne točke uzorkovanja (duboka dormancija – pet i 16 mjeseci nakon inokulacije) imale značajno višu relativnu koncentraciju GLRaV-3 u odnosu na vremensku točku „suzenja“ ili „plača“ vinove loze (osam mjeseci nakon inokulacije, Slika 22.). U slučaju biljaka zaraženih ostalim inokulumima (X, Y, Q i Z) nisam pronašao statistički značajne razlike između različitih termina uzorkovanja.



Slika 22. Usporedba replikacije GLRaV-3 izračunata pomoću  $\Delta Ct$  vrijednosti (*log fold change*) dobivenih analizom ORF1a genomske regije GLRaV-3 promatrana po različitim terminima (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) uzorkovanja za biljke zaražene inokulumom II. Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Točke na grafu predstavljaju individualna mjerenja koja 1,5 puta premašuju gornji ili donji kvartil podataka. Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.

Uspoređujući razlike u relativnoj koncentraciji GLRaV-3 između biljaka zaraženih različitim inokulumima unutar istog termina uzorkovanja pronašao sam statistički značajne razlike jedino unutar trećeg termina uzorkovanja (16 mjeseci nakon inokulacije) gdje je relativna

koncentracija GLRaV-3 bila značajno veća kod biljaka zaraženih inokulumom II u odnosu na biljke zaražene inokulumom X (Slika 23.).

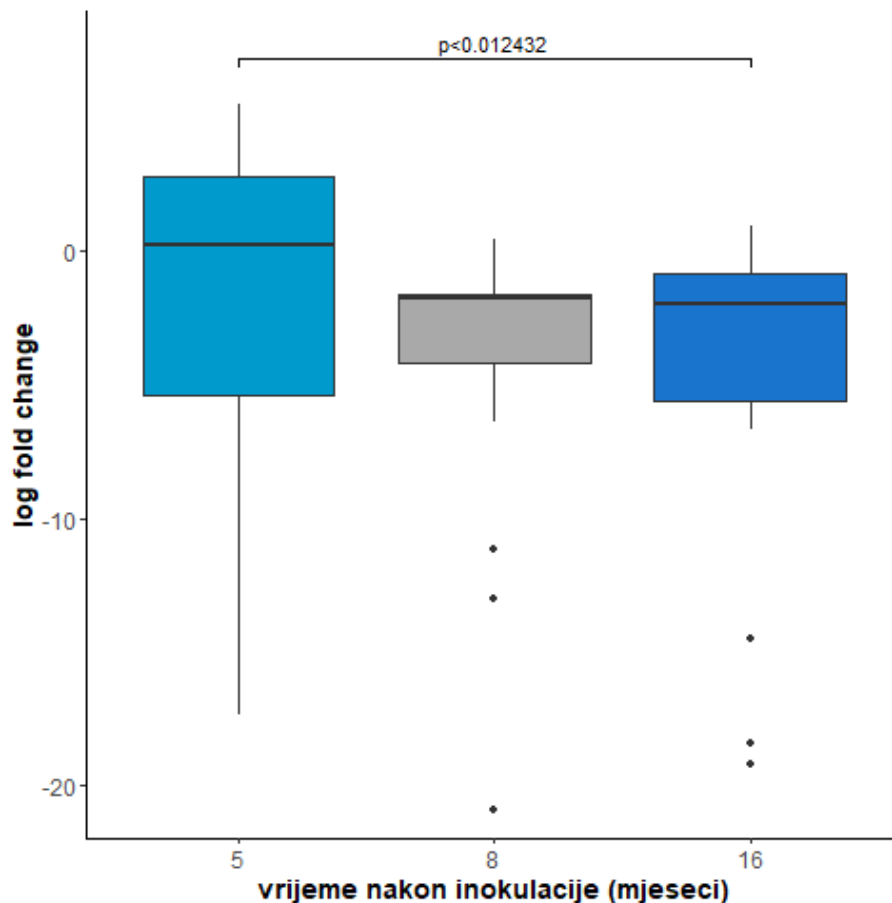


Slika 23. Usporedba replikacije GLRaV-3 izračunata pomoću  $\Delta C_t$  vrijednosti (*log fold change*) dobivenih analizom ORF1a genomske regije GLRaV-3 promatrana 16 mjeseci nakon inokulacije između biljaka koje zaraženih istim inokulumom (II, Q, X, Y, Z). Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Dunettovim post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Točke na grafu predstavljaju individualna mjerenja koja 1,5 puta premašuju gornji ili donji kvartil podataka. Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.

Uspoređujući relativnu koncentraciju GLRaV-3 po različitim sortama koristeći  $\Delta\Delta C_t$  vrijednosti nisam pronašao statistički značajne razlike između pojedinih sorti vinove loze u sva tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije).

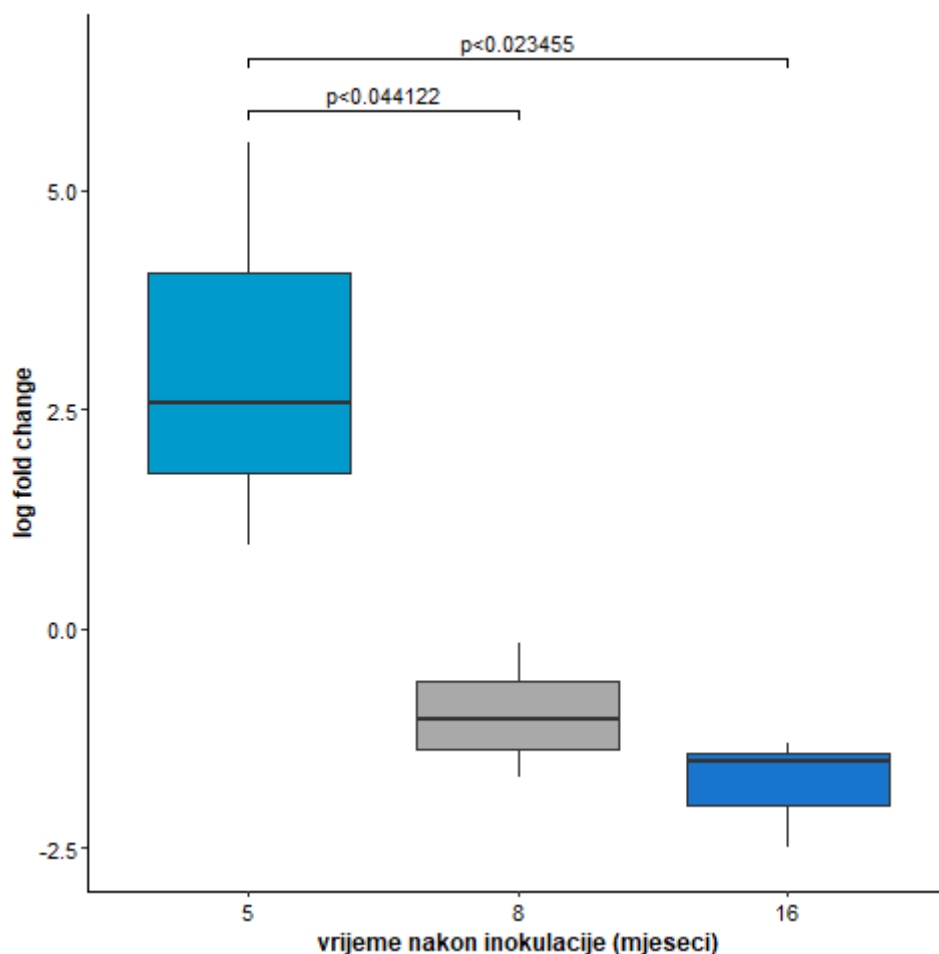
#### 4.3.2.4. Relativna kvantifikacija GVA

U usporedbi relativne koncentracije GVA, promatranu za sve uzorke zajedno dobio sam statistički značajne razlike između prvog i trećeg termina uzorkovanja gdje je relativna koncentracija u prvom terminu uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije) bila značajno veća u odnosu na treći (16 mjeseci nakon inokulacije; Slika 24.).



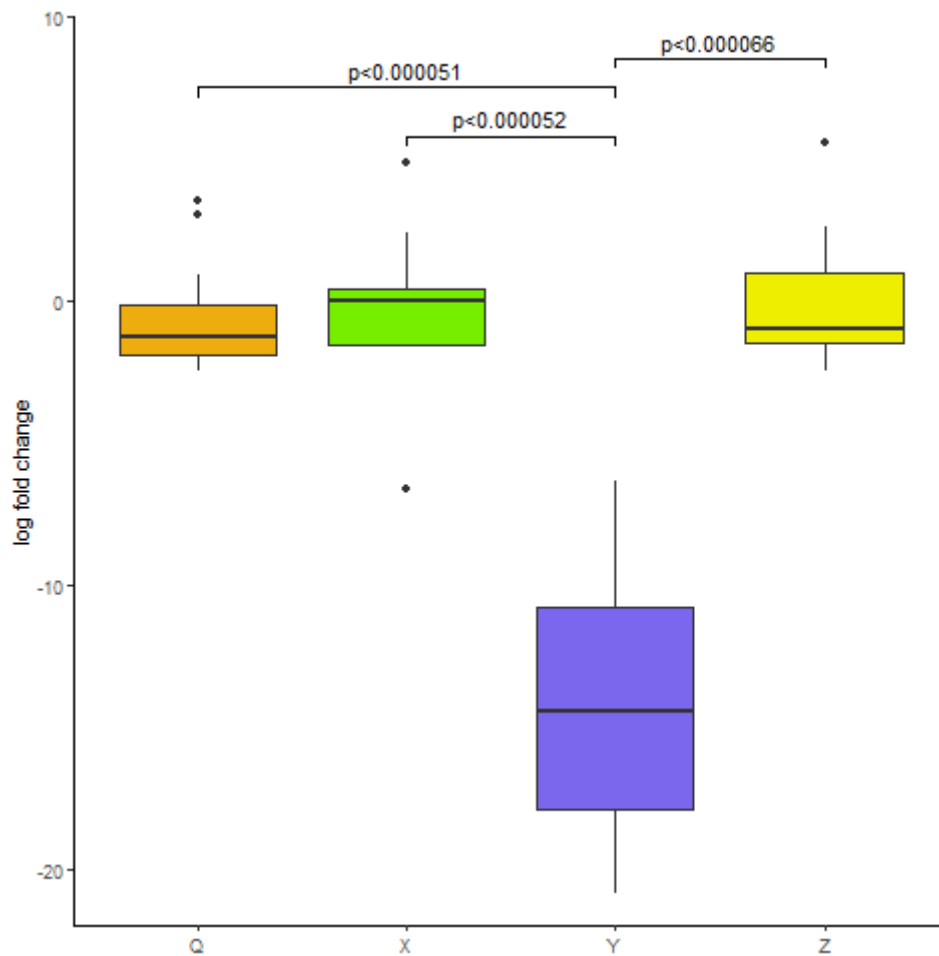
Slika 24. Usporedba replikacije GVA izračunata pomoću  $\Delta C_t$  vrijednosti (*log fold change*) dobivena analizom CP genomske regije GVA promatrana po različitim terminima uzorkovanja za sve uzorke u različitim točkama uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije). Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Točke na grafu predstavljaju individualna mjerenja koja 1,5 puta premašuju gornji ili donji kvartil podataka. Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.

Primijenivši istu statističku metodu za svaki inokulum zasebno dobio sam još izraženiji trend opadanja relativne koncentracije GVA nego kod svih biljaka zajedno kod biljaka zaraženih inokulumom Z gdje prvi termin (5 mjeseci nakon inokulacije) ima značajno veću relativnu koncentracije u odnosu na drugi i treći (osam i 16 mjeseci nakon inokulacije; Slika 25.). Usporedbom biljaka zaraženih inokulumima X, Y i Q po različitim terminima uzorkovanja nisam izračunao statistički značajne razlike.



Slika 25. Usporedba relativne koncentracije GVA izračunata pomoću  $\Delta Ct$  vrijednosti (*log fold change*) dobivena analizom CP genomske regije GVA promatrana po različitim terminima uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) za biljke zaražene inokulumom Z. Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Točke na grafu predstavljaju individualna mjerenja koja 1,5 puta premašuju gornji ili donji kvartil podataka. Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.

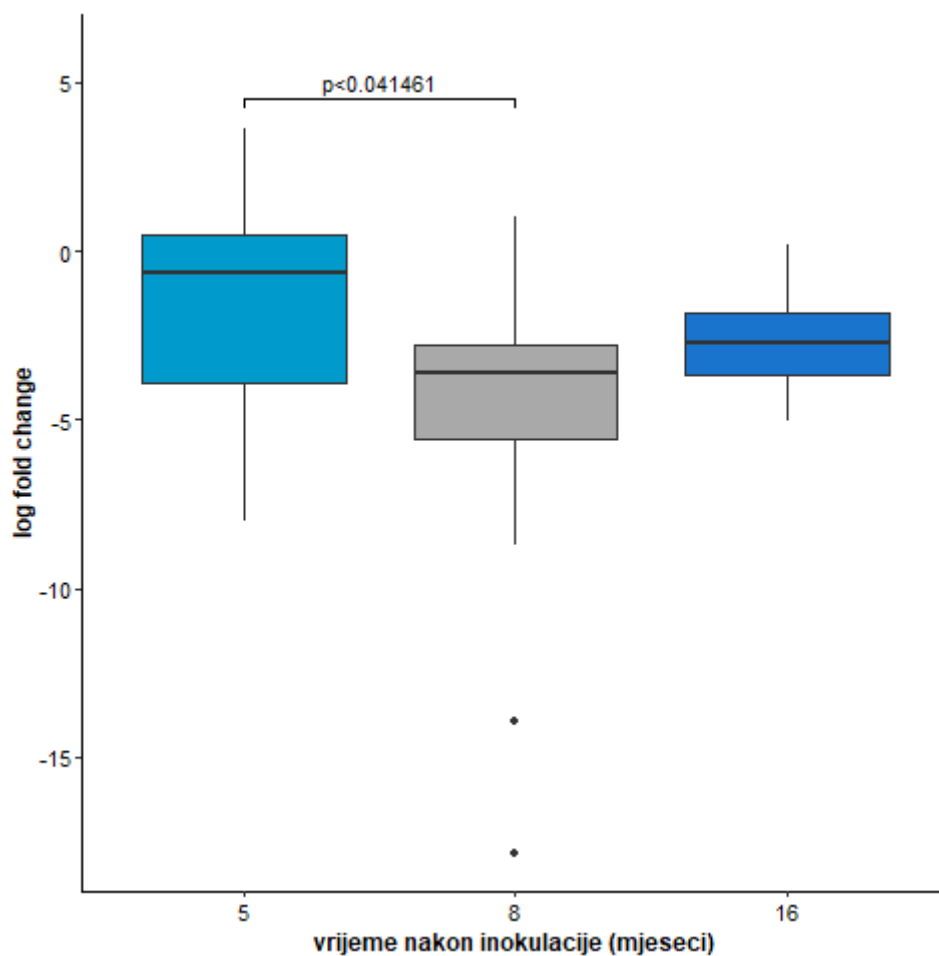
Uspoređujući relativnu koncentraciju GVA između biljaka zaraženih različitim inokulumima dobio sam značajne razlike, biljke zaražene inokulumom Y su imale značajno nižu relativnu koncentraciju GVA u odnosu na sve druge biljke zaražene različitim inokulumima. Taj trend je bio prisutan u sva tri termina uzorkovanja, a na Slici 26. su prikazani rezultati iz prvog termina.



Slika 26. Usporedba relativne koncentracije GVA izračunata pomoću  $\Delta Ct$  vrijednosti (*log fold change*) dobivena analizom CP genomske regije GVA promatrana između biljaka zaraženih različitim inokulumima koji sadrže GVA u prvom terminu uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije). Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Točke na grafu predstavljaju individualna mjerenja koja 1,5 puta premašuju gornji ili donji kvartil podataka. Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.

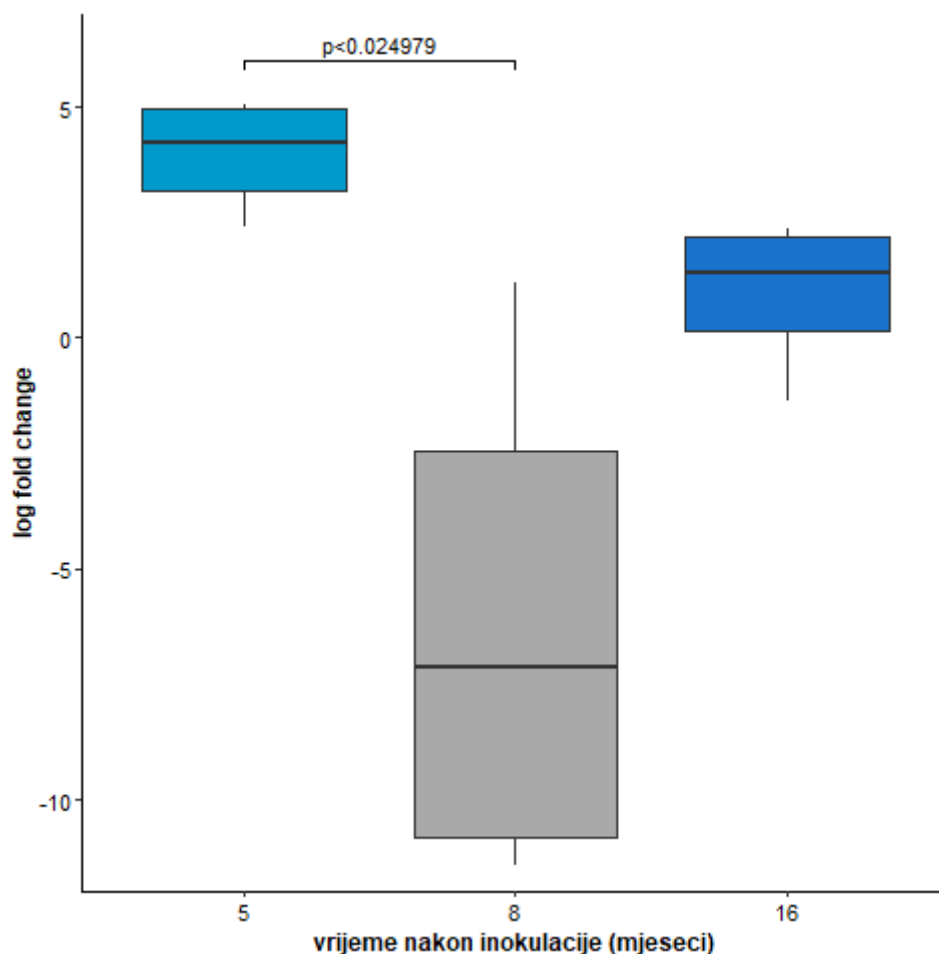
#### 4.3.2.5. Relativna kvantifikacija GPGV, GFkV, GRSPaV, GLRaV-1 i GLRaV-2

Relativnom kvantifikacijom GPGV dobio sam statistički značajne razlike između prvog i drugog termina uzorkovanja (pet i osam mjeseci nakon inokulacije) promatrano za sve biljke zajedno (Slika 27.).



Slika 27. Usporedba relativne koncentracije GPGV izračunata pomoću  $\Delta C_t$  vrijednosti (*log fold change*) dobivena analizom CP genomske regije GPGV promatrana po različitim terminima uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) za sve uzorke. Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Točke na grafu predstavljaju individualna mjerenja koja 1,5 puta premašuju gornji ili donji kvartil podataka. Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.

Kod GfKv, statističkom obradom rezultata istovjetnom procedurom kao kod GPGV dobio sam statistički značajne razlike između pojedinih termina uzorkovanja (Slika 28.).



Slika 28. Usporedba relativne koncentracije GFKV izračunata pomoću  $\Delta C_t$  vrijednosti (*log fold change*) dobivena analizom CP genomske regije GFKV promatrana po različitim terminima uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) za sve uzorke. Naznačeni su rezultati višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom ( $p < 0,05$ ). Sastav inokuluma naveden je u Tablici 6.

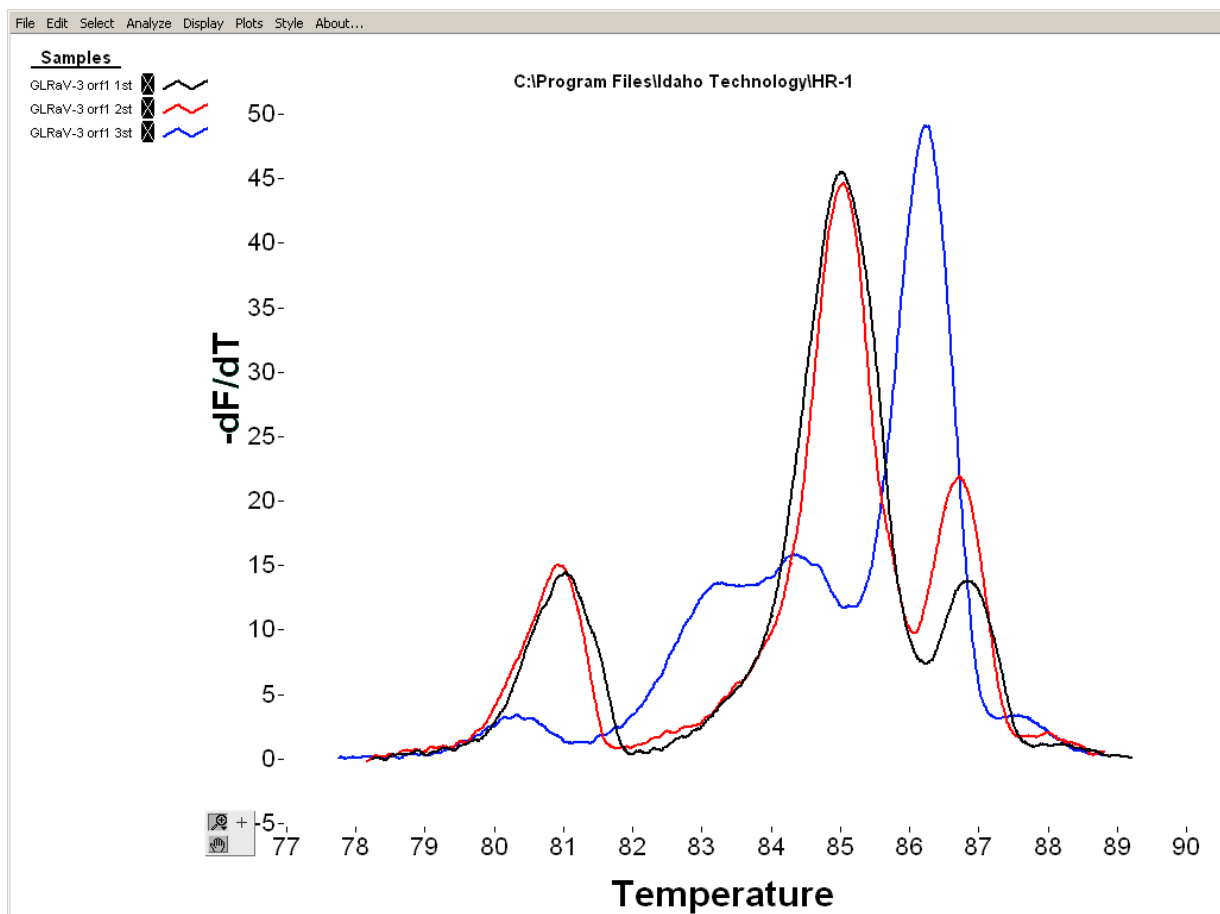
Oba virusa (GPGV i GFKV) su imali istovjetan obrazac promjene relativne koncentracije po terminima uzorkovanja gdje je jedina statistički značajna razlika bila između prvog i drugog termina (pet i osam mjeseci nakon inokulacije), gdje je prvi termin imao značajno višu relativnu koncentraciju u odnosu na drugi.

Kod virusa GPGV, promatrano za biljke zaražene pojedinim inokulumima zasebno (X, Y i Q) u različitim terminima uzorkovanja nisam pronašao statistički značajne razlike. Statistički značajne razlike nisam pronašao ni uspoređujući biljke zaražene pojedinim inokulumom međusobno unutar istog termina uzorkovanja.

Kod GLRaV-1, GLRaV-2 i GRSPaV, usporedbom različitih termina uzorkovanja, i u slučaju GRSPaV različitih biljaka zaraženih različitim inokulumima, nisam pronašao značajne razlike.

#### 4.3.2.5. Analiza krivulje disocijacije PCR produkata

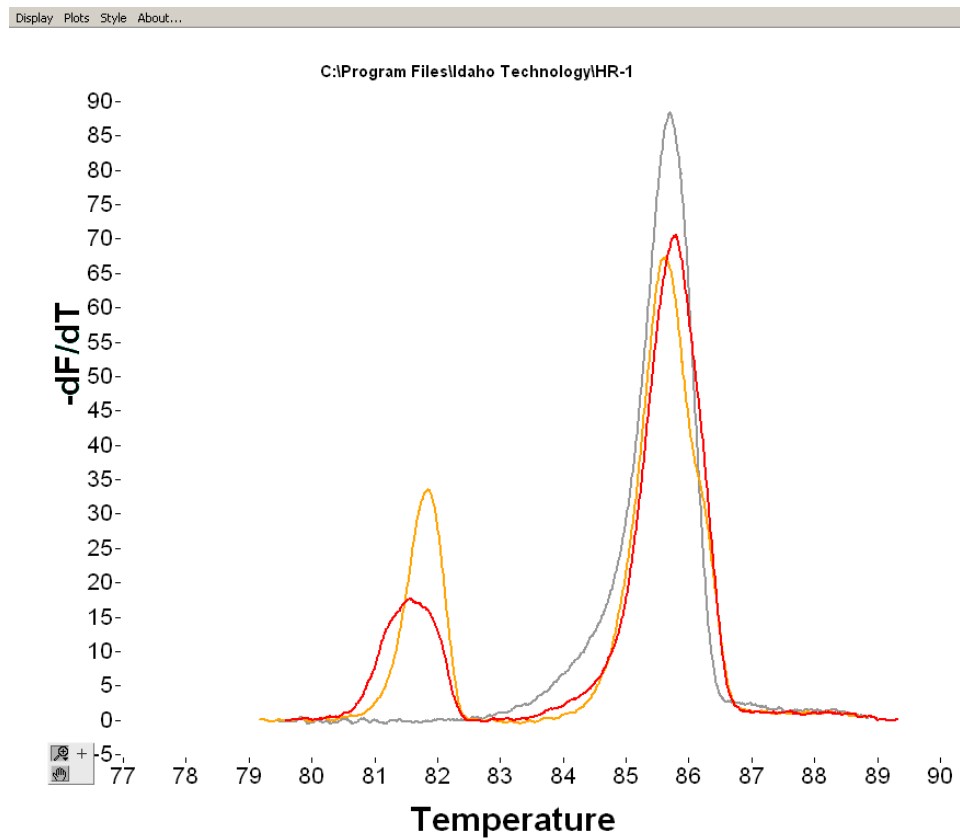
U svrhu pokušaja razlikovanja i kvantifikacije različitih genomskih varijanti (I, II i III) GLRaV-3 umnoženi su dijelovi genomskih regija HSP70h i ORF1a iz njihovih cDNA kako sam opisao u poglavlju 3.5.5.4. U ovu svrhu korištene su početnice HRM4 i HRM6 (Bester *i sur.*, 2012). Nakon dodavanja boje *LCGreen plus* koja se ugrađuje u dvolančane DNA lance i analize amplikona na uređaju *High-Resolution Melter* rezultati nisu pokazali razlike u krivulji disocijacije između svih testiranih genomskih varijanti. Kao predložak reakcije korišteni su amplikoni dobiveni PCR reakcijom iz uzoraka cDNA loza zaraženih čistim genotipovima I, II i III GLRaV-3 koje nam je ljubazno ustupila dr. Rachel Bester iz Instituta u Stellenboschu u Južnoafričkoj Republici. Uspoređeni su amplikoni dobiveni iz prethodno navedenih loza koji su sadržavali genomske varijante I, II i III, a rezultati su prezentirani na Slici 29. za produkte reakcije u kojoj su korištene HRM4 početnice.



Slika 29. Analiza krivulje disocijacije PCR produkata iz cDNA dobivenih reakcijom s HRM4 početnicama genomske regije HSP70h virusa GLRaV-3 koji pripadaju različitim genotipovima: varijanta I (crna boja krivulje), varijanta II (crvena boja krivulje) i varijanta III (plava boja krivulje).



Kao što je vidljivo iz Slike 29. ne postoji vidljiva razlika u disocijacijskim krivuljama između genomskih varijanti I i II te nadalje nisam primjenjivao ovu metodu u svrhu razlikovanja i kvantifikacije genomskim varijanti GLRaV-3 u zaraženim biljkama vinove loze. Kod početnica HRM6 (Slika 30.) razdvajanje amplikona nije postignuto ni kod genotipa III u odnosu na I i II.



Slika 30. Analiza krivulje disocijacije PCR produkata iz cDNA dobivenih reakcijom s HRM6 početnicama genomske regije ORF1a virusa GLRaV-3 koji pripadaju različitim genotipovima: varijanta I (narančasta boja krivulje), varijanta II (crvena boja krivulje) i varijanta III (siva boja krivulje).

Iako su korištene početnice i reakcijski uvjeti preuzeti iz Bester *i sur.* (2012), gdje je razdvajanje pojedinih genomskih varijanti uspješno provedeno, nisam uspio reproducirati dobivene rezultate. Uzastopnim analizama amplikona dobivenih iz različitih PCR reakcija istog izolata krivulje su se razlikovale što je vjerojatno posljedica velikog broja mutacija unutar virusnih populacija koje onda polimeraza nasumično umnožava. Također, renaturacijom dvolančanih DNA lanaca nakon dodavanja boje *LCgreen plus* potencijalno dolazi do različitog sparivanja lanaca kao posljedica mutacija. U slučaju uspješnog razlikovanja genotipova na HRM uređaju, daljnji korak bi bio kvantifikacija pojedinih varijanti putem ove analize uz primjenu standarda kojeg bih kreirao iz plazmidne DNA koja bi sadržavala ciljani amplikon pojedine genomске varijante.

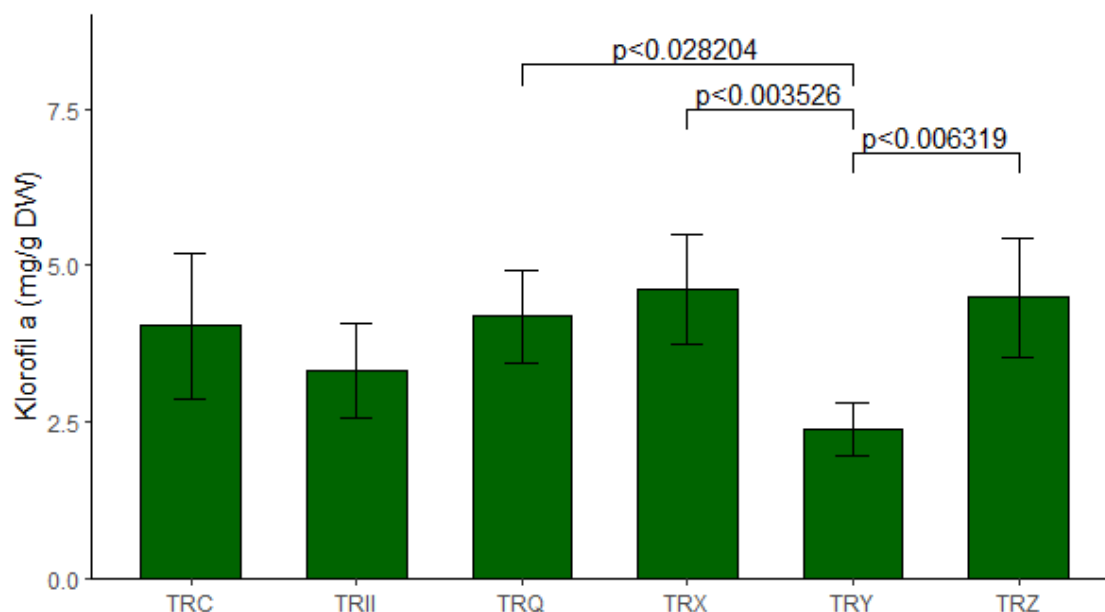
### **4.3.3. Rezultati analiza fizioloških i morfoloških parametara u različitim sortama vinove loze**

Uz pretpostavku da različiti inokulumi koji sadrže GLRaV-3 samostalno ili u miješanim zarazama s drugim virusima imaju različite biološke značajke, promjene u odabranim fiziološkim i morfološkim parametrima su mjerene i praćene na setu tri standardne indikatorske sorte i dodatno, na autohtonoj sorti 'Tribidrag'. Od fizioloških parametara mjenen je sadržaj fotosintetskih pigmenata, prolina, relativan sadržaj vode i permeabilnost membrane, dok je od morfoloških mjerena duljina internodija kao i pojava i intezitet simptoma.

#### **4.3.3.1. Sadržaj fotosintetskih pigmenata**

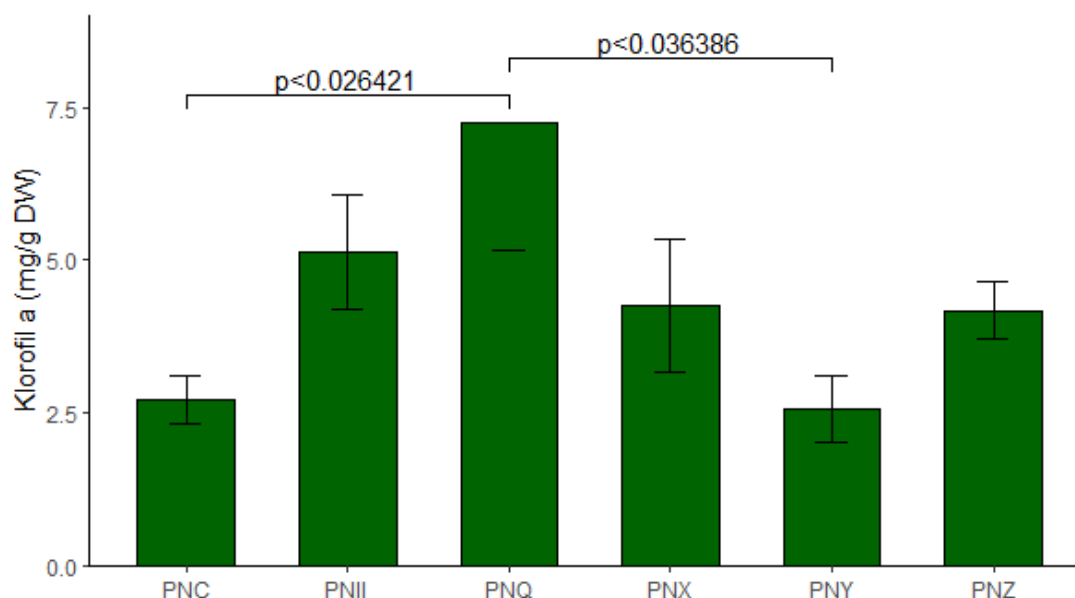
##### Sadržaj klorofila *a*

Rezultat testa normalnosti distribucije Shapiro-Wilks metodom za sve sorte promatrano skupno pokazala je značajno odstupanje od normalne distribucije ( $p < 0,05$ ) čime sam isključio usporedbe između sorti parametrijskim testovima. Normalnost distribucije sam utvrdio kod svake sorte promatrano zasebno istom metodom ( $p > 0,05$  za svaku promatranu sortu) i potom sam primijenio parametrijske testove za biljke zaražene različitim inokulumima unutar iste sorte zajedno s kontrolnim biljkama. Kod sorte 'Tribidrag', statistički značajne razlike sam pronašao kod biljaka TRY koje su u odnosu na biljke TRQ, TRX i TRZ imale značajno niži sadržaj klorofila *a* (Slika 31.).



Slika 31. Sadržaj klorofila *a* kod pojedinih biljaka sorte 'Tribidrag', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

Kod sorte 'Pinot Noir' biljke PNQ su imale značajno viši sadržaj klorofila *a* u odnosu na kontrolne biljke i PNY (Slika 32.). Za različite biljke sorti 'Merlot' i 'Cabernet Franc' nisam pronašao značajne razlike, a njihove rezultate sam prikazao u Prilogu 6.

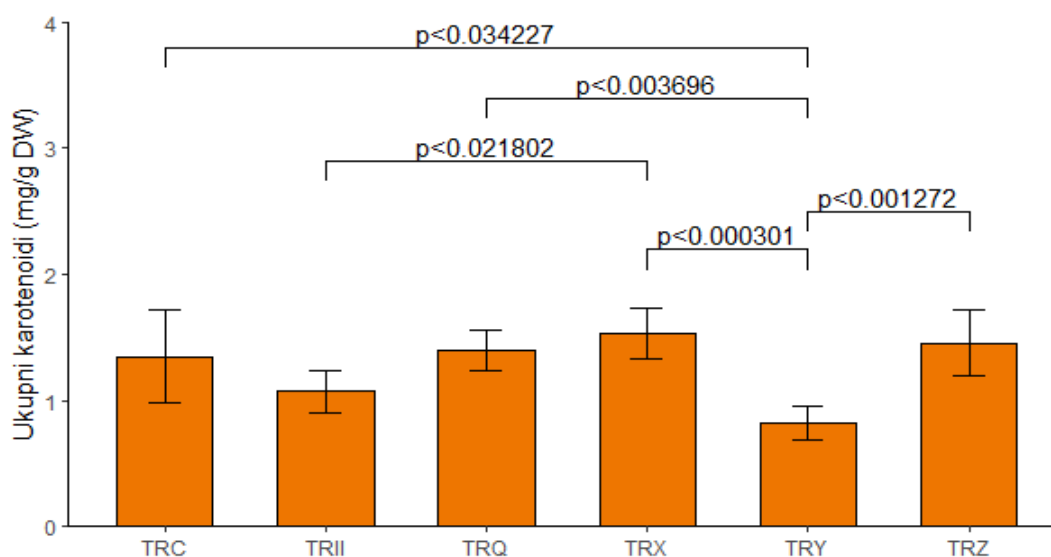


Slika 32. Sadržaj klorofila *a* kod pojedinih biljaka sorte 'Pinot Noir', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

Statističkom obradom rezultata dobivenih za sadržaj klorofila *b* nisam dobio statistički značajne razlike ni u jednom slučaju.

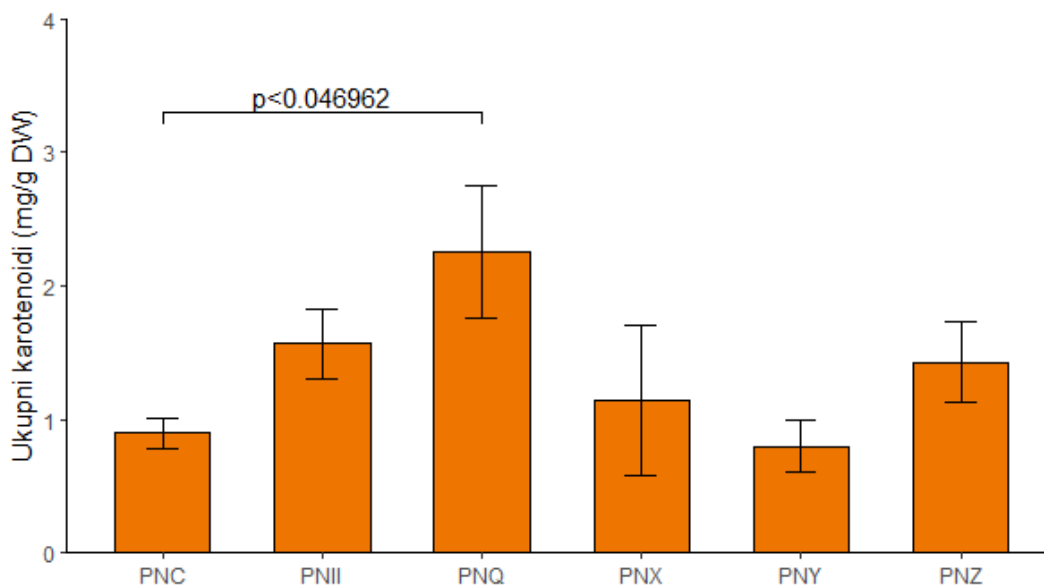
### Sadržaj ukupnih karotenoida

Kod rezultata sadržaja ukupnih karotenoida, kao i kod klorofila *a*, normalnost distribucije je bila narušena promatrajući sve sorte kao jedan uzorak ( $p < 0,05$ ), dok sam normalnu distribuiranost podataka utvrdio promatrajući svaku sortu zasebno ( $p > 0,05$ ). Primjenom parametrijskih testova utvrdio sam da su kod sorte 'Tribidrag' kontrolne biljke imale značajno viši sadržaj ukupnih karotenoida u odnosu na biljke TRY (Slika 33.). Biljke TRY su također imale značajno niži sadržaj ukupnih karotenoida u odnosu na TRZ, TRX i TRQ. Također, biljke TRII su imale statistički niži sadržaj u odnosu na TRX.



Slika 33. Sadržaj ukupnih karotenoida kod pojedinih biljaka sorte 'Tribidrag', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

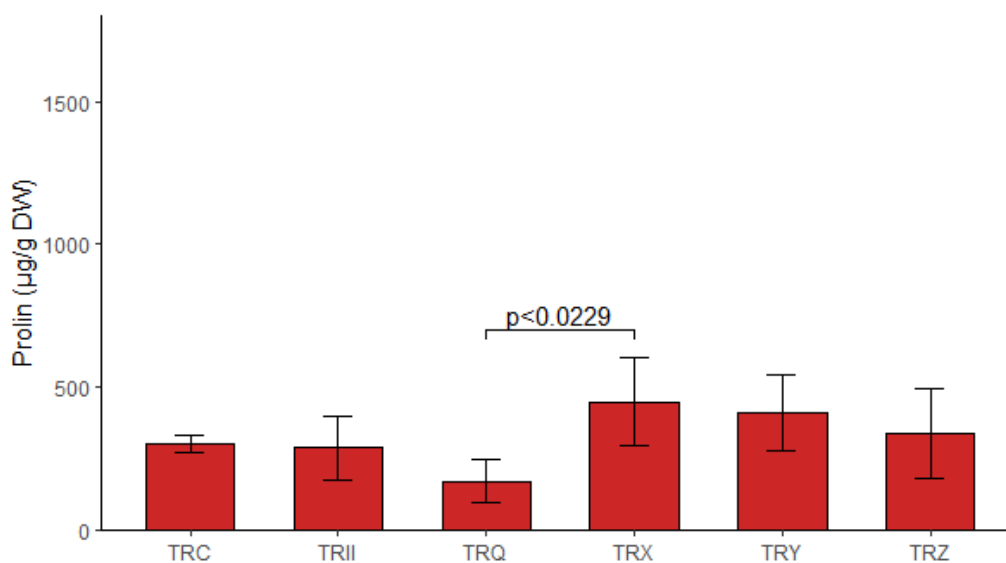
Kod sorte 'Pinot Noir' statistički značajnu razliku sam utvrdio kod kontrolnih biljaka (PNC) i PNQ gdje su kontrolne biljke imale značajno niži sadržaj ukupnih karotenoida (Slika 34.). Kod sorata 'Merlot' i 'Cabernet Franc' nisu utvrđene značajne razlike, a rezultate sam prikazao u Prilogu 6.



Slika 34. Sadržaj ukupnih karotenoida kod pojedinih biljaka sorte 'Pinot Noir', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

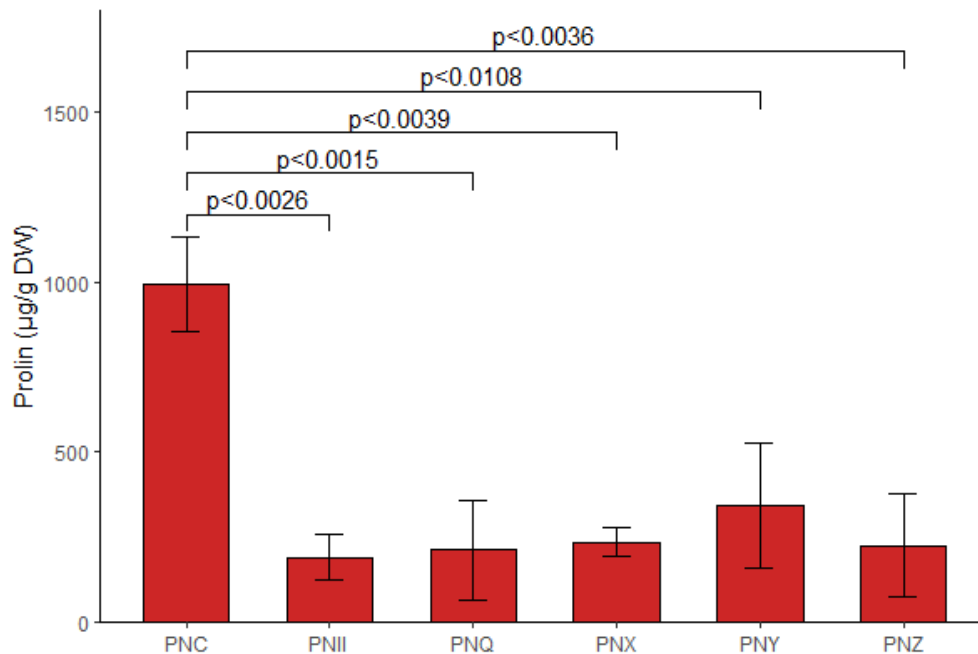
#### 4.3.3.2. Sadržaj prolina

Normalnost distribucije podataka kao nužnog preduvjeta za primjenu parametrijskih testova sam utvrdio Shapiro-Wilks testom kod rezultata sadržaja prolina za svaku sortu zasebno ( $p > 0,05$ ). Statističkom analizom sam kod sorte 'Tribidrag' utvrdio statistički značajno niži sadržaj prolina kod biljaka TRQ u odnosu na TRX (Slika 35.).



Slika 35. Sadržaj prolina kod pojedinih biljaka sorte 'Tribidrag', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

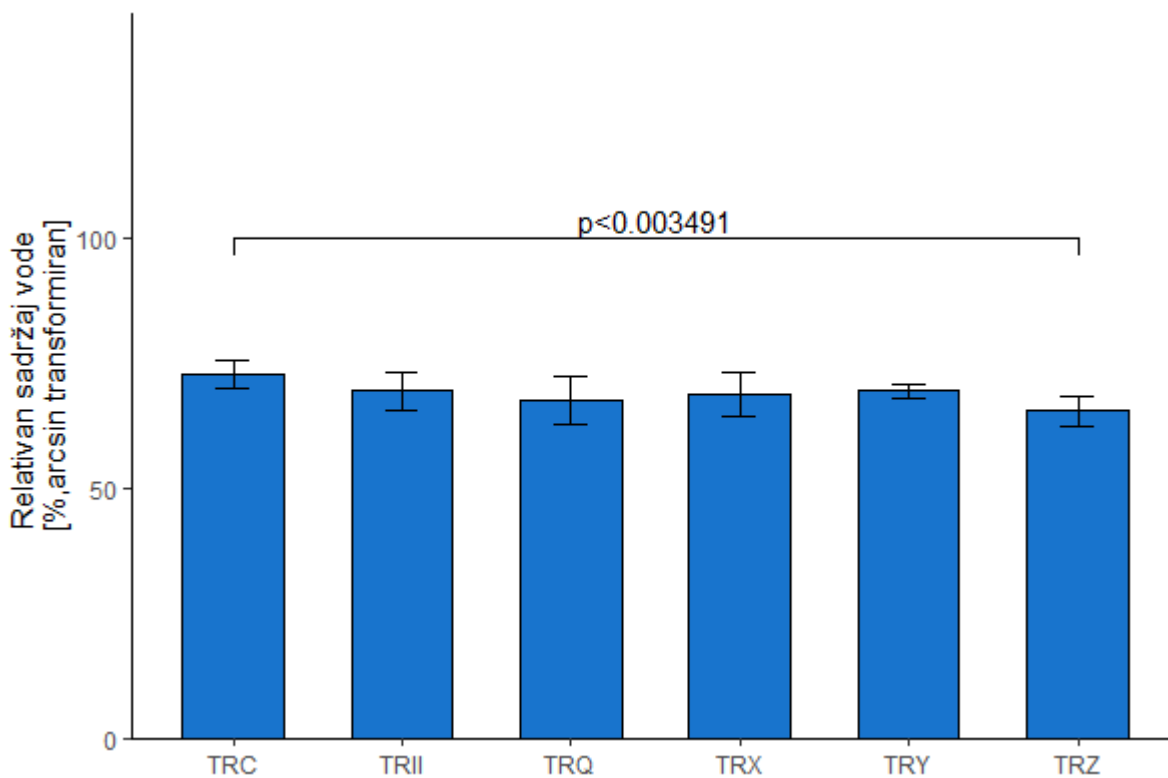
Kod sorte 'Pinot Noir' nakon mjerenja i statističke obrade rezultata utvrdio sam da su sve biljke zaražene virusom imali značajno niži sadržaj prolina u odnosu na kontrolne biljke (PNC, Slika 36.). Kod sorata 'Merlot' i 'Cabernet Franc' nisam utvrdio statistički značajne razlike i njihovi grafovi su prikazani u Prilogu 6.



Slika 36. Sadržaj prolina kod pojedinih biljaka sorte 'Pinot Noir', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

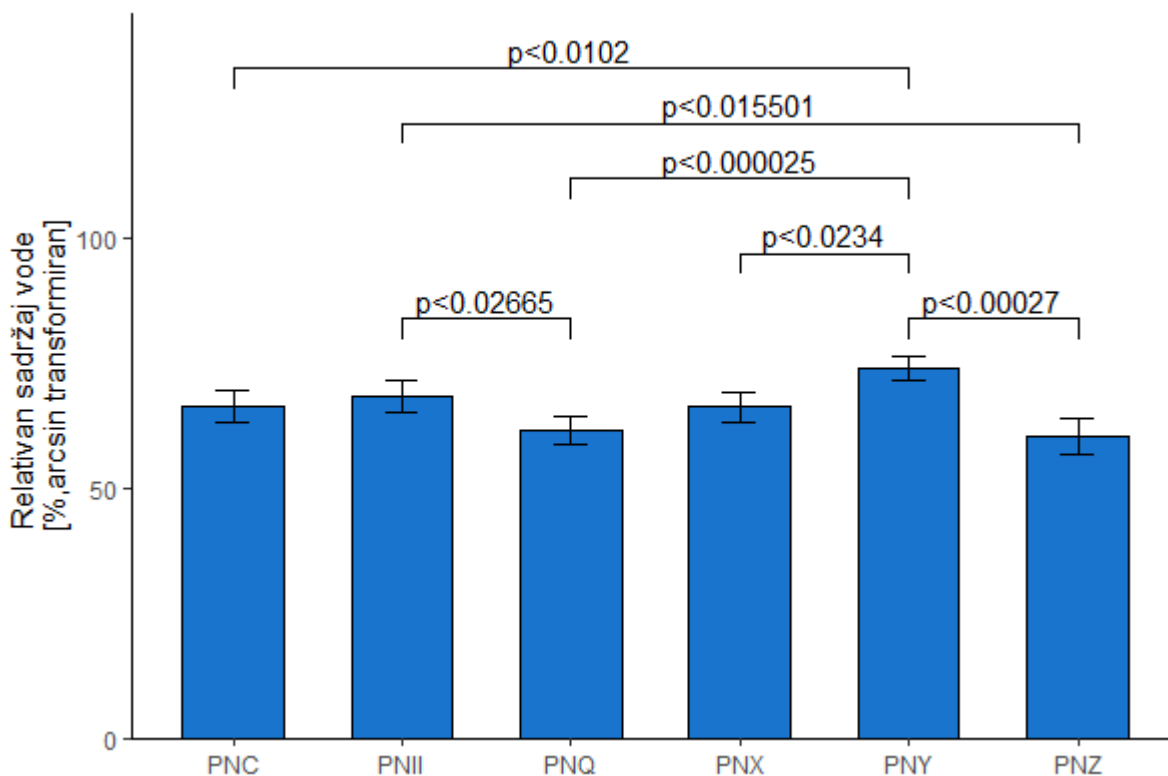
#### 4.3.3.3. Relativan sadržaj vode

Mjerenjem relativnog sadržaja vode iz uzoraka listova sorti vinove loze u kontroliranom pokusu i testiranjem normalnosti distribucije podataka utvrdio sam da su podaci normalno distribuirano promatrano za svaku sortu zasebno ( $p > 0,05$ ). Kod sorte 'Tribidrag' primjenom parametrijskih testova sam utvrdio da biljke TRZ u odnosu na kontrolne biljke imaju značajno niži relativan sadržaj vode (Slika 37.).



Slika 37. Relativan sadržaj vode kod pojedinih biljaka sorte 'Tribidrag', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

Kod sorte 'Pinot Noir' zabilježen je veći broj statistički značajnih razlika. Kontrolne biljke imaju statistički niži relativan sadržaj vode u odnosu na PNY, kao i biljaka PNQ, PNX i PNZ. Nadalje biljke PNII imaju statistički značajno viši relativan sadržaj vode u odnosu na biljke PNQ i PNZ (Slika 38.). Za sorte 'Merlot' i 'Cabernet Franc' nije bilo statistički značajnih razlika, a njihove grafove sam prikazao u Prilogu 6.

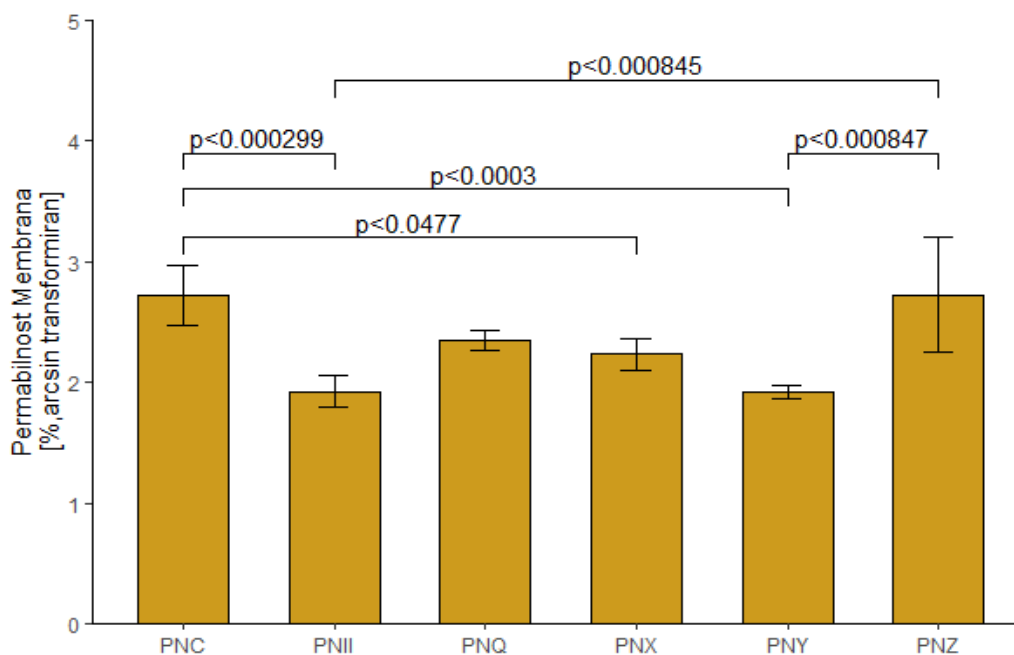


Slika 38. Relativan sadržaj vode kod pojedinih biljaka sorte 'Pinot Noir', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

#### 4.3.3.4. Permeabilnost membrane

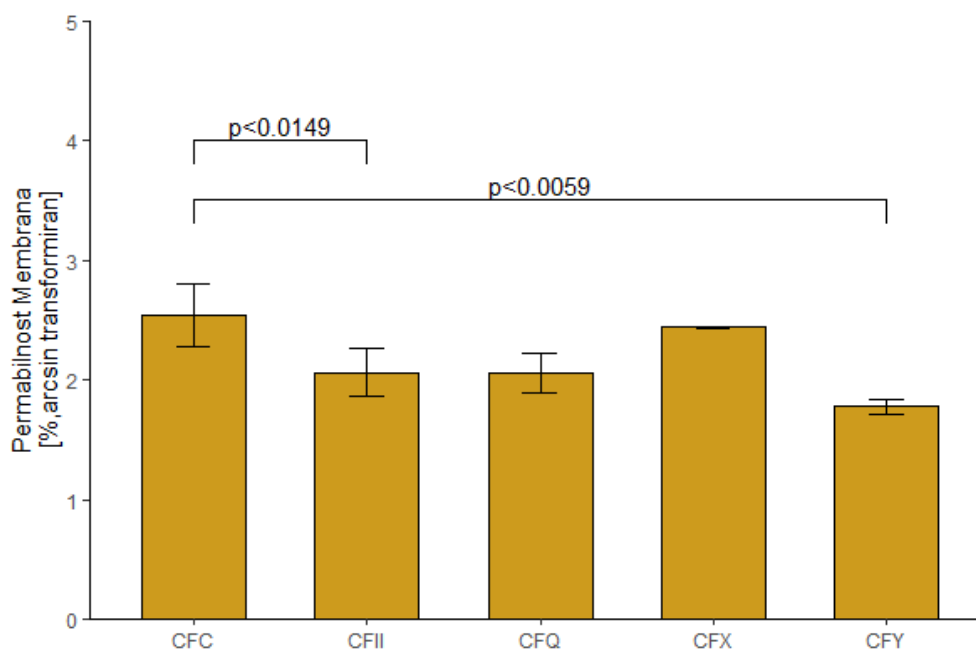
Odredivši normalnost distribucije za svaku pojedinu sortu promatranu zasebno ( $p > 0,05$ ) i statističkom obradom rezultata dobio sam značajne razlike. Kod sorte 'Pinot Noir', kontrolne biljke (PNC) su imale statistički značajno višu permeabilnost membrane u odnosu na biljke PNII, PNX i PNY. Također su biljke PNZ je imale statistički značajno višu permeabilnost membrane u odnosu na PNII i PNY (Slika 39.).





Slika 39. Permeabilnost membrane kod pojedinih biljaka sorte 'Pinot Noir', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

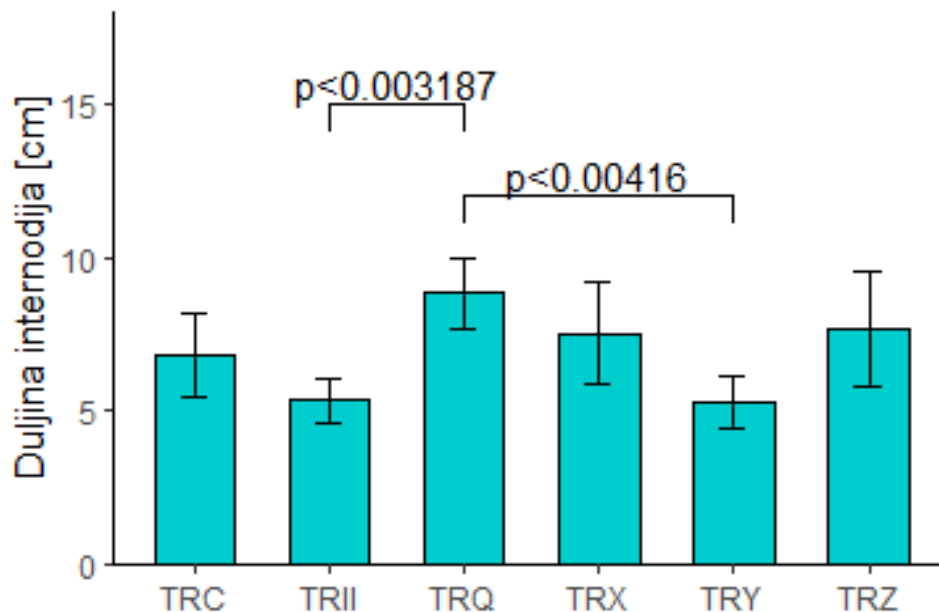
Kod sorte 'Cabernet Franc', kontrolne biljke su imale statistički značajno višu permeabilnost membrane u odnosu na CFII i CFY biljke (Slika 40.). Kod sorti 'Tribidrag' i 'Cabernet Franc' nisam pronašao statistički značajne razlike te su njihovi rezultati prikazani u Prilogu 6.



Slika 40. Permeabilnost membrane kod pojedinih biljaka sorte 'Cabernet Franc', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

#### 4.3.3.5. Duljine internodija kod sorti u kontroliranom pokusu

Mjerenjem duljine internodija i statističkom obradom rezultata dobio sam statistički značajne razlike samo kod biljaka zaraženih različitim inokulumima sorte 'Tribidrag'. Normalnost distribucije podataka je bila zadovoljena promatrajući svaku sortu zasebno uz  $p > 0,05$ . Biljke TRQ su imale značajno veću duljinu internodija u odnosu na biljke TRII i TRY (Slika 41.). Kod sorata 'Pinot Noir', 'Cabernet Franc' i 'Merlot' nisam zabilježio značajne razlike te sam rezultate za iste prikazao u Prilogu 6.



Slika 41. Duljina internodija kod pojedinih biljaka sorte 'Tribidrag', zajedno s rezultatima višestruke usporedbe Bonferroni post hoc testom gdje su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) označene između pojedinih biljaka.

#### 4.3.3.6. Evaluacija simptoma kod sorti u kontroliranom pokusu

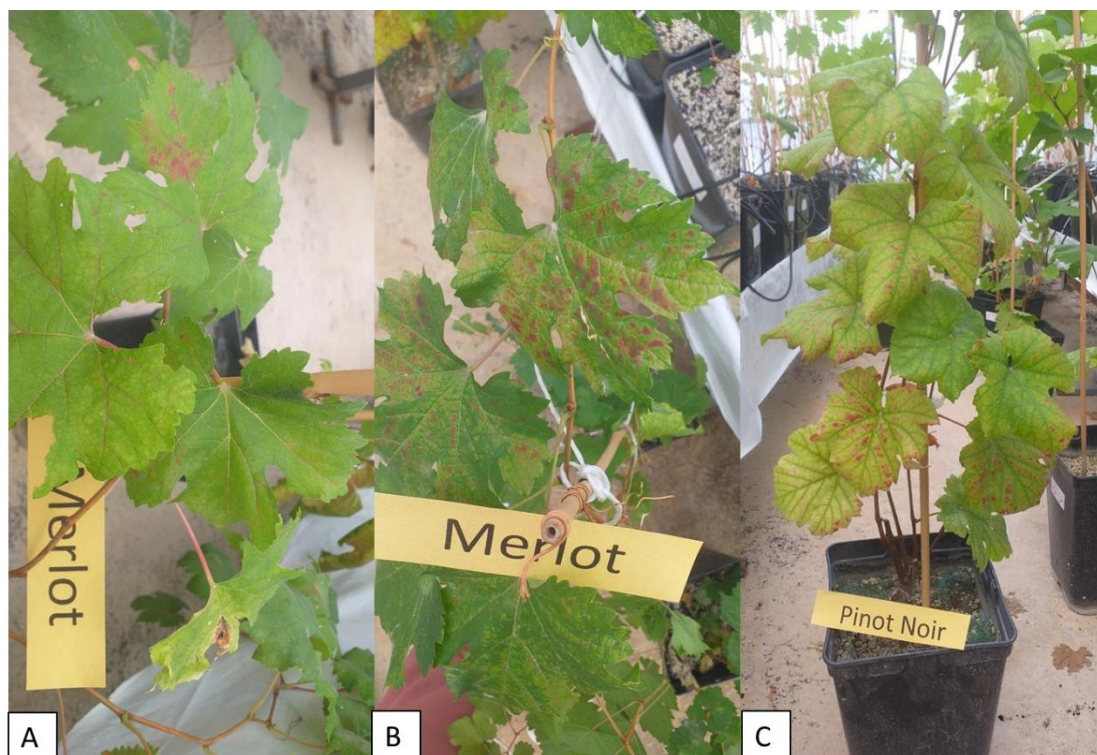
Evaluaciju simptoma kod sorti u kontroliranom pokusu sam napravio kako sam opisao u poglavlju 3.6.1. u dvije uzastopne godine, nakon cijepljenja „na zeleno“ i narednu vegetaciju. Rezultate sam prezentirao u Tablici 19. za vegetacijsku sezonu 2021. godine s obzirom da 2020. nisam zabilježio simptome na sortama u kontroliranom pokusu.

Tablica 19. Simptomi viroze uvijenosti lista zabilježeni kod različitih sorti inokuliranih različitim kombinacijama virusa.

Oznaka inokuluma	Sastav virusnog inokuluma	Sorta	Simptomi viroze uvijenosti lista
II	GLRaV-3	TR*	AS*, AS, AS, AS, AS
		M	MO
		PN	MO, AS
		CF	MI, MI, MI
X	GLRaV-3, GVA, GPGV, GRSPaV	TR	AS, AS, AS, AS, AS
		M	MI, S
		PN	AS, AS
		CF	AS
Y	GLRaV-3, GVA, GPGV, GRSPaV, GLRaV-1	TR	S, AS, S, MO, MO
		M	S, AS
		PN	AS, S
		CF	MI
Q	GLRaV-3, GVA, GPGV, GRSPaV, GLRaV-2, GfKV	TR	AS, AS, AS, AS, AS
		M	MO, MI
		PN	S, S
		CF	AS
Z	GLRaV-3, GVA	TR	AS, AS, AS, AS, AS
		M	MI, AS
		PN	MO, MI

\*Značenje kratica za nazive virusa je kako slijedi: GLRaV-3- virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA- virus vinove loze A, GPGV- virus Pinota sivog, GRSPaV- virus naboranosti drva podloge Rupestris du Lot, GLRaV-1- virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2- virus uvijenosti lista vinove loze 2, GfKV- virus pjegavosti lista vinove loze. Značenje kratica za nazive sorti je kako slijedi: TR - 'Tribidrag', M - 'Merlot', PN - 'Pinot Noir'i i CF - 'Cabernet Franc'. Značenje kratica za opis simptoma viroze uvijenosti lista: AS - asimptomatične biljke; MI - biljke sa blagim međužilnim crvenilom i sporadičnim uvijanjem listova; MO - biljke s izraženim međužilnim crvenilom i uvijanjem na više od pola lisne mase; S - cijela lisna masa biljke zahvaćena međužilnim crvenilom i uvijanjem.

Najizraženije simptome sam primijetio kod biljaka inokuliranih Y inokulumom, gdje je prisutna koinfekcija dva virusa uzročnika GLD (GLRaV-3 i GLRaV-1) te je isti izazivao jake simptome čak i na sorti 'Tribidrag' koja je kod drugih inokuluma bila asimptomatična. Primjer evaluacije simptoma sam prikazao na Slici 42. Primjenom neparametrijski test za određivanje statističke razlike u intenzitetu simptoma potvrdio sam da Y izaziva značajno jače simptome u odnosu na sve ostale inokulume (Tablica 20.).



Slika 42. Primjer evaluacije simptoma opisanih kao (A) MI- blago međužilno crvenilo sa sporadičnim uvijanjem listova, (B) MO- biljke s izraženim međužilnim crvenilom i uvijanjem na pola lisne mase i (C) S- cijela lisna masa biljke zahvaćena međužilnim crvenilom i uvijanjem na različitim sortama vinove loze u stakleničkom pokusu (fotografije: Mate Čarija).

Tablica 20. Rezultati usporedbe intenziteta simptoma uzrokovanih pojedinim inokulumom na biljkama u kontroliranom stakleničkom pokusu s statistički značajnim razlikama određenim Kruskal Wallis testom ( $p < 0,05$ ) i višestrukom usporedbom Dunnovim post hoc testom.

Inokulum	X	Y	Q	Z
II	0.567	<b>0.03</b>	0.84	0.733
X	/	<b>0.006</b>	0.71	0.817
Y	<b>0.006</b>	/	<b>0.018</b>	<b>0.012</b>
Q	0.733	<b>0.018</b>	/	0.888

## 5. RASPRAVA

### Pojavnost ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze

U istraživanju provedenom u sklopu ove doktorske disertacije utvrdio sam vrlo visoku zaraženost vinove loze virusima testiravši molekularnim metodama 101 trs dalmatinskih autohtonih sorti na prisutnost deset ekonomski najznačajnijih virusa. Više od 2/3 testiranih trsova, bilo da se radi o setu uzoraka od 16 autohtonih sorti ili o klonskim kandidatima sorte 'Plavac Mali', su bila pozitivna na četiri ili više virusa (Slika 12. i 14.). U dosadašnjim istraživanjima pojavnosti ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj primjenom uglavnom ELISA testa kao metode detekcije (Karoglan Kontić *i sur.*, 2009; Vončina *i sur.*, 2011, 2019) je također određen visok stupanj zaraženosti autohtonih dalmatinskih sorti. Uvođenjem molekularnih metoda detekcije poboljšana je detekcija virusa vinove loze uslijed njihove veće osjetljivosti u odnosu na serološke metode (Osman *i sur.*, 2008). To sam potvrdio i u ovom istraživanju gdje nisam pronašao nijedan zdravi trs za razliku od dosadašnjih seroloških istraživanja prema kojima je oko 10 % uzoraka dalmatinskih sorti bilo bez virusa (Karoglan Kontić *i sur.*, 2009; Vončina *i sur.*, 2019).

Virus uvijenosti lista vinove loze 3 (GLRaV-3) sam detektirao kao najučestaliji virus u autohtonim dalmatinskim sortama gdje je u oba seta uzoraka potvrđena njegova najviša pojavnost u odnosu na druge testirane viruse (94 % kod 16 autohtonih sorti i 86 % kod klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali'; Slika 11. i 13.). Da je GLRaV-3 najprisutniji virus u autohtonim sortama mediteranskog dijela Hrvatske dosad je potvrđeno u istraživanjima provedenim u istarskim (Poljuha *i sur.*, 2010) i dalmatinskim vinogradima (Karoglan Kontić *i sur.*, 2009), kao i kolekcijskom nasadu sorti Hrvatskog primorja (Vončina *i sur.*, 2011). Rasprostranjivanju GLRaV-3 u mediteranskom dijelu Hrvatske zasigurno doprinosi dokazana prisutnost vektora iz porodice štitastih ušiju (Masten Milek, 2009), kao i upotreba zaraženog sadnog materijala autohtonih sorti u njihovom daljnjem rasprostranjivanju (Vončina *i sur.*, 2011). Za razliku od mediteranskog dijela, u kontinentalnim hrvatskim regijama GLRaV-3 ima značajno manju pojavnost (manju od 10 % testiranih trsova; Karoglan Kontić *i sur.*, 2009), a od uzročnika bolesti uvijenosti lista u tim je regijama zabilježena najveća pojavnost virusa uvijenosti lista vinove loze 1 (GLRaV-1; Karoglan Kontić *i sur.*, 2009). Stanje opisano u mediteranskom dijelu Hrvatske nalazimo i u drugim mediteranskim zemljama gdje je GLRaV-3 dominantno prisutan uzročnik

bolesti uvijenosti lista (Mahfoudhi *i sur.*, 1998; Digiario *i sur.*, 2000; Bertolini *i sur.*, 2010; Zindović *i sur.*, 2014) što autori pripisuju upotrebom zaraženog sadnog materijala u tradicionalnom načinu uzgoja vinove loze.

Od ostalih uzročnika bolesti uvijenosti lista testiranih u oba seta uzoraka obuhvaćena ovom doktorskom disertacijom, zabilježena je najveća pojavnost GLRaV-1 (iznad 35 % testiranih trsova u oba slučaja; Slika 11. i 13.), a zatim GLRaV-2 koji ima veću pojavnost kod klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' (23 % u odnosu na 8 % kod uzoraka 16 autohtonih sorti).

Pojavnost uzročnika bolesti infektivne degeneracije vinove loze se razlikovala između dva seta uzoraka. Kod autohtonih dalmatinskih sorti pojavnost virusa lepezastosti lista (GFLV) i virusa mozaika gušarke (ArMV) je bila među najnižima (10 % za GFLV i 1 % za ArMV; Slika 11.), rezultirajući najmanjom pojavnošću ArMV od svih testiranih virusa. S druge strane, kod klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' zabilježio sam 1,7 puta veću pojavnost GFLV (17 %) i 16 puta veću pojavnost ArMV (23 %; Slika 13.). Ovakav pronalazak kod klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' je nešto niži od ranije detektiranih (Karoglan Kontić *i sur.*, 2009). Zdunić *i sur.* (2007) su proveli preliminarno testiranje ELISA testom manjeg broja virusa prilikom formiranja kolekcijskog nasada klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' gdje su pronašli ArMV u značajno manjem postotku (6 %) nego što sam detektirao u svom istraživanju što može biti direktna posljedica vektorskog prijenosa unutar kolekcijskog nasada ali djelomično i primjene osjetljivije metode detekcije (RT-PCR) u ovom istraživanju.

Od ostalih testiranih virusa u oba provedena istraživanja ističe se visoka pojavnost uzročnika bolesti jamičavosti drva vinove loze, i to prvenstveno virusa vinove loze A (GVA) i virusa jamičavosti podloge *Rupestris du Lot* (GRSPaV). U uzorcima klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' GVA sam pronašao u 77 % (Slika 13.) testiranih trsova čime je ovaj virus drugi po pojavnosti u promatranom uzorku, dok je kod uzoraka 16 autohtonih sorti GVA bio treći po pojavnosti (80 %; Slika 11.). GRSPaV je u uzorcima 16 autohtonih dalmatinskih sorti bio drugi po pojavnosti (82 %; Slika 11.), a kod klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' treći (40 %; Slika 13.). Ovakav trend visoke pojavnosti uzročnika bolesti jamičavosti drva je prisutan i u sličnim istraživanjima u Hrvatskoj (Vončina *i sur.*, 2019), kao i u drugim mediteranskim zemljama (Afechtal *i sur.*, 2019). Unatoč njegovoj visokoj pojavnosti, istraživanja učinka GRSPaV na vinovu lozu nam govore da u samostalnoj zarazi ovaj virus nema značajnog negativnog učinka

na rast i prinos vinove loze, već potencijalno može biti koristan za biljku uslijed stresa soli i suše jer dolazi do poboljšanja ekspresije gena staničnog odgovora (Gambino *i sur.*, 2012).

Virus sivog pinota (GPGV) je prvi puta detektiran u Hrvatskoj 2016. iz uzoraka istarskih autohtonih sorti (Bertazzon *i sur.*, 2016), a na manjem uzorku autohtonih dalmatinskih sorti prvi put je potvrđen 2017. (Vončina *i sur.*, 2017). Ovaj virus pripada u novije opisane viruse koji mogu uzrokovati značajne štete u vinogradarskoj proizvodnji (Cieniewicz *i sur.*, 2020). Njegovu visoku pojavnost sam potvrdio u oba seta uzoraka gdje je u uzorcima 16 autohtonih sorti bila 62 % (Slika 11.), a kod klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' 37 % (Slika 13.). Pretpostavlja se da je ovaj virus uvezen u Europu sadnim materijalom iz Azije (Hily *i sur.*, 2020), a njegova visoka pojavnost u kolekcijskom nasadu Instituta za jadranske kulture je vjerojatno posljedica vektorskog prijenosa. Naime, vizualnim pregledom nasada sam potvrdio prisutnost grinje *Colomerus vitis* (Pagenstecher) koja je dokazani vektor ovog virusa (Malagnini *i sur.*, 2016). Zbog opasnosti koju ovaj virus predstavlja za vinogradarsku proizvodnju u nekim državama Europske Unije se čak razmatra proširenje certifikacijske sheme gdje bi i GPGV bio uvršten kao obavezan virus za testiranje (Pasquale Saldarelli - usmena komunikacija).

Od sorata koje se ističu najmanjim brojem detektiranih virusa, ističu se dva trsa sorte 'Plavac Mali' zaražena isključivo virusom GLRaV-3 (217/1 i 217/2; Prilog 1.), kao i sorte 'Prč' i 'Grk', koje imaju uski areal uzgoja vezan za pojedine srednjodalmatinske otoke (Hvar i Korčula). Ovakve izolirane lokacije gdje se vinogradarstvo u velikoj mjeri odvija tradicionalnim načinom karakterizira nizak unos novog sadnog materijala koji može predstavljati izvor zaraza poznatim virusima, kao i izvor novih virusa kojih do tada nije bilo na tim područjima. Sama izoliranost lokacije ne mora nužno biti preduvjet za prisutnost manjeg broja virusa čemu svjedoče razlike u broju detektiranih virusa u uzorcima klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' s otoka Visa koji je značajno odstupao (Prilog 2.). Uzevši u obzir da su uzorci introducirani u kolekcijski nasad iz različitih uzgojnih područja, nisam pronašao nijedno uzgojno područje kojemu barem jedan trs nije bio GLRaV-3 pozitivan. Unutar sorti nisam zabilježio značajne razlike osim u slučaju sorti 'Pošip Crni' i 'Plavina' gdje nisu svi testirani trsovi bili GLRaV-3 pozitivni (Prilog 1.) unatoč višestrukom testiranju, kao i u slučaju nekoliko klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' s različitih lokacija (004/3, 027/3, 056/1, 095/1 i 096/5; Prilog 2.). Od sorti s najvećim detektiranim brojem virusa ističu se 'Babica Crna' i 'Babić', koje su u kolekcijski nasad introducirane iz Kaštela i Primoštena, vinorodnih područja gdje se u značajnoj mjeri prakticira

tradicionalni uzgoj vinove loze koji između ostalog podrazumijeva proizvodnju i sadnju sanitarno neprovjerenog loznog materijala (Maletić *i sur.*, 2015a). Unatoč inicijalnim razlikama u broju virusa kod pojedinih sorti što govori o dobroj očuvanosti izvornog sanitarnog statusa s matičnih trsova, svi uzorci iz kolekcijskog nasada su mogli biti izloženi sekundarnim infekcijama vektorskim prijenosom.

Iako se zastupljenost virusa, kako globalno tako i u Hrvatskoj, kontinuirano istražuje i nadopunjuje, tek se mali broj istraživanja bavi utjecajem viroza na stanične procese domaćina. Učinak bolesti uvijenosti lista na fiziološke procese je istražen kod *in vitro* uzgojenih biljaka dalmatinske autohtone sorte 'Plavac Mali', a rezultati sugeriraju da su rast i razvoj uvelike ovisni o sastavu virusnog inokuluma (Hančević *i sur.*, 2015). Najnoviji rad o istraživanju bioloških markera virusne infekcije na više sorti vinove loze, a između ostalih i dalmatinske autohtone sorte 'Tribidrag', potvrđuju da je fiziološki odgovor biljke uvjetovan sastavom virusnog inokuluma, ali i sortnim svojstvom te duljinom trajanja infekcije (Hančević *i sur.*, 2023). Fiziološka posljedica zaraze vinove loze uzročnicima bolesti uvijenosti lista može biti i pojava nezrelih bobica u trenutku tehnološke zrelosti grozda. Ova pojava je učestala kod sorte 'Plavac Mali' i predstavlja jedno od njenih ampelografskih svojstava (Bulić, 1949; Maletić *i sur.*, 2015a) te bi svakako trebalo istražiti radi li se uistinu o sortnom svojstvu ili posljedici zaraze virusom.

Visoka pojavnost ekonomski štetnih virusa vinove loze, s posebnim naglaskom na GLRaV-3, dovodi u pitanje isplativost proizvodnje utemeljene na autohtonim sortama što može rezultirati napuštanjem njihovog uzgoja od strane proizvođača (Vončina *i sur.*, 2011). Ovakva situacija također onemogućava potpunu evaluaciju agronomskih svojstava autohtonih sorti koja bi doprinijela njihovim očuvanju kroz implementaciju u modernu vinogradarsku i vinarsku proizvodnju, kao i potencijalnom izvoru genetske raznolikosti za oplemenjivačke programe (Maletić *i sur.*, 2015b). U svrhu razvoja vinogradarske proizvodnje utemeljene na autohtonim sortama veću bi pozornost svakako trebalo posvetiti proizvodnji certificiranog sadnog materijala koji bi omogućio ostvarivanje punog agronomskog potencijala svake sorte.

#### Populacijska struktura GLRaV-3 u autohtonim dalmatinskim sortama

Uslijed najviše ustanovljene pojavnosti GLRaV-3 detaljno sam istražio njegovu populacijsku strukturu u uzorcima autohtonih dalmatinskih sorti i klonskih kandidata sorte



'Plavac Mali' na temelju nukleotidnog slijeda genomske regije HSP70h. Odabrana genomska regija je jedna od tri regije (uz CP i RdRP) koje se učestalo primjenjuju u istraživanjima genomske varijabilnosti GLRaV-3 (Turturo *i sur.*, 2005; Jooste *i sur.*, 2010; Lehad *i sur.*, 2015) uslijed konzerviranosti regije zbog važnosti njenog produkta translacije (homologa proteina toplinskog šoka) u kretanju virusa kroz biljku i formiranja „glave“ viriona (Burger *i sur.*, 2017). Prema predloženoj klasifikacijskoj shemi u kojoj postoji osam filogenijskih skupina (Diaz-Lara *i sur.*, 2018), sekvence analizirane u ovom istraživanju su se kod obje skupine uzoraka grupirale u skupine I i II (Slika 19. i 20). Kod uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti 55 % trsova je bilo zaraženo varijantama skupine II, 27 % varijantama skupine I i 18 % trsova je bilo zaraženo varijantama filogenijskih skupina I i II. U uzorcima klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' 67 % trsova je bilo zaraženo varijantama iz skupine II, 11 % varijantama iz skupine I, a varijantama obiju filogenijskih skupina (I i II) 22 %. Vončina *i sur.* (2017) su na temelju različitosti nukleotidnog slijeda CP genomske regije GLRaV-3 također otkrili da u autohtonim dalmatinskim sortama dominira varijanta II uz čestu koinfekciju varijantama iz skupine I. Sličnu situaciju nalazimo i u Španjolskoj (Pesqueira *i sur.*, 2016), Alžiru (Lehad *i sur.*, 2015) i Južnoafričkoj Republici (Jooste *i sur.*, 2011), gdje su kao najčešće varijante detektirane one koje se grupiraju u filogenijsku skupinu II bilo da se nalaze samostalno ili u miješanim zarazama s drugim genomskim varijantama. Proučavanje populacijske strukture GLRaV-3 važno je kako u istraživanju dinamike promjena nukleotidnog slijeda određene genomske regije, tako i u identifikaciji novih genomskih varijanti većeg ili manjeg patogenog potencijala, što je dokazano kod srodnog klosterovirusa Citrus tristeza virus (Černi *i sur.*, 2008, 2020; Hančević *i sur.*, 2013). U slučaju GLRaV-3, česte miješane zaraze s drugim ekonomski značajnim virusima predstavljaju limitirajući faktor u procjeni patogenog potencijala varijanti iz pojedine filogenijske skupine. Hančević *i sur.* (2023) su proveli evaluaciju patogenog potencijala pojedinih varijanti GLRaV-3 iz različitih filogenijskih skupina gdje su utvrdili brojne fiziološke i druge promjene domaćinskih biljaka koje ne prati nužno pojavnost simptoma (u slučaju varijante VI, kao i kombinacije varijanti I, II i III, a napose kod sorte 'Tribidrag'). Poznato je da se pojedine varijante GLRaV-slabije prenose vektorima (Blaisdell *i sur.*, 2012), kao i da imaju smanjenu detektabilnost u različitim dijelovima biljke što sugerira njihovu smanjenu efikasnost replikacije (Chooi *i sur.*, 2016). S rastućim spoznajama o biološkim svojstvima pojedinih varijanti GLRaV-3 raste i potreba za njihovom detekcijom radi dobivanja što boljeg uvida u njihovu rasprostranjenost i utjecaja kojeg imaju na domaćinsku biljku.

Početnice koje sam primijenio u karakterizaciji genomske regije HSP70h su razvijene 2005. (Turturo *i sur.*, 2005) i iako se smatraju univerzalnim početnicama (Chooi *i sur.*, 2013) zabilježeno je da imaju smanjenu mogućnost detekcije varijanti iz filogenijskih skupina VI i X (Chooi *i sur.*, 2013). Unatoč tome, u ovom istraživanju nisam imao nijedan slučaj neuspješne amplifikacije ovim početnicama kod svih uzoraka kojima sam prethodno potvrdio zarazu virusom GLRaV-3 drugim parom početnica (Gambino i Gribaudo, 2006). Valjda naglasiti da spomenute skupine (VI i X) nisu bile očekivane na našem prostoru pošto nisu detektirane niti pri ranijim istraživanjima (Vončina *i sur.*, 2017).

Istražujući genomsku raznolikost analiziranih virusnih varijanti, utvrdio sam veću raznolikost kod varijanti iz 16 autohtonih dalmatinskih sorti u odnosu na one klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali', promatrano zasebno po filogenijskim skupinama, ili za sve sekvence zajedno (Tablica 14.). Ovakav rezultat je potencijalno posljedica interakcije virusa s domaćinom gdje u slučaju većeg broja sorti dolazi do većeg broja promjena u ovoj genomskoj regiji virusa. Nadalje, varijante skupine II su u oba seta biljaka imale veći stupanj raznolikosti u odnosu na varijante skupine I (Tablica 14.) što može biti direktna posljedica veće pojavnosti varijanti skupine II i samim time većom vjerojatnosti evolucijskih događaja koji doprinose genomskoj raznolikosti.

#### Relativna kvantifikacija GLRaV-3 i ostalih ekonomski značajnih virusa u različitim fenološkim fazama

Replikacija GLRaV-3, kao i efikasnost njegovog kretanja po biljci, predstavljaju nužan preduvjet za ostvarivanje sistemične zaraze. U vinogradima sjeverne hemisfere dokazano je da se GLRaV-3 s početkom vegetacije rasprostranjuje iz rozgve prema novoformiranim mladima i listovima sve do pojave visokih ljetnih temperatura kada njegova koncentracija počinje opadati u lisnim peteljka, a najniža je s dolaskom jeseni kada se virus povlači prema bazalnom dijelu biljke (Tsai *i sur.*, 2012). U istraživanju koje sam proveo u okviru doktorske disertacije pratio sam promjenu relativne koncentracije GLRaV-3 i ostalih virusa prisutnih u miješanim infekcijama u floemskom tkivu bazalnog dijela rozgve koje se uobičajeno upotrebljava u detekciji virusa kada je biljka u dormantnoj fazi (Monis i Bestwick, 1996). Dormancija predstavlja fenološku fazu karakterističnu za višegodišnje biljke u kojoj su sve fiziološke aktivnosti svedene na minimum uslijed okolišnih faktora poput niskih temperatura koji uzrokuju zaustavljen rast (Rohde i Bhalerao, 2007). Kako bih analizirao utjecaj dormancije

na relativnu koncentraciju GLRaV-3 uzorkovanja sam proveo u dubokoj dormanciji (pet i 16 mjeseci nakon inokulacije) i na kraju dormantne faze (8 mjeseci nakon inokulacije) kada biljka već počinje izlaziti iz ove fenološke faze. Kraj dormantne faze je vidljiv kroz početak suzenja ili „plača“ vinove loze gdje biljka uslijed aktivnosti korijena stvara kapljice na mjestu reza.

Relativna koncentracija GLRaV-3 se razlikovala značajno između različitih perioda dormancije što je najbolje vidljivo kod biljaka koje su zaražene samo virusom GLRaV-3 (inokulum II; Slika 22.) gdje su prva i treća točka uzorkovanja, kao istovjetne faze duboke dormancije, imale značajno veću relativnu koncentraciju u odnosu na drugu točku uzorkovanja (početak izlaska biljke iz dormancije). Ovo jasno govori o tome da GLRaV-3 ima različitu efikasnost replikacije tijekom fenofaze dormancije. Ovakav pronalazak sam potvrdio kod svih biljaka zaraženih s GLRaV-3 u različitim kombinacijama s drugim virusima gdje sam također izmjerio najvišu relativnu koncentraciju u prvoj točki uzorkovanja, značajno višu u odnosu na druge dvije (Slika 21.). Iz svega navedenog može se zaključiti da trajanje virusne infekcije, kao i fenofaza dormancije u kojoj su aktivnosti domaćinske biljke svedene na minimum, imaju negativan utjecaj na replikaciju GLRaV-3. Također, nakon uspješne inokulacije, biljka može imati veći titar virusa koji s vremenom opada uslijed odgovora biljke koja suprimira replikaciju virusa kroz mehanizam utišavanja RNA (Gouveia *i sur.*, 2012)

Kompleksnost virusnih populacija koje nalazimo u prirodi ograničava mogućnost usporedbe dinamike replikacije pojedinog virusa u samostalnim i miješanim infekcijama s obzirom da je pronalazak biljaka vinove loze zaraženih samo jednim virusom rijedak. (Komar *i sur.*, 2010). Posljedično ne postoji dovoljan broj istraživanja o utjecaju drugih virusa na replikaciju GLRaV-3 i interakcija koje se pritom odvijaju (Song *i sur.*, 2021). U ovom istraživanju, utjecaj sastava virusnog inokuluma na replikaciju GLRaV-3 sam istražio unutar svakog od tri termina uzorkovanja usporedivši relativnu koncentraciju GLRaV-3 između biljaka zaraženih miješanim inokulumima s onima zaraženim samo virusom GLRaV-3 (inokulum II). U prva dva termina (pet i osam mjeseci nakon inokulacije) uzorkovanja nisam pronašao značajne razlike, dok sam u trećem terminu (16 mjeseci nakon inokulacije) pronašao značajne razlike između biljaka zaraženih samo virusom GLRaV-3 (inokulum II) i onih zaraženih inokulumom X (Slika 23.). Biljke zaražene inokulumom X, koje su osim GLRaV-3 zaražene još virusima GVA, GPGV i GRSPaV, su u trećem terminu uzorkovanja imale značajno nižu relativnu koncentraciju GLRaV-3 u odnosu na one zaražene inokulumom II. Jedno od objašnjenja smanjene relativne

koncentracije GLRaV-3 u inokulumu X je efekt koinfekcije s drugim virusima što je u skladu s rezultatima Tsai *i sur.* (2012) koji su nižu relativnu koncentraciju GLRaV-3 u pojedinim biljkama pripisali koinfekciji virusima GVB i GFkV. Rezultati ovog istraživanja govore u prilog tome da kombinacija virusa sadržanih u inokulumu X, kao i trajanje zaraze, ima negativan utjecaj na replikaciju GLRaV-3, s obzirom da je smanjena relativna koncentracija GLRaV-3 prisutna tek 16 mjeseci nakon cijepljenja. S obzirom da su isti virusi prisutni u inokulumu X također sastavni dio inokuluma Y i Q, uz druge viruse, i da u drugim inokulumima nisam zabilježio značajan utjecaj na replikaciju GLRaV-3, mogu pretpostaviti da interakcije koje su posljedica specifične kombinacije virusa imaju utjecaj na replikaciju GLRaV-3. Nadalje, inokulumi Y i Q su u svom sastavu imali i druge uzročnike bolesti uvijenosti lista (ampelovirus GLRaV-1 u Y i closterovirus GLRaV-2 u Q inokulumu) i nisam pronašao nikakve dokaze o sinergističkom ili antagonističkom odnosu u vidu promjena u relativnoj koncentraciji GLRaV-3. Ovakav pronalazak je u skladu sa sličnim istraživanjem koji su proveli Velasco *i sur.* (2014) koji nisu dokazali postojanje interakcija između pojedinih ampelovirusa, uzročnika bolesti uvijenosti lista vinove loze. Unatoč tome, ne mogu isključiti mogućnost da uzročnici bolesti uvijenosti lista vinove loze ostvaruju interakcije s drugim virusima prisutnim u pojedinom inokulumu. Iako su dosadašnja istraživanja dovela u vezu GVA i GLRaV-3, barem što se tiče efikasnosti vektorskog prijenosa (Engelbrecht i Kasdorf, 1990), u ovom istraživanju nisam utvrdio nikakvu povezanost između ta dva virusa promatranu kroz njihovu relativnu koncentraciju uspoređujući biljke zaražene inokulumom II (GLRaV-3) i inokulumom Z (GLRaV-3 i GVA).

Relativna koncentracija GVA se razlikovala promatranu po terminima uzorkovanja za sve uzorke zaražene ovim virusom gdje sam najvišu relativnu koncentraciju izmjerio u prvom terminu uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije), dok je u drugom i trećem (osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) opadala kontinuirano, i značajno nižu relativnu koncentraciju u trećem terminu uzorkovanja u odnosu na prvi (Slika 24.). Ovakav trend je još izraženiji u slučaju biljaka zaraženih inokulumom Z gdje sam izmjerio značajno nižu relativnu koncentraciju u drugom i trećem terminu uzorkovanja u odnosu na prvi (Slika 25.). Promatranu po individualnim inokulumima, relativna koncentracija GVA je bila najniža kod biljaka zaraženih inokulumom Y u odnosu na sve ostale inokulume u sva tri termina uzorkovanja (Slika 26.). S obzirom da je jedina razlika između inokuluma Y i X prisutnost GLRaV-1 u inokulumu Y, ovo predstavlja dodatan argument kako specifične virusne kombinacije imaju značajan utjecaj na

replikaciju pojedinog virusa. Ovaj pronalazak kod inokuluma Y je u suprotnosti s prethodnim zaključcima o vitivirusima i njihovoj relativnoj koncentraciji koja je u pozitivnoj korelaciji s onom ampelovirusa (Rowhani *i sur.*, 2018). Razlog tome je vjerojatno kombinacija virusa u Y inokulumu, gdje su osim dva ampelovirusa prisutni još GPGV i GRSPaV. Također, s obzirom da su virusne kombinacije u pojedinim inokulumima određene PCR testovima na 10 najznačajnijih virusa, a poznato je vinova loza može biti domaćin preko 80 virusa (Fuchs, 2020), ne može se u potpunosti isključiti utjecaj nekog netestiranog ili nepoznatog virusa. Problem sam pokušao anulirati u ovom istraživanju tako da sam koristio istu donorsku biljku za svaki pojedini tip inokuluma.

Od ostalih virusa kojima sam određivao relativnu koncentraciju, bilo u različitim vremenskim točkama, bilo u različitim inokulumima, značajne razlike sam izmjerio još kod GFkV i GPGV (Slika 27. i 28.). U slučaju oba virusa najvišu relativnu koncentraciju sam izmjerio u prvom terminu uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije) koja se značajno razlikovala od one u drugom terminu uzorkovanja (osam mjeseci nakon inokulacije). Iz svega navedenog, može se zaključiti da su ova dva virusa, kao i GLRaV-3, pod utjecajem trajanja zaraze i da produljeno trajanje dormancije ima negativan efekt na njihovu relativnu koncentraciju.

Važan korak u relativnoj kvantifikaciji virusa u ovom istraživanju bio je odabir domaćinskih gena stabilne ekspresije koji trebaju biti stabilni u različitim eksperimentalnim uvjetima (Luo *i sur.*, 2018). U istraživanju koje sam proveo u sklopu moje doktorske disertacije, aktin i tubulin su odabrani kao najbolji kandidati za kvantifikaciju virusa u četiri različite sorte vinove loze, uslijed samostalne zaraze virusom GLRaV-3 ili u koinfekciji s drugim virusima (Tablica 17.). Treći gen kandidat kojeg sam isključio iz daljnjih analiza je bio GAPDH koji je pokazao nedovoljnu stabilnost u ovakvim eksperimentalnim uvjetima što odgovara sličnim pronalascima Gambina *i sur.* (2012) koji su ustanovili da uslijed zaraze vinove loze virusom GRSPaV dolazi do promjena u ekspresiji GAPDH. Potencijalna mogućnost preuveličavanja relativne koncentracije virusa predstavlja jedan od glavnih problema u kvantitativnoj analizi, pogotovo kod RNA virusa kojima se dio genoma eksprimira preko sgRNA. U tu svrhu, za potrebe relativne kvantifikacije GLRaV-3 u ovom istraživanju odabrao sam dva seta početnica, jedan za genomsku regiju ORF1a koja se direktno prepisuje s genoma virusa, a drugi za CP genomsku regiju čija ekspresija je upravo vezana za sgRNA. Kao rezultat, nisam pronašao značajne razlike u njihovim Ct vrijednostima što je u skladu s pronalascima Bester *i sur.* (2014).

Na drugim virusima, ovaj pronalazak su već potvrdili Bertazzon *i sur.* (2016) uspoređujući Ct vrijednosti dobivene za dvije genomske regije virusa GPGV, od kojih jedna kodira RdRP, a druga CP regiju.

Kvantifikacija varijanti koje pripadaju pojedinim genotipovima GLRaV-3 nije ostvarena u ovoj doktorskoj disertaciji. Varijante genotipova I i II, koje su prisutne u autohtonim dalmatinskim sortama kako je dokazano u ovoj doktorskoj disertaciji, imaju nukleotidni slijed koji je u tolikoj mjeri sličan (preko 95 %, ovisno o promatranoj genomskoj regiji; Diaz-Lara *i sur.*, 2018) da niti jednim dostupnim programom nije bilo moguće dizajnirati grupno specifične početnice za kvantifikaciju metodom kvantitativnog PCR-a (izv. prof. dr. sc. Silvija Černi i dr. sc. Darija Stupin-Polančec - usmena komunikacija). Nadalje, analizom krivulja disocijacije varijanti ova dva genotipa koja bi eventualno mogle omogućiti razlikovanje varijanti različitih genotipova GLRaV-3 (Bester *i sur.*, 2012), nisam zabilježio evidentne razlike koje bi omogućile njihovu diskriminaciju kod produkata PCR reakcije dobivenih HRM4 početnicama (Slika 29.). Ponovljenim analizama amplikona dobivenih reverznom transkripcijom istog RNA izolata dobivene krivulje disocijacije su se razlikovale od prethodnih, čime usporedba ovih genotipova nije imala smisla. Najvjerojatniji razlog tome je, osim već prethodno navedene prevelike sličnosti genoma, i potencijalno velik broj varijanti (mutanata) unutar virusnih izolata (čak i monofiletskih) koje utječu na sparivanje lanaca amplikona te posljedično rezultiraju nešto različitim krivuljama.

#### Biološka karakterizacija GLRaV-3 u samostalnim i miješanim inokulumima

Odgovor biljaka na zarazu inokulumima koji sadrže GLRaV-3 samostalno ili u kombinaciji s drugim ekonomski značajnim virusima očitovao se u promjenama fizioloških parametara kod različitih sorti u odnosu na kontrolne biljke. Najintenzivnije promjene dogodile su se kod sorte 'Pinot Noir' gdje je kod zaraženih biljaka zabilježen najveći broj promijenjenih parametara u odnosu na zdrave biljke. Promatrajući promjene na nivou inokuluma, inokulum Y je od svih testiranih inokuluma uzrokovao najveći broj promjena, od kojih su promjene u relativnom sadržaju vode i permeabilnosti membrane bile najučestalije.

Upravo kod sorte 'Pinot Noir', najveći relativan sadržaj vode sam izmjerio kod biljaka zaraženih inokulumom Y u odnosu na kontrolne biljke (Slika 38.). Kod sorte 'Tribidrag' su kontrolne biljke imale najveći relativan sadržaj vode (Slika 37.), a kod sorti 'Cabernet Franc' i

'Merlot' nisam izmjerio nikakve značajne razlike. Relativan sadržaj vode u listu može biti pod direktnim utjecajem nakupljanja šećera u listu koje se događa uslijed njegove nemogućnosti daljnje translokacije po biljci kao posljedica zaraze virusom GLRaV-3. Povećani sadržaj šećera u listu uzrokuje porast turgora u mezofilnim stanicama lista koje se šire i posljedično imaju veći potencijal dodatnog upijanja vode (Halldorson i Keller, 2018). Ovim istraživanjem sam utvrdio da su promjene u relativnom sadržaju vode u listu pod utjecajem sorte i virusnog inokuluma, a sorti 'Tribidrag' se uslijed zaraze virusom smanjuje mogućnost dodatnog usvajanja vode.

Značajno nižu permeabilnost membrane u odnosu na kontrolne biljke sam izmjerio kod sorti 'Pinot Noir' i 'Cabernet Franc', u oba slučaja kod biljaka zaraženih inokulumima II i Y (Slika 39. i 40.), a kod 'Pinota Noir' i u slučaju zaraze inokulumom X. Na staničnoj razini uslijed djelovanja virusa može doći do promjena permeabilnosti membrana (Mandadi i Scholthof, 2013) što je dokazano i kod agruma zaraženih Citrus tristeza virusom, srodnom klosterovirusu, gdje su Hančević *i sur.* (2018) također izmjerili smanjenu permeabilnost membrane u odnosu na zdrave biljke.

Smanjeni sadržaj klorofila *a* sam izmjerio kod sorte 'Tribidrag', u kojoj su u odnosu na sve druge miješane inokulume biljke zaražene inokulumom Y imale najniži sadržaj (Slika 31.), kao i najniži sadržaj ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolne biljke (Slika 33.). Oštećenja koja nastaju na membranama kloroplasta kao posljedica oksidativnog stresa direktno utječu na smanjeni sadržaj fotosintetskih pigmenata i posljedično smanjene fotosintetske aktivnosti biljke (Bertamini *i sur.*, 2004, 2005). Za razliku od biljaka sorte 'Tribidrag', biljke 'Pinota Noir' zaražene inokulumom Q su imale najviši sadržaj klorofila *a* i ukupnih karotenoida u odnosu na kontrolne biljke (Slika 32. i 34.). Iako je sorta 'Pinot Noir' najintenzivnije reagirala na zarazu virusom promatrano kroz ostale fiziološke parametre, sadržaj fotosintetskih pigmenata se nije smanjio što govori o izostanku ovog tipa oštećenja uslijed virusne zaraze.

Kod sorte 'Pinot Noir' sve biljke zaražene virusom su imale značajno niži sadržaj prolina u odnosu na kontrolne biljke (Slika 36.), dok kod drugih sorata nisam zabilježio nikakve značajne razlike u odnosu na kontrolne biljke. Ovakav pronalazak kod sorte 'Pinot Noir' potvrdili su Hančević *i sur.* (2023) uslijed zaraze virusom GLRaV-3. Aminokiselina prolin dokazano sudjeluje u metaboličkim procesima vinove loze gdje s povećanjem sadržaja u citosolu i međustaničnim prostorima djeluje kao regulator osmotskog potencijala čime

ublažava efekte abiotičkih stresova (Gohari *i sur.*, 2021). Kod zaraze vinove loze virusom GLRaV-3 i tretmana sušom Cui *i sur.* (2016) su utvrdili povećani sadržaj ove aminokiseline kod zaraženih *in vitro* biljaka sorte 'Cabernet Sauvignon'. Sadržaj prolina koji sam utvrdio ovim istraživanjem kod sorti u kontroliranom pokusu govori da je nakupljanje prolina kao posljedica stresa zaraze virusom sortno svojstvo.

Ekspresija simptoma varirala je između različitih inokuluma i sorti upotrebljenih u ovom istraživanju. 'Tribidrag' je sorta koja je u većini slučajeva bila asimptomatska, osim u slučaju inokuluma Y, koji je i kod drugih sorti izazvao najizraženiju ekspresiju simptoma (Tablica 19. i 20.). Utjecaj inokuluma Y, koji je sadržavao osim GLRaV-3 i GLRaV-1, govori da ovakav tip zaraze predstavlja značajan biotički stres na biljku koji može drastično umanjiti prinos vinove loze u uvjetima *in situ* (Moutinho-Pereira *i sur.*, 2012). Od karakterističnih simptoma bolesti uvijenosti lista koje sam promatrao zabilježio sam međužilno crvenilo na listovima, kao i uvijanje listova prema naličju različitog intenziteta. Unatoč tome što je GLRaV-3 definiran kao glavni uzročnik bolesti uvijenosti lista vinove loze (Maree *i sur.*, 2013) prisutnost još jednog ampelovirusa (GLRaV-1) doprinosi jačem razvoju simptoma kod zaraženih biljaka, iako nisam pronašao nikakvu korelaciju u vidu njihove relativne koncentracije. Ovakvi rezultati su potvrđeni i *in situ*, gdje su Čarija *i sur.* (2022) na biljkama sorte 'Plavac Mali' zaraženim ovakvom kombinacijom utvrdili stabilnost u ekspresiji simptoma bolesti uvijenosti lista promatrano kroz dvije godine. Jedna od zanimljivosti u ovom istraživanju je da inokulirane biljke nisu pokazivale simptome u istoj godini kada su i zaražene, iako sam prijenos GLRaV-3 uspješno detektirao ELISA testom, a prijenos svih ostalih virusa u miješanim inokulumima potvrdio i PCR testovima. Ovakva pojava vjerojatno je posljedica kratkog trajanja vegetacijskog ciklusa nakon cijepljenja do dormancije koja je nastupila uslijed okolišnih uvjeta. Nadalje, visoke temperature u ljetnom razdoblju koje je uslijedilo nakon cijepljenja su imale utjecaj na razvoj simptoma kasnije tijekom vegetacijske sezone s obzirom da se simptomi bolesti uvijenosti lista jače ekspimiraju pri nižim temperaturama kakve nalazimo u umjerenijim i hladnijim klimama pogodnim za uzgoj vinove loze (Naidu *i sur.*, 2008). Također, u veoma rijetkim situacijama uvjeti uzgoja biljaka u stakleniku mogu predstavljati bitan faktor u sprječavanju razvoja simptoma kako nam navode Constable *i sur.* (2013).



Složenost interakcija virusa i domaćinske biljke prikazana je i u ovom istraživanju gdje na odgovor biljke uslijed zaraze virusom važan faktor ima sorta, kao i sastav virusnog inokuluma. Promjene u pojedinim fiziološkim parametrima ne mora nužno pratiti pojavnost simptoma bolesti uvijenosti lista što je najbolje vidljivo kod autohtone sorte 'Tribidrag' koja je unatoč promjenama u pojedinim fiziološkim parametrima bila najčešće bez simptoma zaraze. Provedeno na uzorku jedne godine, ovo istraživanje predstavlja uvod u složenija istraživanja kojim će se bolje definirati biološki markeri u rasvjetljavanju odnosa biljka-virus kod globalno rasprostranjenih sorti vinove loze i autohtonih dalmatinskih sorti.

## 6. ZAKLJUČCI

Molekularnom i biološkom karakterizacijom virusa uvijenosti lista 3 vinove loze (GLRaV-3) iz autohtonih dalmatinskih sorti izveo sam sljedeće zaključke:

- Virus uvijenosti lista vinove loze 3 (GLRaV-3), najvažniji uzročnik bolesti uvijenosti lista vinove loze, ima najveću pojavnost od svih ekonomski značajnih virusa vinove loze u 16 autohtonih dalmatinskih sorti i klonskim kandidatima sorte 'Plavac mali'
- GLRaV-3 najčešće nalazimo u miješanim infekcijama s virusom vinove loze A (GVA), virusom jamičavosti drva podloge Rupestris du Lot (GRSPaV) i virusom sivog pinota (GPGV)
- Analizirane genomske varijante GLRaV-3 iz uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti i klonskih kandidata sorte 'Plavac Mali' su se grupirale u filogenijske skupine I i II
- Relativna koncentracija GLRaV-3 u bazalnom dijelu biljke u ovom je istraživanju bila najveća na početku fenofaze dormancije, a opadala je s njenim trajanjem
- Interakcije GLRaV-3 s drugim virusima u miješanim infekcijama mogu imati negativan učinak na relativnu koncentraciju GLRaV-3
- Produljeni period infekcije ima negativan učinak na relativnu koncentraciju GVA, kao i interakcije GVA s drugim virusima u miješanim infekcijama
- Promjene u vrijednostima pojedinih fizioloških parametara vinove loze uslijed zaraze virusom ovise o sorti i prisutnosti drugih virusa u koinfekciji, i ne rezultiraju nužno razvojem simptoma na domaćinskim biljkama
- Simptomi bolesti uvijenosti lista najizraženiji su kod standardnih indikatorskih sorti i autohtone sorte 'Tribidrag' u slučaju koinfekcije GLRaV-3 i GLRaV-1

## 7. POPIS LITERATURE

- 2005/43/EZ, 2005. *Direktiva komisije 2005/43/EZ o izmjeni priloga Direktivi Vijeća 68/193/EEZ o stavljanju na tržište materijala za vegetativno umnažanje vinove loze*. Europske Unija, Službeni list Europske Unije, 9.
- Afechtal M., Mounir M., Minafra A., Saldarelli P., Kubaa R.A., 2019. First report on the occurrence of grapevine rupestris stem pitting-associated virus in Moroccan grapevines. *Journal of Plant Pathology*, *Journal of Plant Pathology* 101: 405. DOI: 10.1007/s42161-018-0167-y.
- Alabi O.J., Casassa L.F., Gutha L.R., Larsen R.C., Henick-Kling T., Harbertson J. F., Naidu R.A., 2016. Impacts of grapevine leafroll disease on fruit yield and grape and wine chemistry in a wine grape (*Vitis vinifera* L.) cultivar. *PLoS ONE* 11: 1–18. DOI: 10.1371/journal.pone.0149666.
- Almeida R.P.P., Daane K.M., Bell V.A., Blaisdell G.K., Cooper M.L., Heerbach E., Pietersen G., 2013. Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology* 4: 1–13. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00094.
- Andabaka Ž., Stupić D., Karoglan M., Marković Z., Preiner D., Maletić E., Kontić J.K., 2016. Povijesni tijek uzgoja najvažnijih autohtonih dalmatinskih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.). *Glasnik Zaštite Bilja, ZADRUŽNA ŠTAMPA*, dd 39: 14–20.
- Andersen C.L., Jensen J.L., Ørntoft T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, *AACR* 64: 5245–5250.
- Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval V., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M., 2004. Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, *JSTOR* 183–195.
- Armijo G., Schlechter R., Agurto M., Muñoz D., Nuñez C., Arce-Johnson P., 2016. Grapevine pathogenic microorganisms: Understanding infection strategies and host response scenarios. *Frontiers in Plant Science* 7: 1–18. DOI: 10.3389/fpls.2016.00382.

- Atallah S.S., Gómez M.I., Fuchs M.F., Martinson T.E., 2012. Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *American Journal of Enology and Viticulture*, Am Soc Enol Viticulture 63: 73–79.
- Bates L.S., Waldren R.P., Teare I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, Springer 39: 205–207.
- Beidler J.L., Hilliard P.R., Rill R.L., 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical biochemistry*, Elsevier 126: 374–380.
- Bertamini M., Malossini U., Muthuchelian K., Nedunchezian N., 2005. Physiological response of field grown grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Marzemino) to grapevine leafroll-associated virus (GLRaV-1). *Phytopathologia Mediterranea* 44: 256–265. DOI: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-1801.
- Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N., 2004a. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology*, Wiley Online Library 152: 145–152.
- Bertamini M., Muthuchelian K., Nedunchezian N., Studies F., Higher G., 2004b. Effect of Grapevine Leafroll on the Photosynthesis of Field Grown Grapevine Plants ( *Vitis vinifera* L. cv. Lagrein ). *Journal of Phytopathology* 152: 145–152.
- Bertazzon N., Borgo M., Vanin S., 2010. Genetic variability and pathological properties of Grapevine Leafroll-associated Virus 2 isolates *European Journal of Plant Pathology*, 127, 185-197. DOI: 10.1007/s10658-010-9583-3.
- Bertazzon N., Filippin L., Forte V., Angelini E., 2016. Grapevine Pinot gris virus seems to have recently been introduced to vineyards in Veneto, Italy. *Archives of virology*, Springer 161: 711–714.
- Bertazzon N., Forte V., Filippin L., Causin R., Maixner M., Angelini E., 2017. Association between genetic variability and titre of Grapevine Pinot gris virus with disease symptoms. *Plant Pathology* 66: 949–959. DOI: 10.1111/ppa.12639.
- Bertolini E., García J., Yuste A., Olmos A., 2010. High prevalence of viruses in table grape from Spain detected by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 128: 283–287.

- Bester R., Jooste A.E.C., Maree H.J., Burger J.T., 2012a. Real-time RT-PCR high-resolution melting curve analysis and multiplex RT-PCR to detect and differentiate grapevine leafroll-associated virus 3 variant groups I, II, III and VI. *Virology Journal* 9: 1–12. DOI: 10.1186/1743-422X-9-219.
- Bester R., Maree H.J., Burger J.T., 2012b. Complete nucleotide sequence of a new strain of grapevine leafroll-associated virus 3 in South Africa. *Archives of virology*, Springer 157: 1815–1819.
- Bester R., Pepler P.T., Burger J.T., Maree H.J., 2014. Relative quantitation goes viral: An RT-qPCR assay for a grapevine virus. *Journal of Virological Methods*, Elsevier B.V. 210: 67–75. DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.09.022.
- Blaisdell G.K., Zhang S., Daane K., Almeida R.P.P., 2012. Patterns of virus transmission from hosts with mixed infections. U: *Proceedings of the 17th Congress of ICVG 7–14 October*, 178–179.
- Boyd L.A., Ridout C., Sullivan D.M.O., Leach J.E., Leung H., 2012. Plant – pathogen interactions : disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics*, Elsevier Ltd 1–8. DOI: 10.1016/j.tig.2012.10.011.
- Bruisson S., Lebel S., Walter B., Prevotat L., Seddas S., Schellenbaum P., 2017. Comparative detection of a large population of grapevine viruses by TaqMan® RT-qPCR and ELISA. *Journal of Virological Methods*, Elsevier B.V. 240: 73–77. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.12.003.
- Bulić S., 1949. Dalmatinska ampelografija. Poljoprivredni nakladni zavod.
- Burger J.T., Maree H.J., Gouveia P., Naidu R.A., 2017. Grapevine leafroll-associated virus 3. U: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, Springer, 167–194.
- Čarija M., Radić T., Černi S., Mucalo A., Zdunić G., Vončina D., Jagunić M., Hančević K., 2022. Prevalence of Virus Infections and GLRaV-3 Genetic Diversity in Selected Clones of Croatian Indigenous Grapevine Cultivar Plavac Mali. *Pathogens* 11: 1–15. DOI: 10.3390/pathogens11020176.

- 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. DOI: 10.1007/s11262-007-0183-z.
- Cerni S., Skoric D., Ruscic J., Krajacic M., Papic T., Djelouah K., Nolasco G., 2009. East Adriatic— a reservoir region of severe Citrus tristeza virus strains. *European journal of plant pathology*, Springer 124: 701–706.
- Černi S., Šatović Z., Ruščić J., Nolasco G., Škorić D., 2020. Determining intra-host genetic diversity of Citrus tristeza virus. What is the minimal sample size. *Phytopathol. Mediterr* 59: 295–302.
- Chooi K.M., Cohen D., Pearson M.N., 2013a. Molecular characterisation of two divergent variants of grapevine leafroll-associated virus 3 in New Zealand. *Archives of Virology*, Springer 158: 1597–1602.
- Chooi K.M., Cohen D., Pearson M.N., 2013b. Generic and sequence-variant specific molecular assays for the detection of the highly variable Grapevine leafroll-associated virus 3. *Journal of virological methods*, Elsevier 189: 20–29.
- Chooi K.M., Cohen D., Pearson M.N., 2016. Differential distribution and titre of selected grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants within grapevine rootstocks. *Archives of Virology*, Springer Vienna 161: 1371–1375. DOI: 10.1007/s00705-016-2791-1.
- Cieniewicz E.J., Qiu W., Saldarelli P., Fuchs M., 2020. Believing is seeing: lessons from emerging viruses in grapevine. *Journal of Plant Pathology*, Springer 102: 619–632 .
- Clark M.F., Adams A.N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475–483. DOI: 10.1099/0022-1317-34-3-475.
- Constable F.E., Connellan J., Nicholas P., Rodoni B.C., 2013. The reliability of woody indexing for detection of grapevine virus-associated diseases in three different climatic conditions in Australia. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19: 74–80. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2012.00204.x.

- Cui Z.H., Bi W.L., Hao X.Y., Xu Y., Li P.M., Walker M.A. Wang Q.C., 2016. Responses of in vitro-grown plantlets (*Vitis vinifera*) to Grapevine leafroll-associated virus-3 and PEG-induced drought stress. *Frontiers in Physiology* 7: 1–14. DOI: 10.3389/fphys.2016.00203.
- Cvjetković B., Mirošević N., 2007. Virusi i fitoplazme vinove loze. U: *Razmnožavanje loze i lozno rasadničarstvo* (M. Banjeglav, ur.), Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 157–167.
- Diaz-Lara A., Brisbane R.S., Aram K., Golino D., Al Rwahnih M., 2019. Detection of new vitiviruses infecting grapevine in California. *Archives of Virology*, Springer Vienna 164: 2573–2580. DOI: 10.1007/s00705-019-04355-1.
- Diaz-Lara A., Klaassen V., Stevens K., Sudarshana M.R., Rowhani A., Maree H. J., Chooi K. M., Blouin A. G., Habili N., Song Y., Aram K., Arnold K., Cooper M. L., Wunderlich L., Battany M. C., Bettiga L. J., Smith R. J., Bester R., Xiao H., Meng B., Preece J. E., Golino D., Al Rwahnih M., 2018. Characterization of grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants and application towards RT-qPCR assay design. *PLoS ONE* 13: 11. DOI: 10.1371/journal.pone.0208862.
- Digiario M., Martelli G.P., Savino V., Symons R.H., 2000. Phloem-limited viruses of the grapevine in the Mediterranean and Near East. *Extended abstracts 13th Meeting ICVG, Adelaide, Australia, 12-17 March 2000* 92: 75.
- Dolja V. V., Kreuze J.F., Valkonen J.P.T., 2006. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117: 38–51. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.02.002.
- Domingo E., Martin V., Perales C., Grande-Perez A., Garcia-Arriaza J., Arias A., 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Quasispecies: concept and implications for virology*, Springer 51–82.
- Engelbrecht D.J., Kasdorf G.G.F., 1990. Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug, *Plannococcus ficus*. *Phytoparasitica* 22: 341–436.
- Farooq A.B.U., Ma Y., Wang Z., Zhuo N., Wenxing X., Wang G., Hong N., 2013. Genetic diversity analyses reveal novel recombination events in Grapevine leafroll-associated virus 3 in China. *Virus Research*, Elsevier 171: 15–21.

- Fuchs M., 2020. Grapevine viruses : a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology* 102: 643-653. DOI: 10.1007/s42161-020-00579-2.
- Fuchs M., Martinson T.E., Loeb G.M., Hoch H.C., 2009. Survey for the three major leafroll disease-associated viruses in Finger Lakes vineyards in New York. *Plant Disease, Am Phytopath Society* 93: 395–401.
- Gambino G., Cuozzo D., Fasoli M., Pagliarani C., Vitali M., Boccacci P., Pezzotti M., Mannini F., 2012. Co-evolution between Grapevine rupestris stem pitting-associated virus and *Vitis vinifera* L. leads to decreased defence responses and increased transcription of genes related to photosynthesis. *Journal of Experimental Botany, Oxford University Press* 63: 5919–5933.
- Gambino G., Gribaudo I., 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Phytopathology* 96: 1223–1229. DOI: 10.1094/PHYTO-96-1223.
- Gohari G., Panahirad S., Sepehri N., Akbari A., Zahedi S.M., Jafari H., Dadpour M. R., Fotopoulos V., 2021. Enhanced tolerance to salinity stress in grapevine plants through application of carbon quantum dots functionalized by proline. *Environmental Science and Pollution Research*, *Environmental Science and Pollution Research* 28: 42877–42890. DOI: 10.1007/s11356-021-13794-w.
- Gouveia P., Dandlen S., Costa Â., Marques N., Nolasco G., 2012. Identification of an RNA silencing suppressor encoded by Grapevine leafroll-associated virus 3. *European Journal of Plant Pathology* 133: 237–245. DOI: 10.1007/s10658-011-9876-1.
- Gouveia P., Santos M.T., Eiras-Dias J.E., Nolasco G., 2011. Five phylogenetic groups identified in the coat protein gene of grapevine leafroll-associated virus 3 obtained from Portuguese grapevine varieties. *Archives of Virology* 156: 413–420. DOI: 10.1007/s00705-010-0878-7.
- Gucci R., Lombardini L., Tattini M., 1997. Analysis of leaf water relations in leaves of two olive (*Olea europaea*) cultivars differing in tolerance to salinity. *Tree physiology, Heron Publishing* 17: 13–21.



- Hall T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. U: *Nucleic acids symposium series*, [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 95–98.
- Halldorson M.M., Keller M., 2018. Grapevine leafroll disease alters leaf physiology but has little effect on plant cold hardiness. *Planta*, Springer 248: 1201–1211.
- Hančević K., Čarija M., Radić Brkanac S., Gaši E., Likar M., Zdunić G., Regvar M., Radić T., 2023. Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 in Single and Mixed Infections Triggers Changes in the Oxidative Balance of Four Grapevine Varieties. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 8. DOI: 10.3390/ijms24010008.
- Hančević K., Černi S., Nolasco G., Radić T., Djelouah K., Škorić D., 2013. Biological characterization of Citrus tristeza virus monophyletic isolates with respect to p25 gene. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 81: 45–53. DOI: 10.1016/j.pmpp.2012.10.005.
- Hančević K., Radić T., Pasković I., Urlić B., 2018. Biochemical and physiological responses to long-term Citrus tristeza virus infection in Mexican lime plants. *Plant Pathology*, Wiley Online Library 67: 987–994.
- Hančević K., Saldarelli P., Čarija M., Černi S., Zdunić G., Mucalo A., Radić T., 2021. Predominance and Diversity of GLRaV-3 in Native Vines of Mediterranean Croatia. *Plants*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute 10: 17.
- Hančević K., Zdunić G., Vončina D., Radić T., 2015. Virus composition influences virus elimination success and in vitro growth characteristics of the Grapevine cv. Plavac mali. *Journal of plant pathology* 97: 199–202.
- Hily J.M., Poulicard N., Candresse T., Vigne E., Beuve M., Renault L., Velt A., Spilmont A. S., Lemaire O., 2020. Datamining, Genetic Diversity Analyses, and Phylogeographic Reconstructions Redefine the Worldwide Evolutionary History of Grapevine Pinot gris virus and Grapevine berry inner necrosis virus. *Phytobiomes Journal* 4: 165–177. DOI: 10.1094/PBIOMES-10-19-0061-R.

- Ito T., Nakaune R., 2016. Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13. *Archives of virology*, Springer 161: 2555–2559.
- Jarugula S., Gowda S., Dawson W.O., Naidu R.A., 2010. 3' -coterminial subgenomic RNAs and putative cis -acting elements of Grapevine leafroll-associated virus 3 reveals ' unique ' features of gene expression strategy in the genus Ampelovirus. *Virology Journal* 7: 1–14.
- Jarugula S., Gowda S., Dawson W.O., Naidu R.A., 2018. Development of infectious cDNA clones of Grapevine leafroll-associated virus 3 and analyses of the 5' non-translated region for replication and virion formation. *Virology*, Elsevier Inc. 523: 89–99. DOI: 10.1016/j.virol.2018.07.023.
- Jooste A.E.C., Maree H.J., Bellstedt D.U., Goszczynski D.E., Pietersen G., Burger J.T., 2010. Three genetic grapevine leafroll-associated virus 3 variants identified from South African vineyards show high variability in their 5'UTR. *Archives of Virology* 155: 1997–2006. DOI: 10.1007/s00705-010-0793-y.
- Jooste A.E.C., Molenaar N., Maree H.J., Bester R., Morey L., de Koker W.C., Burger J.T., 2015. Identification and distribution of multiple virus infections in Grapevine leafroll diseased vineyards. *European Journal of Plant Pathology*, Springer 142: 363–375.
- Jooste A.E.C., Pietersen G., Burger J.T., 2011. Distribution of grapevine leafroll associated virus-3 variants in South African vineyards. *European Journal of Plant Pathology* 131: 371–381. DOI: 10.1007/s10658-011-9814-2.
- Karasev A. V, 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual review of phytopathology*, Annual Reviews, Inc. 38: 293-324.
- Karoglan Kontić J., Preiner D., Šimon S., Zdunić G., Poljuha D., Maletić E., 2009. Sanitary status of Croatian native grapevine varieties. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74: 99–103.
- Komar V., Vigne E., Demangeat G., Lemaire O., Fuchs M., 2010. Comparative performance of virus-infected vitis vinifera cv. savagnin rose grafted onto three rootstocks. *American Journal of Enology and Viticulture* 61: 68–73.

- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A., Lopez R., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *bioinformatics*, Oxford University Press 23: 2947–2948.
- Lehad A., Selmi I., Louanchi M., Aitouada M., Mahfoudhi N., 2015. Genetic diversity of grapevine leafroll-associated virus 3 in Algeria. *Journal of Plant Pathology* 97: 203–207. DOI: 10.4454/JPP.V97I1.019.
- Lichtenthaler H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350–382. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.
- Liu Y.-P., Peremyslov V. V, Medina V., Dolja V. V, 2009. Tandem leader proteases of Grapevine leafroll-associated virus-2: Host-specific functions in the infection cycle. *Virology*, Elsevier 383: 291–299.
- Luo M., Gao Z., Li H., Li Q., Zhang C., Xu W., Song S., Ma C., Wang S., 2018. Selection of reference genes for miRNA qRT-PCR under abiotic stress in grapevine. *Scientific Reports*, Springer US 8: 1–11. DOI: 10.1038/s41598-018-22743-6.
- MacKenzie D.J., McLean M.A., Mukerji S., Green M., 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 81: 222–226. DOI: 10.1094/PDIS.1997.81.2.222.
- Mahfoudhi N., Digiario M., Dhouibi M.H., 2009. Transmission of grapevine leafroll viruses by *Planococcus ficus* (Hemiptera: Pseudococcidae) and *Ceroplastes rusci* (Hemiptera: Coccidae). *Plant Disease*, Am Phytopath Society 93: 999–1002.
- Mahfoudhi N., Digiario M., Savino V., Di Terlizzi B., Ahmed H.M.H, Digiario M., Martelli G.P., 1998. Viruses and virus diseases of grapevine in Tunisia. *EPPO Bulletin* 34: 395–398. DOI: 10.1111/j.1365-2338.1998.tb00720.x.
- Malagnini V., de Lillo E., Saldarelli P., Beber R., Duso C., Raiola A., Zanotelli L., Valenzano D., Giampetruzzi A., Morelli M., Ratti C., Causin R., Gualandri V., 2016. Transmission of grapevine Pinot gris virus by *Colomerus vitis* (Acari: Eriophyidae) to grapevine. *Archives of Virology*, Springer Vienna 161: 2595–2599. DOI: 10.1007/s00705-016-2935-3.

- Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I., Preiner D., Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S., 2015a. Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze. *Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb* 322–323.
- Maletić E., Kontić J.K., Pejić I., 2008. *Vinova loza: ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Školska knjiga.
- Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J., Zdunić G., Preiner D., Šimon S., Andabaka Ž., Žulj Mihaljević M., Bubola M., Marković Z., Stupić D., Mucalo A., 2015b. Ampelographic and genetic characterization of Croatian grapevine varieties. *Vitis - Journal of Grapevine Research* 54: 93–98.
- Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., 2015. *Control of Viruses Infecting Grapevine. Control of Plant Virus Diseases*, Elsevier Inc., 175–227 str.
- Mandadi K.K., Scholthof K.B.G., 2013. Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? *Plant Cell* 25: 1489–1505. DOI: 10.1105/tpc.113.111658.
- Maree H.J., Almeida R.P.P., Bester R., Chooi K.M., Cohen D., Dolja V., Fuchs M. F., Golino D. A., Jooste A. E.C., Martelli G. P., Naidu R. A., Rowhani A., Saldarelli P., Burger J.T., 2013. Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology* 4: 1–21. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00082.
- Martelli G., 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology* 96:1 (sup).
- Martelli G.P., 1993. Leafroll. U: *Graft-transmissible diseases of grapevines Handbook for detection and diagnosis*, Food & Agriculture Org., 37–45.
- Martelli G.P., 2001. Virus Diseases of Grapevine. *Encyclopedia of Life Sciences* 1–8. DOI: 10.1038/npg.els.0000766.
- Martelli G.P., 2009. Grapevine virology highlights 2006–2009. U: *Extended abstracts of the 16th Meeting of ICVG, Dijon Le Progrès Agricole et Viticole, Hors Série – Spécial Congrès ICVG*, 15–24.

- Martelli G.P., 2017. An Overview on Grapevine Viruses, Viroids and the Diseases They Cause. U: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (B. Meng, G.P. Martelli, D.A. Golino i M. Fuchs, ur.), 31–46.
- Martelli G.P., 2019. A Brief Historical Account of the Family Closteroviridae. *Methods in Molecular Biology* 2015: 7–13. DOI: 10.1007/978-1-4939-9558-5\_2.
- Martelli G.P., Abou Ghanem-Sabanadzovic N., Agranovsky A.A., Al Rwahnih M., Dolja V. V., Dovas C. I., Fuchs M., Gugerli P., Hu J. S., Jelkmann W., Katis N. I., Maliogka V. I., Melzer M. J., Menzel W., Minafra A., Rott M. E., Rowhani A., Sabanadzovic S., Saldarelli P., 2012. Taxonomic revision of the family closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* 94: 7–19.
- Martelli G.P., Piro G., 1975. Virus diseases of the grapevine in a Sicilian herbarium of the past century. *Vitis* 13: 329–335.
- Masten Milek T., 2009. Štitaste uši (hemiptera: coccoidea) na vinovoj lozi. *Glasilo biljne zaštite* 5: 357–368.
- Monis J., Bestwick R.K., 1996. Detection and localization of grapevine leafroll associated closteroviruses in greenhouse and tissue culture grown plants. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 199–205.
- Montero R., El aou ouad H., Flexas J., Bota J., 2016. Effects of grapevine leafroll associated virus 3 (GLRaV-3) on plant carbon balance in *Vitis vinifera* L. cv. Giró Ros. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, Springer International Publishing 28: 1–10. DOI: 10.1007/s40626-015-0050-6.
- Moutinho-Pereira J., Correia C.M., Gonçalves B., Bacelar E.A., Coutinho J.F., Ferreira H. F., Lousada J. L., Cortez M.I., 2012. Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and -3) on the physiology of the Portuguese grapevine cultivar „Touriga Nacional“ growing under field conditions. *Annals of Applied Biology* 160: 237–249. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2012.00536.x.

- Moya A., Holmes E.C., González-Candelas F., 2004. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*, Nature Publishing Group 2: 279–288.
- Naidu R., Rowhani A., Fuchs M., Golino D., Martelli G.P., 2014. Grapevine Leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. *Plant Disease* 98: 1172–1185. DOI: 10.1094/PDIS-08-13-0880-FE.
- Naidu R.A., 2017. Grapevine leafroll-associated virus 1. U: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, Springer, 127–139.
- Naidu R.A., Maree H.J., Burger J.T., 2015. Grapevine Leafroll Disease and Associated Viruses: A Unique Pathosystem. *Annual Review of Phytopathology* 53: 613–634. DOI: 10.1146/annurev-phyto-102313-045946.
- Naidu R.A., O’Neil S., Walsh D., 2008. Grapevine Leafroll Disease. WSU Extension Bulletin EB2027E. 20pp.
- Namba S., Yamashita S., Doi Y., Yora K., Terai Y., Yano R., 1979. Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses. *Japanese Journal of Phytopathology*, The Phytopathological Society of Japan 45: 497–502.
- Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A., 2008. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods* 149: 292–299. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.01.012>.
- Pacifico D., Caciagli P., Palmano S., Mannini F., Marzachi C., 2011. Quantitation of Grapevine leafroll associated virus-1 and -3, Grapevine virus A, Grapevine fanleaf virus and Grapevine fleck virus in field-collected *Vitis vinifera* L. „Nebbiolo“ by real-time reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, Elsevier B.V. 172: 1–7. DOI: 10.1016/j.jviromet.2010.12.002.
- Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks, 2008. *EPPO Bulletin* 38: 422–429. DOI: 10.1111/j.1365-2338.2008.01258.x.

- Peng C.-W., Peremyslov V. V., Mushegian A.R., Dawson W.O., Dolja V. V., 2001. Functional Specialization and Evolution of Leader Proteinases in the Family Closteroviridae. *Journal of Virology* 75: 12153–12160. DOI: 10.1128/jvi.75.24.12153-12160.2001.
- Pesqueira A.M., Cabaleiro C., Velasco L., 2016. Genetic analysis of Grapevine leafroll-associated virus 3 population from Galicia, Spain. *Plant Pathology* 65: 310–321. DOI: 10.1111/ppa.12413.
- Pietersen G., 2006. Spatio-temporal distribution dynamics of grapevine leafroll disease in Western Cape vineyards. U: *Extended abstracts of the 15th Meeting of the International Council for the Study of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine (ICVG)*, 3–7.
- Poljuha D., Sladonja B., Bubola M., 2010. Incidence of viruses infecting grapevine varieties in Istria (Croatia). *Journal of Food, Agriculture and Environment* 8: 166–169.
- Rizzo D., Materazzi A., Stefani L., Farina P., Vanarelli S., Panattoni A., Luvisi A., 2015. Distribution of regulated viruses in cv. Sangiovese vineyards in Tuscany. *Journal of Plant Pathology* 97: 333–337. DOI: 10.4454/jpp.v97i2.3382.
- Rohde A., Bhalerao R.P., 2007. Plant dormancy in the perennial context. *Trends in Plant Science* 12: 217–223. DOI: 10.1016/j.tplants.2007.03.012.
- Rowhani A., Daubert S., Arnold K., Al Rwahnih M., Klaassen V., Golino D., Uyemoto J.K., 2018. Synergy between grapevine vitiviruses and grapevine leafroll viruses. *European Journal of Plant Pathology*, *European Journal of Plant Pathology* 151: 919–925. DOI: 10.1007/s10658-018-1426-7.
- Rowhani A., Uyemoto J.K., Golino D.A., 1997. A comparison between serological and biological assays in detecting grapevine leafroll associated viruses. *Plant disease*, *Am Phytopath Society* 81: 799–801.
- Rubio L., Guerri J., Moreno P., 2013. Genetic variability and evolutionary dynamics of viruses of the family Closteroviridae. *Frontiers in Microbiology* 4: 1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00151.

- Sabanadzovic S., Aboughanem-Sabanadzovic N., Martelli G.P., 2017. Grapevine fleck and similar viruses. U: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*, Springer, 331–349.
- Saldarelli P., Giampetruzzi A., Morelli M., Malossini U., Pirolo C., Bianchedi P., Gualandri V., 2015. Genetic variability of Grapevine Pinot gris virus and its association with Grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology* 105: 555–563. DOI: 10.1094/PHYTO-09-14-0241-R.
- Šarić A., Corte A., 1959. Sintomatologia della degenerazione infetiva della vite in Istria. *Atti Ist. Bot. Lab. Crit. Univ. Pavia* 17: 3–8.
- Sharma A.M., Wang J., Duffy S., Zhang S., Wong M.K., Rashed A., Cooper M. L., Daane K. M., Almeida R.P.P., 2011. Occurrence of grapevine leafroll-associated virus complex in Napa Valley. *PLoS ONE* 6: 4–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0026227.
- Sokolsky T., Cohen Y., Zahavi T., Sapir G., Sharon R., 2013. Potential efficiency of grapevine leafroll disease management strategies using simulation and real spatio-temporal disease infection data. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Wiley Online Library 19: 431–438.
- Song Y., Hanner R.H., Meng B., 2021. Probing into the effects of grapevine leafroll-associated viruses on the physiology, fruit quality and gene expression of grapes. *Viruses*, MDPI 13: 593.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, Oxford University Press 28: 2731–2739.
- Tarhanen S., Holopainen T., Oksanen J., 1997. Ultrastructural changes and electrolyte leakage from ozone fumigated epiphytic lichens. *Annals of Botany* 80: 611–621. DOI: 10.1006/anbo.1997.0480.
- Thompson B.D., Dahan J., Lee J., Martin R.R., Karasev A. V, 2019. A novel genetic variant of Grapevine leafroll-associated virus-3 (GLRaV-3) from Idaho grapevines. *Plant disease*, Am Phytopath Society 103: 509–518.



- Thornton B., Basu C., 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and molecular biology education*, Wiley Online Library 39: 145–154.
- Tsai C.W., Chau J., Fernandez L., Bosco D., Daane K.M., Almeida R.P.P., 2008. Transmission of Grapevine leafroll-associated virus 3 by the Vine Mealybug (*Planococcus ficus*). *Phytopathology* 98: 1093–1098. DOI: 10.1094/PHTO-98-10-1093.
- Tsai C.W., Daugherty M.P., Almeida R.P.P., 2012. Seasonal dynamics and virus translocation of Grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. *Plant Pathology* 61: 977–985. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2011.02571.x.
- Turturo C., Saldarelli P., Yafeng D., Digiario M., Minafra A., Savino V., Martelli G.P., 2005. Genetic variability and population structure of Grapevine leafroll-associated virus 3 isolates. *Journal of General Virology* 86: 217–224. DOI: 10.1099/vir.0.80395-0.
- Van den Born E., Omelchenko M. V., Bekkelund A., Leihne V., Koonin E. V., Dolja V., Falnes P.O., 2008. Viral AlkB proteins repair RNA damage by oxidative demethylation. *Nucleic acids research* 36: 5451–5461. DOI: 10.1093/nar/gkn519.
- Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, BioMed Central 3: 1–12.
- Vea I.M., Grimaldi D.A., 2016. Putting scales into evolutionary time: the divergence of major scale insect lineages (Hemiptera) predates the radiation of modern angiosperm hosts. *Scientific Reports* 6: 23487. DOI: 10.1038/srep23487.
- Velasco L., Bota J., Montero R., Cretazzo E., 2014. Differences of three ampeloviruses' multiplication in plant may explain their incidences in vineyards. *Plant Disease* 98: 395–400. DOI: 10.1094/PDIS-04-13-0433-RE.
- Vinogradarski registar*, 2021. Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju. Dostupno na: <https://www.apprrr.hr/registri/>.
- Vončina D., Al Rwahnih M., Rowhani A., Gouran M., Almeida R.P.P., 2017. Viral diversity in autochthonous croatian grapevine cultivars. *Plant Disease* 101: 1230–1235. DOI: 10.1094/PDIS-10-16-1543-RE.

- Vončina D., Almeida R.P.P., 2018. Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals a multitude of viruses, including novel ones. *Archives of Virology*, Springer Vienna 163: 2239–2243. DOI: 10.1007/s00705-018-3850-6.
- Vončina D., Badurina D., Preiner D., Cvjetkovic B., Maletic E., Kontic J.K., 2011. Incidence of virus infections in grapevines from Croatian collection plantations. *Phytopathologia Mediterranea* 50: 316–326. DOI: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-8641.
- Vončina D., Grozić K., 2017. Virus pinota sivog – nova opasnost za vinograde ; Grapevine pinot gris virus – new threat for vineyards 17: 563-566.
- Vončina D., Preiner D., Šimon S., Cvjetković B., Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J., 2019. Distribution of nine viruses in croatian autochthonous grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from dalmatian region included in clonal selection. *Journal of Central European Agriculture* 20: 262–273. DOI: 10.5513/JCEA01/20.1.2008.
- Weber E., Golino D., Rowhani A., 2002. Laboratory testing for grapevine diseases. *Practical Winery and Vineyards* 1: 14–18.
- Zdunić G., Budić-Leto I., Tomić-Potrebuješ I., Pejić I., Maletić E., 2012. Primary study of viticultural and oenological characteristics of „Plavac Mali Sivi“ and its comparison with „Pošip“ and „Grk“ in the central dalmatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 77: 11–14.
- Zdunić G., Maletić E., Vokurka A., Karoglan Kontić J., Pezo I., Pejić I., 2007. Phenotypical, sanitary and ampelometric variability within the population of cv. Plavac Mali (*Vitis vinifera* L.). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 72: 117–128.
- Zdunić G., Preece J.E., Dangl G.S., Koehmstedt A., Mucalo A., Maletić E., Pejić I., 2013. Genetic characterization of grapevine cultivars collected throughout the Dalmatian region. *American Journal of Enology and Viticulture* 64: 285–290. DOI: 10.5344/ajev.2012.12085.
- Zherdev A. V, Vinogradova S. V, Byzova N.A., Porotikova E. V, Kamionskaya A.M., Dzantiev B.B., 2018. Methods for the Diagnosis of Grapevine Viral Infections : A Review. *Agriculture* 8: 1–19. DOI: 10.3390/agriculture8120195.

Zindović J., Viršček Marn M., Mavrič Pleško I., 2014. Phytosanitary status of grapevine in Montenegro. *EPPO Bulletin* 44: 60–64. DOI: 10.1111/epp.12084.

## 8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: **Mate Čarija**

Datum rođenja: 13.08.1994.

Matični broj istraživača: 374924

Kontakt podaci: E-mail: [Mate.Carija@krs.hr](mailto:Mate.Carija@krs.hr)

### **OBRAZOVANJE:**

- 2009. – 2013. - III gimnazija Split, srednjoškolsko obrazovanje
- 2013. – 2016. - Univ.bacc.ing.agr., Preddiplomski studij Hortikultura, Agronomski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 2016. – 2019. - Mag.ing.agr., Diplomski studij Vinogradarstvo i vinarstvo, Agronomski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- 2019. – 2023. - Poslijediplomski doktorski studij Biologija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu

### **ZAPOSLENJE:**

- 2019 – danas - Institut za jadranske kulture i melioraciju krša, Split, asistent

### **ZNANSTVEVNA AKTIVNOST:**

- 2020 - : „Procjena tolerantnosti hrvatske germplazme vinove loze na sušu“, 2020.-2023., suradnik na projektu
- 2019 - 2022: „Patogeni potencijal Virusa uvijenosti lista vinove loze 3 i njegova interakcija s domaćinskim biljkama“, HRZZ, suradnik na projektu
- 2019, 2021 : „Noć istraživača“, Horizon 2020, MZO, suradnik na projektu

### **STIPENDIJE I USAVRŠAVANJA:**

- 2022. - pohađanje radionice „Molecular Phylogeny and Evolution“ u organizaciji Sveučilišta u Mainzu, Savezna Republika Njemačka (pet dana)
- 2019., 2021. i 2022. - usavršavanja na Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (četiri tjedna)
- 2019. - usavršavanje u Institutu za održivu biljnu zaštitu u Bariju, Italija (dva tjedna)
- 2018. – stipendija Vlade Francuske Republike u I.N.R.A. Montpellier, Republika Francuska (jedan mjesec)
- 2018. – stažiranje na imanju *Chateau Yvonne* u organizaciji ESA Angers, Republika Francuska (jedan mjesec)

**STRANI JEZICI:** engleski, francuski i talijanski

## ZNANSTVENE PUBLIKACIJE

### POPIS ZNANSTVENIH ČLANAKA:

1. Hančević K, **Čarija M**, Radić Brkanac S, Gaši E, Likar M, Zdunić G, Regvar M, Radić T. (2023) Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 in Single and Mixed Infections Triggers Changes in the Oxidative Balance of Four Grapevine Varieties // International Journal of Molecular Sciences, 24, 1; 8, 17 doi:10.3390/ijms24010008 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
2. **Čarija M**, Černi S, Stupin-Polančec D, Radić T, Gaši E, Hančević, K. (2022) Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 Replication in Grapevine Hosts Changes through the Dormancy Stage. // Plants, 11, 23; 3250, 16 doi:10.3390/plants11233250 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
3. Hančević K, **Čarija M**, Radić T, Černi S, Radić Brkanac S, Gaši E, Mucalo A, Likar M, Zdunić G, Regvar M, Saldarelli P. Suživot vinove loze i virusa uvijenosti lista vinove loze 3 u Hrvatskoj // 57th Croatian & 17th International Symposium on Agriculture eProceedings Vodice, Hrvatska: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, 2022. str. 1-9 (međunarodna recenzija, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni).
4. **Čarija M**, Radić T, Černi S, Mucalo A, Zdunić G, Vončina D, Jagunić M, Hančević K. (2022) Prevalence of Virus Infections and GLRaV-3 Genetic Diversity in Selected Clones of Croatian Indigenous Grapevine Cultivar Plavac Mali. Pathogens, 11 (2), 176, 14 doi:10.3390/pathogens11020176. (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
5. Hančević K, Saldarelli P, **Čarija M**, Černi S, Zdunić G, Mucalo A, Radić T (2021) Predominance and Diversity of GLRaV-3 in Native Vines of Mediterranean Croatia. Plants, 10 (2021), 1; 17, 14. doi:10.3390/plants10010017 (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)
6. Radić T, Likar M, Hančević K, Regvar M, **Čarija M**, Zdunić G (2021) Dataset on endophytic and rhizoplane fungi on the roots of wild grapevine in Croatia and Bosnia and Herzegovina. Data in brief, 34. (međunarodna recenzija, ostalo, znanstveni)
7. Radić T, Likar M, Hančević K, Regvar M, **Čarija M**, Zdunić G (2021) Root-associated community composition and co- occurrence patterns of fungi in wild grapevine. Fungal Ecology, 50 (2021), 101034, 11. (međunarodna recenzija, članak, znanstveni)

### SUDJELOVANJE NA ZNANSTVENIM SKUPOVIMA:

1. **Čarija M**, Černi S, Radić T, Gaši E, Hančević K. „Relative expression dynamics of GFkV, GVA and GPGV in grapevine host plants.” International Conference on Biodiversity and Molecular Plant Breeding (02.-06.10.2022.). Novigrad, Hrvatska (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

2. Hančević K, **Čarija M**, Radić T, Radić Brkanac S, Gaši E, Likar M, Mucalo A, Zdunić G, Regvar M. „The biological response of different grapevine varieties to virus infection.” International Advances in Plant Virology 2022 (05.-07.2022.) Ljubljana, Slovenija (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
3. Radić Brkanac S, Gaši E, **Čarija M**, Radić T, Hančević K. „Influence of grapevine leafroll-associated virus 3 on physiological indicators in grapevine.”// “Plants in Changing Environment” International Conference of the Slovenian Society of Plant Biology (15.-16.09.2022.) Ljubljana, Slovenija (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
4. **Čarija M**, Černi S, Radić T, Gaši E, Hančević K. „Influence of grapevine phenological stage and virus inoculum composition on the replication of GLRaV-3.”// FEMS Conference on Microbiology (30.06.-02.07.2022.) Beograd, Srbija, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)
5. Hančević K, **Čarija M**, Radić T, Černi S, Radić Brkanac S, Gaši E, Mucalo A, Likar M, Zdunić G, Regvar M, Saldarelli P. „Suživot vinove loze i virusa uvijenosti lista vinove loze 3 u Hrvatskoj” // 57th hrvatski & 17th međunarodni simpozij agronoma (19.-24.06.2022.) Vodice, Hrvatska (plenarno, međunarodna recenzija, cjeloviti rad (in extenso), znanstveni)
6. **Čarija M**, Radić T, Mucalo A, Zdunić G, Hančević K. „ Pojavnost virusa u autohtonim dalmatinskim sortama vinove loze". // 56. hrvatski i 16. međunarodni simpozij agronoma (5.-10.09.2021) Vodice, Hrvatska (usmeno izlaganje, međunarodna recenzija, sažetak znanstveni)
7. Hančević K, Saldarelli P, **Čarija M**, Černi S, Zdunić G, Mucalo A, Radić T, „GLRaV-3 Genetic Variants in Indigenous Vines of Mediterranean Croatia", World Microbe Forum (20.-24.06.2021) Online kongres (poster, međunarodna recenzija, sažetak znanstveni).
8. **Čarija M**, Radić T, Černi S, Mucalo A, Zdunić G, Hančević K. „Screening for grapevine viruses and GLRaV-3 genetic diversity in the most appreciated Croatian red indigenous cultivar Plavac Mali” // International Advances In Plant Virology 2021 (20.-22.04.2022.) Online kongres, (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

## PRILOZI

**Prilog 1.** Pojavnost deset virusa vinove loze u 16 autohtonih dalmatinskih sorti iz kolekcijskog nasada Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša s navedenim vinorodnim područjima odakle su introducirani u kolekcijski nasad testiranih molekularnim metodama (mol) i ELISA testom (ELISA).

Vinorodno područje	Sorta	Virus	GLRaV-1*		GLRaV-2		GLRaV-3		GVA		GVB		GFLV		ArMV		GFkV		GPGV	GRSPaV
		Broj uzorka	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	mol
Korčula	'Rukatac'	1					+	+	+	+									+	+
	'Rukatac'	3					+	+	+	+										
	'Rukatac'	4					+	+	+	+										
	'Rukatac'	6	+	+			+	+	+	+										+
	'Rukatac'	8	+	+			+	+	+	+									+	
Primošten	'Babić'	1			+		+	+	+	+							+	+	+	+
	'Babić'	2			+		+	+	+	+							+	+	+	+
	'Babić'	4			+	+	+	+	+	+							+	+	+	+
	'Babić'	5			+		+	+	+	+							+	+	+	+
	'Babić'	6			+	+	+	+	+	+							+	+	+	+
Šolta	'Dobričić'	6	+	+			+	+	+	+										+
	'Dobričić'	7	+	+			+	+	+	+										+
	'Dobričić'	8	+	+			+	+	+	+									+	+
	'Dobričić'	9	+	+			+	+	+	+									+	+
	'Dobričić'	10	+	+			+	+	+	+									+	+
Kaštela	'Glavinuša'	1					+	+	+	+									+	+
	'Glavinuša'	2					+	+	+	+									+	+
	'Glavinuša'	5					+	+	+	+									+	+
	'Glavinuša'	7					+	+	+	+									+	
	'Glavinuša'	8					+	+	+	+									+	+

\*Značenje kratica za nazive virusa je kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke, GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze, GPGV - virus sivog pinota i GRSPaV - virus naboranosti drva podloge *Rupestris du Lot*

Prilog 1. nastavak

Vinorodno područje	Sorta	Virus	GLRaV-1*		GLRaV-2		GLRaV-3		GVA		GVB		GFLV		ArMV		GFkV		GPGV	GRSPaV
		Broj uzorka	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	mol
Konavle	'Malvasija'	2	+	+			+	+	+	+	+	+							+	+
	'Malvasija'	4	+	+			+	+	+	+	+	+								+
	'Malvasija'	6	+	+			+	+	+	+	+	+							+	+
	'Malvasija'	10	+	+			+	+	+	+	+	+							+	
Korčula	'Pošip Crni'	1	+	+			+	+											+	+
	'Pošip Crni'	4	+	+			+	+											+	+
	'Pošip Crni'	5	+	+																+
	'Pošip Crni'	6	+	+															+	+
	'Pošip Crni'	7	+	+																+
Kaštela	'Crljenak'	092-1					+	+	+	+			+		+		+			+
	'Crljenak'	093-2					+	+	+	+									+	+
	'Crljenak'	093-1					+	+	+	+									+	+
	'Crljenak'	092-4					+	+	+	+			+						+	+
	'Crljenak'	094-1	+	+			+	+	+	+									+	+
Vis	'Vugava'	1	+	+			+	+	+	+			+	+					+	+
	'Vugava'	5	+	+			+	+	+	+			+	+						
	'Vugava'	6	+	+			+	+	+	+			+	+						+
	'Vugava'	7	+	+			+	+	+	+			+	+			+	+	+	+

\*Značenje kratica za nazive virusa je kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke, GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze, GPGV - virus sivog pinota i GRSPaV - virus naboranosti drva podloge Rupestris du Lot



Prilog 1. nastavak

Vinorodno područje	Sorta	Virus	GLRaV-1*		GLRaV-2		GLRaV-3		GVA		GVB		GFLV		ArMV		GFkV		GPGV	GRSPaV
		Broj uzorka	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	ELISA	mol	mol	mol	mol
Kaštela	'Babica Crna'	1					+	+	+	+	+	+					+	+		+
	'Babica Crna'	2					+	+	+	+	+	+					+	+		+
	'Babica Crna'	3					+	+	+	+	+	+					+	+	+	+
	'Babica Crna'	5					+	+	+	+	+	+					+	+	+	+
	'Babica Crna'	7					+	+	+	+	+	+					+	+		+
Vis	'Plavac Mali'	217/1					+	+												
	'Plavac Mali'	217/2					+	+												
	'Plavac Mali'	217/3					+	+											+	
	'Plavac Mali'	217/4					+	+	+											+
	'Plavac mali'	217/5					+	+					+						+	+
Korčula	'Pošip Bijeli'	1	+	+			+	+	+	+									+	+
	'Pošip Bijeli'	2	+	+			+	+	+	+									+	+
	'Pošip Bijeli'	3	+	+			+	+	+	+									+	+
	'Pošip Bijeli'	4	+	+			+	+	+	+										+
	'Pošip Bijeli'	5	+	+			+	+	+	+									+	+
Vrgorac	'Zlatica Vrgorska'	1					+	+	+	+										
	'Zlatica Vrgorska'	2					+	+	+	+									+	+
	'Zlatica Vrgorska'	3					+	+	+	+										+
	'Zlatica Vrgorska'	4					+	+	+	+										+
	'Zlatica Vrgorska'	5					+	+	+	+									+	+

\*Značenje kratica za nazive virusa je kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke, GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze, GPGV - virus sivog pinota i GRSPaV - virus naboranosti drva podloge Rupestris du Lot

**Prilog 1. nastavak**

Vinorodn o područje	Sorta	Virus Broj uzorka	GLRaV-1*		GLRaV-2		GLRaV-3		GVA		GVB		GFLV		ArMV		GFkV		GPG V	GRSPa V
			mo I	ELIS A	mo I	ELIS A	mo I	ELIS A	mo I	ELIS A	mo I	ELIS A	mo I	ELIS A	mo I	ELIS A	mo I	ELIS A	mol	mol
Korčula	'Grk'	1					+	+												+
	'Grk'	4					+	+											+	+
	'Grk'	8					+	+											+	+
	'Grk'	10					+	+											+	+
Hvar	'Prč'	4					+	+	+	+										+
	'Prč'	5	+	+			+	+	+	+										
	'Prč'	6					+	+	+	+										+
	'Prč'	7					+	+	+	+										
	'Prč'	8	+	+			+	+	+	+										
Imotski	'Kujundūša'	3			+	+	+	+	+	+									+	+
	'Kujundūša'	4					+	+	+	+									+	+
Drniš	'Plavina'	1		nt**		nt	+	nt	+	nt		nt		nt		nt		nt	+	+
	'Plavina'	3		nt		nt		nt		nt		nt		nt		nt		nt	+	+

\*Značenje kratica za nazive virusa je kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke, GFkV - virus pjegavosti lista vinove loze, GPGV - virus sivog pinota i GRSPaV - virus naboranosti drva podloge Rupestris du Lot

\*\*nt – na uzorku nije proveden ELISA test za pojedini virus

**Prilog 2.** Pojavnost deset virusa vinove loze u klonskim kandidatima sorte 'Plavac Mali' iz kolekcijskog nasada Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša s navedenim vinorodnim područjima odakle su introducirani u kolekcijski nasad testirani molekularnim metodama.

Vinorodno područje	Oznaka klona	GLRaV-1*	GLRaV-2	GLRaV-3	GVA	GVB	GFLV	ArMV	GfKV	GRSPaV	GPGV
Šolta	004/3	+	+			+				+	
Čiovo	008/1		+	+	+					+	
Hvar	010/1	+		+	+		+				
	020/1			+	+		+	+	+		
	020/2			+	+		+	+	+		
	026/1	+		+	+						+
	026/3	+		+	+						
	027/3				+					+	
	027/4			+	+					+	
Zemunik	036/1		+	+	+					+	+
	036/3		+	+	+						
Svinišće	041/1		+	+	+						+
Labin	043/1	+	+	+		+				+	+
Pelješac	056/1	+			+						
	059/3	+		+	+		+			+	
Korčula	091/1			+	+						+
	095/1								+		+
	096/4	+		+	+		+				
	096/5	+								+	
Vrgorac	202/3			+	+				+		
Vis	210/1	+		+	+			+			
	210/5			+	+						
	214/1			+	+			+	+		+
	214/2			+	+			+	+		+
	215/1			+	+			+			+
	215/3		+	+	+			+			+
	217/1			+							
	217/2			+							
Vis	217/3			+							+
	217/4			+	+					+	
	217/5			+			+			+	+
Kaštela	225/3		+	+	+				+	+	
Brač	268/1	+		+	+			+		+	
	268/2	+		+	+						
Trogir	TG	+		+	+					+	

\*Značenje kratica za nazive virusa je kako slijedi: GLRaV-1 - virus uvijenosti lista vinove loze 1, GLRaV-2 - virus uvijenosti lista vinove loze 2, GLRaV-3 - virus uvijenosti lista vinove loze 3, GVA - virus vinove loze A, GVB - virus vinove loze B, GFLV - virus lepezastosti lista vinove loze, ArMV - virus mozaika gušarke, GfKV - virus pjegavosti lista vinove loze, GPGV - virus sivog pinota i GRSPaV - virus naboranosti drva podloge Rupestris du Lot

**Prilog 3.** SSCP profili razdvojenih genomskih varijanti regije HSP70h GLRaV-3 iz uzoraka 16 autohtonih dalmatinskih sorti. Za navedene profile je određen i nukleotidni slijed te je navedena i pripadnost filogenijskoj skupini. Iste oznake za SSCP profile između sorti nisu usporedive jer su određivane za svaku sortu zasebno.

Sorta	Uzorak	SSCP profil	Pripadnost filogenijskoj skupini
'Grk'	Grk 1_17	A	II
	Grk 1_8	A	II
	Grk 1_4	A	II
	Grk 1_19	A	II
	Grk 1_10	B	II
	Grk 1_21	A	II
	Grk 1_15	A	II
	Grk 1_14	A	II
	Grk 4_5	A	II
'Plavac Mali'	217/1_32	E	II
	217/1_35	F	II
	217/1_15	C	II
	217/1_38	A	II
	217/1_14	B	II
	217/1_18	D	II
	217/1_31	A	II
	217/2_17	C	II
	217/2_18	C	II
	217/2_3	B	II
	217/2_2	A	II
	217/2_5	A	II
	217/2_37	C	II
	217/3_8	B	II
	217/3_11	C	II
	217/3_10	A	II
	217/3_17	A	II
	217/3_5	A	II
'Babica Crna'	BC1_9	A1	I
	BC1_10	D	I
	BC1_13	A2	I
	BC1_25	E	II
	BC3_19	C	I
	BC3_24	D	I
	BC3_29	E	II

**Prilog 3. nastavak**

Sorta	Uzorak	SSCP profil	Pripadnost filogenijskoj skupini
'Malvasija Dubrovačka'	Mal_D_2_22	B	I
	Mal_D_2_32	C	I
	Mal_D_2_15	B	II
	Mal_D_4_11	A	I
	Mal_D_4_18	A	I
	Mal_D_6_3	A1	I
	Mal_D_6_4	A	I
	Mal_D_6_9	B	II
	Mal_D_6_7	B1	II
	Mal_D_6_10	B	II
	Mal_D_6_15	C	II
'Rukatac'	Ruk4_19	A	II
	Ruk4_8	A	II
	Ruk4_7	A	II
	Ruk6_20	A	II
'Babić'	Bab5_14	C	I
	Bab5_36	B	I
	Bab5_4	A	II
	Bab5_13	A	II
	Bab6_1	A	I
	Bab6_6	B	I
	Bab6_5	B	I
	Bab6_12	C	II
	Bab6_2	A	II
	Bab6_13	B	II
Bab6_22	B	II	
'Vugava'	Vu5_3	B	II
	Vu5_5	B	II
	Vu5_1	A	II
	Vu5_2	A	II
	Vu6_3	A	II
	Vu6_6	B	II
	Vu6_9	A	II
	Vu6_20	C	II
	Vu6_12	B	II
	Vu7_5	C	I
	Vu7_6R	C	I
	Vu7_4	A	II
	Vu7_3	A	II
	Vu7_8	A	II

**Prilog 3. nastavak**

<b>Sorta</b>	<b>Uzorak</b>	<b>SSCP profil</b>	<b>Pripadnost filogenijskoj skupini</b>
'Glavinuša'	Gla_1_1	A	II
	Gla_1_33	D	II
	Gla_5_7	A	II
'Dobričić'	Dob_6_1M	A	II
	Dob_6_5T	B	II
	Dob_6_26T	A	II
	Dob_6_4M	A	II
	Dob_6_12T	C	II
	Dob_6_9T	A	II
	Dob_7_7	B	II
	Dob_7_8	A	II
'Pošip Bijeli'	Poš_B_1_4	B	I
	Poš_B_1_2	A	I
	Poš_B_5_4	B	I
	Poš_B_5_5	B	I
	Poš_B_5_1	A	I
	Poš_B_5_12	D	I
	Poš_B_5_7	C	I
'Crljenak Kaštelanski'	CK_093/2_14	A	I
	CK_093/2_13R	A	I
	CK_092/4_1	A	I
	CK_092/4_8	B	I
	CK_092/4_18	C	II
	CK_092/4_9	C	II
'Zlatica Vrgorska'	ZV_2_26	A1	II
	ZV_2_9	A	II
	ZV_2_20	A	II
	ZV_3_26	A	II
	ZV_3_48	A	II
	ZV_3_54	A1	II
'Prč'	Prc_5_12	A1	I
	Prc_5_10	A	I
	Prc_5_6	A	I
	Prc_6_1	A	I
	Prc_6_12	A	I
	Prc_6_3	B	II
	Prc_6_4	B	II

**Prilog 3. nastavak**

Sorta	Uzorak	SSCP profil	Pripadnost filogenijskoj skupini
'Kujundūša'	K4_1	A	II
	K4_9R	A	II
	K3_8	A	II
	K3_7	A	II
'Plavina'	PLA1_3	A	I
	PLA1_21	A1	I
	PLA1_25	A	I
	PLA1_4	A1	I
'Pošip Crni'	PC4_1N	A	I
	PC4_14N	A1	I
	PC4_8N	A1	I
	PC4_9N	A	I
	Poš_C_4_16	A	I
	Poš_C_4_17	A	I

**Prilog 4.** SSCP profili razdvojenih genomskih varijanti regije HSP70h GLRaV-3 iz odabranih klonova sorte 'Plavac Mali'. Za navedene profile je određen i nukleotidni slijed te je navedena i pripadnost filogenijskoj skupini. Iste oznake za SSCP profile između sorti nisu usporedive jer su određivane za svaku sortu zasebno.

Klonski kandidat	Uzorak	Profil	Pripadnost filogenijskoj skupini
020/1	020/1_1	A	II
	020/1_6	A	II
214/1	214/1_1	A	I
	214/1_15	A1	I
	214/1_6	A	I
	214/1_7	B	I
	214/1_11	A	I
036/1	036/1_3	B	II
	036/1_7	A	II
	036/1_14	A	II
096/4	096/4_25	B	I
	096/4_21	B	I
	096/4_22	A	II
268/1	268/1_9	A	II
	268/1_1	A	II
202/3	202/3_8	B	I
	202/3_1	A	II
	202/3_10	A	II
041/1	041/1_30	A	II
	041/1_6	A	II
225/3	225/3_17	B	II
	225/3_2	A	II
008/4	008/4_16	A	II
	008/4_26R	A	II



**Prilog 5. Rezultati relativne kvantifikacije virusa vinove loze**

A. Dobivene Ct vrijednosti za domaćinske gene stabilne ekspresije i izračun geometrijske sredine aktina i tubulina u tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije). Navedene su i Ct vrijednosti kandidata za domaćinskog gena stabilne ekspresije GAPDH koji je isključen iz daljnjih izračuna.

Prvi termin uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije)				nije korišten u izračunima	Drugi termin uzorkovanja (osam mjeseci nakon inokulacije)				Treći termin uzorkovanja (16 mjeseci nakon inokulacije)			
uzorak	Aktin (Ct)	Tubulin (Ct)	geometrijska sredina	GAPDH (Ct)	uzorak	Aktin (Ct)	Tubulin (Ct)	geometrijska sredina	uzorak	Aktin (Ct)	Tubulin (Ct)	geometrijska sredina
II-TR	21.84	23.98	22.88	21.53	II-TR	20.38	23.47	21.87	II-TR	24.42	27.76	26.04
X-TR	22.16	24.43	23.27	20.94	X-TR	20.42	23.89	22.08	X-TR	26.70	29.42	28.03
Y-TR	20.38	22.89	21.60	20.53	Y-TR	20.29	23.56	21.86	Y-TR	22.21	25.28	23.70
Z-TR	22.69	25.31	23.96	22.72	Z-TR	20.23	23.11	21.63	Z-TR	21.15	24.10	22.57
Q-TR	20.65	23.47	22.02	20.62	Q-TR	19.36	22.86	21.04	Q-TR	27.43	29.29	28.35
II-CF	22.65	25.14	23.86	22.14	II-CF	21.16	24.40	22.72	II-CF	29.48	31.03	30.25
X-CF	20.80	23.15	21.94	20.28	X-CF	20.29	24.06	22.10	X-CF	22.31	24.99	23.61
Y-CF	21.91	24.10	22.98	23.60	Y-CF	23.18	25.51	24.32	Y-CF	23.60	26.14	24.84
Q-CF	22.20	24.41	23.28	20.77	Q-CF	20.50	22.07	21.27	Q-CF	23.32	25.44	24.36
II-M	27.11	28.24	27.66	26.26	II-M	20.86	23.98	22.37	II-M	21.36	25.21	23.21
X-M	26.01	27.56	26.77	20.25	X-M	19.86	23.44	21.57	X-M	21.93	25.59	23.69
Y-M	26.18	27.82	26.99	26.51	Y-M	21.27	24.28	22.72	Y-M	22.14	25.99	23.99
Z-M	27.62	29.36	28.48	26.48	Z-M	21.38	24.55	22.91	Z-M	20.19	23.63	21.84
Q-M	26.55	27.81	27.17	22.70	Q-M	21.29	23.27	22.26	Q-M	21.08	24.06	22.52
II-PN	28.61	30.76	29.66	28.33	II-PN	20.48	23.35	21.87	II-PN	23.51	26.78	25.09
X-PN	24.91	27.01	25.94	24.86	X-PN	21.38	24.45	22.86	X-PN	25.02	28.79	26.84
Y-PN	27.20	29.28	28.22	28.29	Y-PN	20.35	23.16	21.71	Y-PN	24.76	27.83	26.25
Z-PN	26.21	28.15	27.16	25.72	Z-PN	19.82	22.53	21.13	Z-PN	21.74	24.45	23.05
Q-PN	25.38	26.99	26.18	20.76	Q-PN	19.42	21.26	20.32	Q-PN	21.54	24.30	22.88

B. Dobivene Ct vrijednosti za dvije genomske regije GLRaV-3 (ORF1a i CP) u tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) i izračun njihove relativne koncentracije (log fold change).

Prvi termin uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije)						Drugi termin uzorkovanja (osam mjeseci nakon inokulacije)						Treći termin uzorkovanja (16 mjeseci nakon inokulacije)					
uzorak	HKG*	GLRaV-3_ORF1a (Ct)	GLRaV-3_CP (Ct)	log fold change (ORF1a)	log fold change (CP)	uzorak	HKG	GLRaV-3_ORF1a (Ct)	GLRaV-3_CP (Ct)	log fold change (ORF1a)	log fold change (CP)	uzorak	HKG	GLRaV-3_ORF1a (Ct)	GLRaV-3_CP (Ct)	log fold change (ORF1a)	log fold change (CP)
II-TR	22.88	20.10	20.03	2.78	2.85	II-TR	21.87	21.21	21.69	0.66	0.18	II-TR	26.04	22.13	22.16	3.91	3.88
X-TR	23.27	19.51	19.15	3.76	4.12	X-TR	22.08	21.34	21.95	0.75	0.13	X-TR	28.03	25.62	25.99	2.41	2.04
Y-TR	21.60	19.77	19.78	1.83	1.81	Y-TR	21.86	20.75	21.18	1.11	0.68	Y-TR	23.70	22.66	22.81	1.03	0.88
Z-TR	23.96	21.66	22.08	2.31	1.88	Z-TR	21.63	20.06	20.75	1.56	0.88	Z-TR	22.57	21.77	21.84	0.81	0.73
Q-TR	22.02	19.54	19.56	2.48	2.46	Q-TR	21.04	19.13	20.10	1.91	0.94	Q-TR	28.35	25.33	25.08	3.02	3.26
II-CF	23.86	21.51	21.05	2.35	2.82	II-CF	22.72	24.85	24.63	-2.13	-1.91	II-CF	30.25	27.91	28.22	2.34	2.02
X-CF	21.94	20.13	19.67	1.81	2.28	X-CF	22.10	21.36	21.80	0.74	0.30	X-CF	23.61	22.07	22.06	1.54	1.55
Y-CF	22.98	23.30	22.38	-0.32	0.59	Y-CF	24.32	24.65	24.99	-0.33	-0.67	Y-CF	24.84	24.79	25.00	0.05	-0.16
Q-CF	23.28	20.69	20.66	2.59	2.61	Q-CF	21.27	25.27	25.77	-4.00	-4.50	Q-CF	24.36	21.48	21.47	2.88	2.89
II-M	27.66	22.27	22.08	5.40	5.59	II-M	22.37	21.96	22.05	0.41	0.31	II-M	23.21	21.06	21.56	2.15	1.65
X-M	26.77	19.80	19.56	6.97	7.22	X-M	21.57	20.25	20.45	1.32	1.13	X-M	23.69	23.81	24.02	-0.12	-0.33
Y-M	26.99	21.48	21.05	5.51	5.94	Y-M	22.72	20.88	21.17	1.84	1.55	Y-M	23.99	23.19	23.31	0.80	0.68
Z-M	28.48	19.49	19.67	8.98	8.81	Z-M	22.91	21.44	21.78	1.47	1.13	Z-M	21.84	21.71	21.69	0.14	0.15
Q-M	27.17	22.29	22.38	4.88	4.79	Q-M	22.26	20.60	20.80	1.66	1.46	Q-M	22.52	21.04	21.17	1.48	1.35
II-PN	29.66	27.95	27.45	1.71	2.21	II-PN	21.87	22.07	22.19	-0.20	-0.32	II-PN	25.09	22.18	22.15	2.92	2.95
X-PN	25.94	23.56	23.77	2.38	2.17	X-PN	22.86	23.50	24.06	-0.64	-1.19	X-PN	26.84	27.98	28.02	-1.14	-1.18
Y-PN	28.22	27.99	26.63	0.23	1.59	Y-PN	21.71	19.32	19.67	2.39	2.04	Y-PN	26.25	24.58	24.08	1.66	2.17
Z-PN	27.16	26.19	26.11	0.97	1.06	Z-PN	21.13	20.29	20.39	0.84	0.74	Z-PN	23.05	22.06	22.32	0.99	0.73
Q-PN	26.18	20.08	20.23	6.10	5.95	Q-PN	20.32	19.82	20.02	0.50	0.30	Q-PN	22.88	22.41	22.35	0.47	0.53

\*HKG – vrijednost geometrijske sredine domaćinskih gena stabilne ekspresije u pojedinom terminu uzorkovanja

C. Dobivene Ct vrijednosti za CP genomsku regiju virusa vinove loze A (GVA) u tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) i izračun njegove relativne koncentracije (log fold change).

Prvi termin uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije)				Drugi termin uzorkovanja (osam mjeseci nakon inokulacije)				Treći termin uzorkovanja (16 mjeseci nakon inokulacije)			
uzorak	HKG*	GVA (Ct)	log fold change (GVA)	uzorak	HKG	GVA (Ct)	log fold change (GVA)	uzorak	HKG	GVA (Ct)	log fold change (GVA)
X-TR	23.27	20.89	2.38	X-TR	22.08	23.74	-1.66	X-TR	28.03	29.17	-1.14
Y-TR	21.60	32.05	-10.45	Y-TR	21.86	32.99	-11.13	Y-TR	23.70	42.89	-19.20
Z-TR	23.96	21.38	2.58	Z-TR	21.63	21.80	-0.17	Z-TR	22.57	24.08	-1.51
Q-TR	22.02	22.49	-0.47	Q-TR	21.04	22.96	-1.93	Q-TR	28.35	27.41	0.94
X-CF	21.94	21.67	0.27	X-CF	22.10	23.67	-1.57	X-CF	23.61	23.13	0.48
Y-CF	22.98	40.33	-17.36	Y-CF	24.32	30.67	-6.35	Y-CF	24.84	39.32	-14.48
Q-CF	23.28	23.78	-0.50	Q-CF	21.27	23.21	-1.94	Q-CF	24.36	25.08	-0.72
X-M	26.77	21.92	4.85	X-M	21.57	21.14	0.43	X-M	23.69	23.55	0.14
Y-M	26.99	43.01	-16.03	Y-M	22.72	43.60	-20.87	Y-M	23.99	42.43	-18.43
Z-M	28.48	22.95	5.53	Z-M	22.91	23.93	-1.02	Z-M	21.84	23.15	-1.30
Q-M	27.17	24.12	3.05	Q-M	22.26	24.17	-1.91	Q-M	22.52	25.00	-2.48
X-PN	25.94	26.08	-0.14	X-PN	22.86	24.50	-1.63	X-PN	26.84	33.49	-6.65
Y-PN	28.22	38.50	-10.28	Y-PN	21.71	34.68	-12.97	Y-PN	26.25	44.08	-17.83
Z-PN	27.16	26.21	0.95	Z-PN	21.13	22.83	-1.70	Z-PN	23.05	25.55	-2.49
Q-PN	26.18	22.65	3.53	Q-PN	20.32	22.08	-1.77	Q-PN	22.88	25.25	-2.37

\*HKG – vrijednost geometrijske sredine domaćinskih gena stabilne ekspresije u pojedinom terminu uzorkovanja

D. Dobivene Ct vrijednosti za CP genomsku regiju virusa jamičavosti podloge Rupestris du lot (GRSPaV) u tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) i izračun njegove relativne koncentracije (log fold change).

Prvi termin uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije)				Drugi termin uzorkovanja (osam mjeseci nakon inokulacije)				Treći termin uzorkovanja (16 mjeseci nakon inokulacije)			
uzorak	HKG*	GRSPaV (Ct)	log fold change (GRSPaV)	uzorak	HKG	GRSPaV (Ct)	log fold change (GRSPaV)	uzorak	HKG	GRSPaV (Ct)	log fold change (GRSPaV)
X-TR	23.27	23.59	-0.32	X-TR	22.08	23.20	-1.12	X-TR	28.03	26.15	1.88
Y-TR	21.60	23.51	-1.91	Y-TR	21.86	23.17	-1.30	Y-TR	23.70	23.03	0.66
Q-TR	22.02	23.23	-1.21	Q-TR	21.04	22.48	-1.44	Q-TR	28.35	25.03	3.32
X-CF	21.94	21.20	0.74	X-CF	22.10	22.99	-0.89	X-CF	23.61	23.03	0.58
Y-CF	22.98	27.01	-4.03	Y-CF	24.32	24.94	-0.62	Y-CF	24.84	25.14	-0.30
Q-CF	23.28	23.21	0.07	Q-CF	21.27	22.50	-1.23	Q-CF	24.36	23.72	0.64
X-M	26.77	23.48	3.29	X-M	21.57	21.34	0.24	X-M	23.69	23.52	0.17
Y-M	26.99	27.66	-0.67	Y-M	22.72	21.90	0.82	Y-M	23.99	23.68	0.31
Q-M	27.17	23.68	3.49	Q-M	22.26	23.21	-0.95	Q-M	22.52	22.93	-0.41
X-PN	25.94	24.18	1.76	X-PN	22.86	24.21	-1.35	X-PN	26.84	25.19	1.65
Y-PN	28.22	28.22	0.00	Y-PN	21.71	22.35	-0.64	Y-PN	26.25	24.06	2.18
Q-PN	26.18	22.64	3.54	Q-PN	20.32	30.37	-10.05	Q-PN	22.88	23.30	-0.42

\*HKG – vrijednost geometrijske sredine domaćinskih gena stabilne ekspresije u pojedinom terminu uzorkovanja

E. Dobivene Ct vrijednosti za CP genomsku regiju virusa sivog pinota (GPGV) u tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) i izračun njegove relativne koncentracije (log fold change).

Prvi termin uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije)				Drugi termin uzorkovanja (osam mjeseci nakon inokulacije)				Treći termin uzorkovanja (16 mjeseci nakon inokulacije)			
uzorak	HKG*	GPGV (Ct)	log fold change (GPGV)	uzorak	HKG	GPGV (Ct)	log fold change (GPGV)	uzorak	HKG	GPGV (Ct)	log fold change (GPGV)
X-TR	23.27	22.83	0.44	X-TR	22.08	25.51	-3.43	X-TR	28.03	30.99	-2.96
Y-TR	21.60	23.32	-1.72	Y-TR	21.86	25.10	-3.24	Y-TR	23.70	24.26	-0.57
Q-TR	22.02	25.87	-3.86	Q-TR	21.04	25.57	-4.53	Q-TR	28.35	30.98	-2.64
X-CF	21.94	21.81	0.13	X-CF	22.10	24.80	-2.70	X-CF	23.61	26.22	-2.61
Y-CF	22.98	29.22	-6.24	Y-CF	24.32	28.09	-3.77	Y-CF	24.84	29.90	-5.06
Q-CF	23.28	23.65	-0.37	Q-CF	21.27	20.28	0.99	Q-CF	24.36	24.19	0.16
X-M	26.77	23.14	3.63	X-M	21.57	25.78	-4.20	X-M	23.69	27.27	-3.57
Y-M	26.99	31.09	-4.10	Y-M	22.72	25.50	-2.78	Y-M	23.99	28.89	-4.90
Q-M	27.17	26.53	0.64	Q-M	22.26	30.96	-8.70	Q-M	22.52	24.72	-2.20
X-PN	25.94	26.89	-0.94	X-PN	22.86	24.99	-2.12	X-PN	26.84	30.72	-3.88
Y-PN	28.22	36.23	-8.01	Y-PN	21.71	39.57	-17.86	Y-PN	26.25	26.91	-0.66
Q-PN	26.18	23.11	3.06	Q-PN	20.32	34.27	-13.95	Q-PN	22.88	25.71	-2.83

\*HKG – vrijednost geometrijske sredine domaćinskih gena stabilne ekspresije u pojedinom terminu uzorkovanja

F. Dobivene Ct vrijednosti za CP genomsku regiju virusa pjegavosti lista vinove loze (GFkV), virusa uvijenosti lista vinove loze 1 (GLRaV-1), virusa uvijenosti lista vinove loze 2 (GLRaV-2) u tri termina uzorkovanja (pet, osam i 16 mjeseci nakon inokulacije) i izračun njihove relativne koncentracije (log fold change).

Prvi termin uzorkovanja (pet mjeseci nakon inokulacije)				Drugi termin uzorkovanja (osam mjeseci nakon inokulacije)				Treći termin uzorkovanja (16 mjeseci nakon inokulacije)			
uzorak	HKG*	GFkV (Ct)	log fold change (GFkV)	uzorak	HKG	GFkV (Ct)	log fold change (GFkV)	uzorak	HKG	GFkV (Ct)	log fold change (GFkV)
Q-TR	22.02	19.61	2.40	Q-TR	21.04	19.83	1.20	Q-TR	28.35	26.00	2.35
Q-CF	23.28	19.81	3.47	Q-CF	21.27	24.94	-3.67	Q-CF	24.36	23.71	0.65
Q-M	27.17	22.11	5.06	Q-M	22.26	32.86	-10.60	Q-M	22.52	20.36	2.16
Q-PN	26.18	21.22	4.95	Q-PN	20.32	31.72	-11.40	Q-PN	22.88	24.25	-1.37
uzorak	HKG	GLRaV-1 (Ct)	log fold change (GLRaV-1)	uzorak	HKG	GLRaV-1 (Ct)	log fold change (GLRaV-1)	uzorak	HKG	GLRaV-1 (Ct)	log fold change (GLRaV-1)
Y-TR	21.60	29.73	-8.13	Y-TR	21.86	28.76	-6.90	Y-TR	23.70	31.46	-7.77
Y-CF	22.98	30.00	-7.02	Y-CF	24.32	28.59	-4.27	Y-CF	24.84	31.99	-7.15
Y-M	26.99	31.24	-4.25	Y-M	22.72	28.01	-5.29	Y-M	23.99	33.21	-9.22
Y-PN	28.22	31.42	-3.20	Y-PN	21.71	36.38	-14.67	Y-PN	26.25	31.68	-5.43
uzorak	HKG	GLRaV-2 (Ct)	log fold change (GLRaV-2)	uzorak	HKG	GLRaV-2 (Ct)	log fold change (GLRaV-2)	uzorak	HKG	GLRaV-2 (Ct)	log fold change (GLRaV-2)
Q-TR	22.02	20.18	1.83	Q-TR	21.04	18.02	3.02	Q-TR	28.35	24.69	3.66
Q-CF	23.28	17.72	5.56	Q-CF	21.27	24.17	-2.90	Q-CF	24.36	23.50	0.86
Q-M	27.17	21.42	5.75	Q-M	22.26	23.26	-1.00	Q-M	22.52	21.96	0.56
Q-PN	26.18	19.84	6.34	Q-PN	20.32	28.22	-7.90	Q-PN	22.88	22.24	0.64

\*HKG – vrijednost geometrijske sredine domaćinskih gena stabilne ekspresije u pojedinom terminu uzorkovanja

**Prilog 6.** Rezultati mjerenja fizioloških parametara na biljkama iz kontroliranog pokusa u stakleniku.

Sorta	Replikat	Klorofil a (µg/g DW)		Klorofil b (µg/g DW)		Karotenoidi ukupni (µg/g DW)		Prolin (µg/g DW)		Relativan sadržaj vode (%)		Permeabilnost membrane (%)		Duljina internodija (cm)	
		Prosjek	SD*	Prosjek	SD	Prosjek	SD	Prosjek	SD	Prosjek	SD	Prosjek	SD	Prosjek	SD
'Tribidrag'	C	4.03	1.15	1.59	0.64	1.35	0.37	300.00	30.00	88.73	2.58	10.25	1.49	6.81	1.35
'Tribidrag'	X	4.62	0.88	1.78	0.52	1.53	0.21	449.56	155.60	86.81	3.79	13.09	1.05	7.52	1.67
'Tribidrag'	Y	2.39	0.43	1.00	0.37	0.82	0.13	409.72	132.08	87.75	1.41	12.23	4.10	5.29	0.88
'Tribidrag'	Q	4.19	0.73	1.63	0.47	1.40	0.16	170.04	75.18	85.16	6.11	15.93	3.97	8.83	1.16
'Tribidrag'	Z	4.50	0.95	1.82	0.54	1.45	0.26	338.38	155.16	82.65	3.01	17.00	6.42	7.71	1.87
'Tribidrag'	II	3.33	0.75	1.33	0.44	1.07	0.17	287.49	109.73	87.53	4.81	12.63	2.04	5.33	0.72
'Merlot'	C	2.26	0.44	0.94	0.11	0.94	0.38	297.58	24.24	77.79	8.17	10.46	1.12	5.28	0.98
'Merlot'	X	5.40	0.10	1.73	1.25	1.58	0.07	251.81	26.82	77.67	4.14	17.86	1.36	5.47	0.46
'Merlot'	Y	3.52	1.75	1.81	0.30	0.96	0.64	499.93	271.69	87.64	1.96	14.24	0.36	5.06	0.67
'Merlot'	Q	6.07	2.84	2.66	1.05	1.86	0.77	467.02	12.89	82.75	7.56	20.34	13.61	5.27	0.68
'Merlot'	Z	4.88	0.94	2.07	0.83	1.57	0.27	305.80	34.30	76.71	8.92	15.17	2.43	4.55	0.56
'Merlot'	II	2.51	0.00	1.07	0.00	0.83	0.00	564.38	0.00	84.42	0.45	16.78	0.02	3.56	0.02
'Pinot Noir'	C	2.72	0.38	1.36	0.08	0.90	0.11	994.18	139.52	83.85	3.23	22.64	1.89	6.13	0.40
'Pinot Noir'	X	4.26	1.08	1.49	0.86	1.14	0.57	236.39	42.25	83.87	3.64	15.20	0.71	7.33	1.02
'Pinot Noir'	Y	2.57	0.53	1.15	0.05	0.80	0.20	342.77	181.94	92.38	2.10	11.28	0.15	4.85	1.24
'Pinot Noir'	Q	7.24	2.07	2.85	0.94	2.25	0.50	182.05	192.85	76.16	5.74	17.22	1.37	6.13	0.04
'Pinot Noir'	Z	4.18	0.47	1.53	0.25	1.43	0.30	226.36	153.29	75.50	6.04	23.10	8.69	6.53	0.78
'Pinot Noir'	II	5.14	0.94	2.01	0.50	1.57	0.26	190.26	66.81	86.33	3.62	11.31	1.53	7.05	3.04
'Cabernet Franc'	C	2.82	0.42	0.93	0.31	1.08	0.10	333.74	26.86	57.82	1.58	23.54	5.22	4.44	0.28
'Cabernet Franc'	X	6.11	0.00	2.46	0.00	1.82	0.00	336.41	0.00	79.56	1.77	18.17	0.00	5.78	1.02
'Cabernet Franc'	Y	1.64	0.00	1.54	0.00	0.35	0.00	391.48	0.00	72.94	1.88	9.61	0.01	6.33	0.13
'Cabernet Franc'	Q	5.19	0.00	1.92	0.00	1.76	0.00	892.13	0.00	86.69	0.12	13.00	0.02	6.38	0.11
'Cabernet Franc'	II	3.40	0.91	1.14	0.47	1.16	0.32	484.21	259.14	64.28	19.39	13.03	1.77	5.85	1.02

\*SD – standardna devijacija