

# Učinak virusa uvijenosti lista vinove loze 3 na indikatore stresa u vinovoj lozi

---

Gaši, Emanuel

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:181063>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Emanuel Gaši

**Učinak virusa uvijenosti lista vinove loze 3  
na indikatore stresa u vinovoj lozi**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Emanuel Gaši

**Influence of Grapevine leafroll-associated  
virus 3 on stress indicators in grapevine**

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za fiziologiju bilja na Botaničkom Zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar struke znanosti o okolišu.

## ZAHVALE

*Rezultati ovog rada dio su znanstveno – istraživačkog projekta kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost - Patogeni potencijal Virusa uvijenosti lista vinove loze 3 i njegova interakcija s domaćinskim biljkama (IP-01-2018, voditeljica dr. sc. Katarina Hančević).*

*Ovim putem se zahvaljujem svim članovima projekta na ukazanoj prilici za sudjelovanje, a posebno voditeljici dr. sc. Katarini Hančević.*

*Veliko hvala mentorici, izv. prof. dr. sc. Sandri Radić Brkanac za pokazano strpljenje i razumijevanje pri svakom koraku u kreiranju diplomskog rada, bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Također, hvala kolegicama Sandri Vitko i Martini Galeković na nesebičnoj pomoći u izvođenju laboratorijskih analiza.*

*Na posljetku, zahvaljujem svima koji su mi bili podrška tijekom pisanja ovog rada, a posebno svojim roditeljima.*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinak virusa uvijenosti lista vinove loze 3 na indikatore stresa u vinovoj lozi

Emanuel Gaši

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Cilj ovog rada bio je istražiti učinak sojeva virusa GLRaV-3 i njihovih kombinacija na parametre oksidacijskog stresa u tri standardna kultivara vinove loze Merlot, Cabernet Franc i Pinot Noir te u autohtonom kultivaru Tribidrag. Također, ispitan je učinak virusa GLRaV-3 u kombinaciji s različitim virusima koji se često mogu naći u poljskim inokulima (kao što su GLRaV-1, GLRaV-2, GVA, GPGV i drugi) na ispitivane kultivare. Mjereni indikatori oksidacijskog stresa su uključivali sadržaj ukupne količine topivih proteina, aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), sadržaj vodikovog peroksida, malondialdehida i fotosintetskih pigmentata. Rezultati pokazuju različite stupnjeve osjetljivosti ispitivanih kultivara na infekciju testnim virusnim izolatima. U usporedbi s drugim kultivarima, utvrđeno je da je kultivar Tribidrag najosjetljiviji na infekciju sa sojevima virusa GLRaV-3 i s poljskim inokulima jer je u tom kultivaru uglavnom zabilježeno smanjenje količine topivih proteina te sadržaja klorofila *b* i karotenoida, indukcija aktivnosti SOD i akumulacija vodikovog peroksida. S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da je infekcija testnim virusima izazvala nešto slabiji stres u kultivaru Merlot, dok kultivari Cabernet Franc i Pinot Noir bilježe minimalne promjene uslijed infekcije virusom GLRaV-3 i poljskim virusnim izolatima. U tim je kultivarima utvrđeno smanjenje količine fotosintetskih pigmenata kao dominantna promjena uslijed infekcije s virusom GLRaV-3. Saznanja dobivena u ovom radu mogu biti korištena kao smjernica za daljnja istraživanja utjecaja kombiniranih infekcija virusa na fiziologiju vinove loze.

(60 stranica, 18 slika, 4 tablice, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: biotički stres, Tribidrag, Merlot, Cabernet Franc, Pinot Noir, SOD, MDA

Voditelj: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Ocjenitelji:

dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

dr. sc. Jasna Lajtner, izv. prof.

dr. sc. Ivan Čanjevac, doc.

dr. sc. Kristina Pikelj, doc.

Rad prihvaćen: 29. travnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master Thesis

# Influence of Grapevine leafroll-associated virus 3 on stress indicators in grapevine

Emanuel Gaši

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The aim of this work was to investigate the effect of GLRaV-3 strains and their combinations on oxidative stress parameters using three standard red cultivars Merlot, Cabernet Franc and Pinot Noir as well as an indigenous Croatian wine grape variety Tribidrag. Also, the effect of GLRaV-3 in combination with various viruses that are common in field inoculums (such as GLRaV-1, GLRaV-2, GVA, GPGV and others) was examined in the grape cultivars. Total soluble proteins, superoxide dismutase (SOD) activity, hydrogen peroxide, malondialdehyde and photosynthetic pigments were used as indicators of oxidative stress. The results show different degree of sensitivity of the tested cultivars to the infection caused by GLRaV-3 strains and field inoculums. In comparison with other cultivars, Tribidrag is the cultivar most susceptible to infection with GLRaV-3 and field inoculums as evidenced by generally decreased soluble protein content, chlorophyll *b* and carotenoids contents as well as enhanced SOD activity and hydrogen peroxide accumulation. Obtained data suggest less negative effects in Merlot cultivar, while Cabernet Franc and Pinot Noir cultivars display minimum changes in response to the GLRaV-3 strains and field inoculums. In those cultivars, decrease of photosynthetic pigments was the dominant change in response to GLRaV-3 infection. Findings obtained in this study can be used as a guideline for future studies of the impact of combined virus infections on grapevine.

(60 pages, 18 figures, 4 tables, 63 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: biotic stress, Tribidrag, Merlot, Cabernet Franc, Pinot Noir, SOD, MDA

Supervisor: izv. prof. dr. sc. Sandra Radić Brkanac

Reviewers:

dr. sc. Sandra Radić Brkanac, assoc. prof.

dr. sc. Jasna Lajtner, assoc. prof.

dr. sc. Ivan Čanjevaca, assist. prof.

dr. sc. Kristina Pikelj, assist. prof.

Thesis accepted: 29<sup>th</sup> April 2021.

# SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Genetička raznolikost GLRaV.....	4
1.2. Simptomatologija GLD .....	6
1.3. Načini prijenosa GLRaV-3 .....	8
1.4. Interakcija virus - vinova loza .....	9
1.4.1. Fiziološki odgovori vinove loze na infekciju .....	9
1.5. ROS, oksidativni stres i indikatori biotičkog stresa .....	11
1.5.1. Lipidna peroksidacija .....	14
1.6. Strategije upravljanja GLRaV-3 i osvrt na stanje u RH .....	16
1.7. Ciljevi istraživanja.....	17
2. Materijali i metode .....	18
2.1. Biljni materijal.....	19
2.2. Metode određivanja indikatora stresa.....	20
2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih topivih proteina .....	20
2.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze.....	21
2.2.3. Određivanje sadržaja malondialdehida .....	23
2.2.4. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida .....	24
2.2.5. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata.....	25
2.2.6. Obrada podataka.....	25
3. Rezultati .....	26
3.1. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj ukupnih topivih proteina.....	27
3.2. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na aktivnost superoksid dismutaze.....	29
3.3. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj malondialdehida.....	31
3.4. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj vodikovog peroksida.....	33
3.5. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj fotosintetskih pigmenata.....	35
3.5.1. Promjene u sadržaju klorofila <i>a</i> .....	35
3.5.2. Promjene u sadržaju klorofila <i>b</i> .....	37
3.5.3. Promjene u sadržaju ukupnih karotenoida .....	39
4. Rasprava .....	42
4.1. Utjecaj pojedinih virusnih sojeva GLRaV-3 i njihovih kombinacija na vinovu lozu ...	43



4.2. Utjecaj poljskih inokuluma na vinovu lozu.....	47
5. Zaključak.....	50
6. Literatura.....	52
7. Prilozi.....	59
8. Životopis.....	63

# 1. Uvod

Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 ili *Grapevine leafroll-associated virus 3* (GLRaV-3) jedan je od najvažnijih i najviše proučavanih virusa iz skupine u koju spadaju virusi uvijenosti lista vinove loze. Virusni ove skupine uzrokuju bolest uvijenosti lista vinove loze (grapevine leafroll disease – GLD), a GLRaV-3 univerzalno je smatran glavnim uzročnikom ove bolesti (Burger i sur. 2017). Iako genetički vrlo raznolika skupina virusa, većina spada u rod *Ampelovirus*, porodicu *Closteroviridae*, s dva virusna izolata koja ne spadaju u navedenu klasifikaciju (Maree i sur. 2013).

Vinova loza, *Vitis* spp. iz porodice *Vitaceae*, jedna je od značajnijih biljnih vrsta od velike agronomske važnosti, a *Vitis vinifera* istaknuta je kao jedina vrsta roda *Vitis* koja se koristi u vinskoj proizvodnji na globalnoj razini (This i sur. 2006). Osim *Vitis vinifera*, Euroazijske vinove loze, u modernoj vinskoj industriji koriste se i druge vrste vinove loze kao što su *Vitis labrusca*, *Muscadinia rotundifolia*, *Vitis amurensis* i nekoliko hibridnih vrsta (Naidu i sur. 2014). Kultivacija *Vitis vinifera*, višegodišnje drvenaste biljke, započela je prije 6000 do 8000 godina na području Bliskog Istoka, a opisana je kao autohtona vrsta na području Euroazije (This i sur. 2006). Tijekom svog postojanja i kultivacije, vinova loza koegzistirala je s brojnim patogenim organizmima i smatra se virusima najpodložnijom višegodišnjom voćkom sa oko 60 identificiranih vrsta iz 20 različitih rodova (Rayapati i sur. 2008). Iako su poznati brojni patogeni koji uzrokuju bolesti, kako na vinovoj lozi tako i na drugim povoljnim domaćinima, GLRaV su vezani isključivo za vinovu lozu, a drugi povoljni domaćin za ovaj virus nisu identificirani (Almeida i sur. 2013). Virusni uvijenosti lista vinove loze potencijalno potječu iz “Starog svijeta” otkud su se proširili svim značajnijim kultivacijskim regijama svijeta (Burger i sur. 2017). Prošlost otkrivanja virusa i njegova prisutnost u vinovoj lozi sastojala se od opisivanja simptoma virusne infekcije na vinovoj lozi kao prvih zapisa opažanja bolesti. Najraniji zapisi o simptomatologiji bolesti datiraju od početka 20. stoljeća zapisani u talijanskoj i francuskoj literaturi (Maree i sur. 2013). Neposredno prije početka 20. stoljeća, prikupljeni i očuvani herbarijski primjerci vinove loze sa Sicilije, poslužili su kao uvid u virološku situaciju 1880-ih godina. Martelli i Piro (1975) opisali su opažanja karakteristika herbarijskog materijala koji je ukazivao na prisutnost simptoma povezanih s bolešću vinove loze. Istraživanja u prošlosti su bila usmjerena prema otkrivanju uzroka same bolesti što je nesumnjivo bilo potvrđeno otkrivanjem virusa u vinovoj lozi elektroskopskom mikroskopijom kada su u tankom presjeku floema pronađeni virioni nalik *closterovirusima* (Namba i sur. 1979). Od tada su istraživanja većinom bila fokusirana na karakteristike samog virusa što je dovelo do otkrivanja različitih virusnih izolata i sve obuhvatnije spoznaje o genetičkoj raznolikosti GLRaV što će

biti detaljnije opisano u zasebnom poglavlju. Virusna bolest uvijenosti lista vinove loze (GLD) često je smatrana najraširenijom virusnom bolesti vinove loze, a prema negativnom utjecaju na kvalitetu vina usporediva je s bolestima vinove loze uzrokovanim vrlo značajnim patogenima kao što su gljivice (*Erysiphe necator* i dr.) i bakterije (*Agrobacterium vitis* i dr.) (Rayapati i sur. 2008; Armijo i sur. 2016). S obzirom da je ova skupina virusa prisutna u vinogradima diljem svijeta, a bolest koju uzrokuju stvara ekonomske gubitke i smanjuje kvalitetu vina, posebna pozornost u znanstvenim istraživanjima posvećena je metodologiji upravljanja vinogradima kako bi se kontrolirali negativni utjecaji virusa i umanjili ekonomski gubici (Ricketts i sur. 2015, Bell i sur. 2018). Također, u istraživanjima o interakcijama između virusa, domaćina i vektora koji sudjeluju u životnom ciklusu GLRaV, kao jedan od glavnih ciljeva, od spoznaje uzročnika bolesti pa do danas, ostaje otkrivanje novih znanja i alata koji bi omogućili adekvatnu borbu protiv GLD i GLRaV-3.

U daljnjem tekstu sistematiziranom u poglavlja, sakupljena su dosadašnja saznanja o samoj virusnoj bolesti, simptomatologiji, genetičkoj raznolikosti virusa, interakcijama virusa s domaćinom, vrstama virusnih vektora i njihovom doprinosu epidemiji virusa, utjecaju virusne prisutnosti u vinogradima kao i najbolji načini upravljanja vinogradima kako bi se kontrolirala virusna infekcija i smanjili ekonomski gubici. S posebnim naglaskom opisani su i fiziološki parametri koji su važni u proučavanju virusnih infekcija biljaka u kontekstu dosadašnjih saznanja o utjecaju GLRaV-3 na fiziologiju vinove loze.

### 1.1. Genetička raznolikost GLRaV

Nakon što je elektronskim mikroskopom potvrđena prisutnost patogenih mikroorganizama nalik klosterovirusima u floemu biljnog materijala (Namba i sur. 1979), serološkim i molekularnim istraživanjima potvrđeno je postojanje različitih vrsta virusa koji su kategorizirani i prikladno nazvani na Međunarodnom odboru za taksonomiju virusa (ICTV) (Martelli i sur. 2012). Kasnijim istraživanjima otkriveni su novi virusi i predlagane su nove sistematizacije što je rezultiralo identifikacijom i opisivanjem sveukupno 11 (ne uključujući GLRaV-8) različitih vrsta virusa. Do danas nije poznata druga virusna bolest drvenastog voća koja posjeduje toliko veliku raznolikost virusa povezanih sa njezinom etologijom što je potaknulo niz rasprava o kredibilnosti same sistematizacije i detekcije virusa (Martelli i sur. 2012). U sistematsku kategoriju *Closteroviridae* spada sveukupno 11 virusa: GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GLRaV-5, GLRaV-6, GLRaV-7, GLRaV-9, GLRaV-Pr, GLRaV-De i GLRaV-Car od kojih su GLRaV-5, -6, -9, -Pr, -De i Car naknadno definirani kao sojevi GLRaV-4 na temelju podudarnosti u veličini genoma i genetičkoj organizaciji. Porodica *Closteroviridae* sadrži tri roda koji su povezani sa GLD. Rod *Ampelovirus* sadrži vrste GLRaV-1, -3 i -4, rod *Closterovirus* sadrži vrstu GLRaV-2 a rod *Velarivirus* vrstu GLRaV-7. Naknadnim ispitivanjima bioloških i molekularnih kriterija ustanovljeno je da se rod *Ampelovirus* dijeli na dvije podgrupe. Podgrupa I uključuje GLRaV-1 i -3, dok podgrupa II uključuje GLRaV-4 i njegove sojeve (Martelli i sur. 2012).

GLRaV-3 genom u potpunosti je opisan po prvi put iz južnoafričkog izolata GP18 iz čega je uspostavljeno da se virus sastoji od otprilike 18 500 nukleotida (Maree i sur. 2008). Genom GLRaV-3 najdulji je i najkompleksniji od svih srodnih virusa, a sadrži 13 otvorenih okvira čitanja (ORF – *open reading frame*) koji predstavljaju regije genoma koje se mogu translirati, a ključne su u ekspresiji gena (Maree i sur. 2013). Istraživanja o funkcionalnosti proteina kodiranih od strane odgovarajućih ORF-a pokazala su različite uloge pojedinih regija genoma GLRaV-3 virusa, dijelom temeljenih i na znanju prikupljenom pri proučavanju drugih virusa iz porodice *Closteroviridae* (Burger i sur. 2017). ORF1 zaslužan je za kodiranje proteina povezanih sa replikacijom samog virusa koji tvore replikacijski genski blok (RGB) karakterističan za viruse ove porodice. Također, ORF1 je povezan sa osobinama virusa kao što su invazivnost i mogućnost sistemskog širenja zaraze (Ling i sur. 2004; Burger i sur. 2017). Osim ORF1 regije genoma GLRaV-3 virusa, istaknute regije genoma su ORF4 koji kodira za protein HSP-70 (*heat shock protein 70 homologue*) i ORF6 koji kodira za protein CP (*coat protein*). Oba proteina su prepoznata kao važni čimbenici pri kretanju virusa između stanica

domaćina, u ovom slučaju vinove loze, a spadaju u dio genomskog bloka koji se naziva *quintuple gene block* (QGB) (Dolja i sur. 2006; Naidu i sur. 2013, Burger i sur. 2017). Klasifikacija izolata rađena je na filogenetskim istraživanjima vezanim uz tri spomenuta gena GLRaV-3 koja kodiraju za sintezu tri različita proteina: CP – *coat protein*, HSP70 – *heat shock protein* i RdRp – *RNA dependent RNA polymerase* (Burger i sur. 2017). Upravo te regije genoma korištene su u ranim istraživanjima genetske varijabilnosti i strukture populacije GLRaV-3 virusa gdje su rezultati ukazivali na miješane infekcije u 10-15 % uzoraka, insinuirajući na različite izolate istog virusa nastale iz mogućih rekombinacijskih događaja u genomu virusa (Turturo i sur. 2005). Do 2013. godine opisani su potpuni genomi 10 različitih GLRaV-3 izolata (Maree i sur. 2013), a razvojem tehnologije i usavršavanjem metoda u narednim godinama otkriveni su dodatni izolati (Diaz Lara i sur. 2018; Thompson i sur. 2019). Potpuna klasifikacija GLRaV-3 izolata predložena je na temelju filogenetskih analiza i obuhvaća osam definiranih grupa (I-VIII) kategoriziranih u četiri odgovarajuće supergrupe (A-D). Izolati svrstani u grupe od I do V smatrani su monofiletskom grupom svrstanom u supergrupu A. Izolati iz grupe VI genetski su raznovrsniji od izolata iz supergrupe A, ali također su monofiletički i spadaju u supergrupu B. Supergrupe C i D predstavljene su svaka sa jednom grupom izolata i s najmanje podataka, ali su također monofiletske i sastoje se od izolata svrstanih u grupe VII i VIII (Maree i sur. 2015). Klasifikacija je dodatno dopunjena kada je utvrđeno postojanje filogenetske grupe XI sa izolatom ID45 (Thompson i sur. 2019). Nadalje, upotrebnom novog ekstenzivnog alata, koji je osposobljen identificirati i opisati sve do tad poznate GLRaV-3 varijante, definirana je i filogenetska grupa X opisana sa 5 izolata (Diaz-Lara i sur. 2018). Kako tehnologija napreduje, a kolektivno znanje o populacijskoj genetici GLRaV-3 virusa raste, postoji velika mogućnost da će se ovaj trend reorganizacije, otkrivanja i redefiniranja nastaviti i u budućnosti.

## 1.2. Simptomatologija GLD

U skladu s kompleksnom raznolikošću virusa uzročnika ove bolesti, sama bolest uvijenosti lista vinove loze predstavlja izazov u opisivanju simptomatologije u različitim kultivarima vinove loze. Naime, karakteristike koje služe kao indikatori prisutnosti GLRaV u vinovoj lozi, snažno variraju u različitim kultivarima, pri različitim klimatskim zonama i tijekom različitih perioda uzgoja (Maree i sur. 2013). Nadalje, simptomi nisu prisutni u svim vrstama vinove loze koje se koriste u proizvodnji vina. U nekih vrsta vinove loze simptomi bolesti su izraženi (europski kultivar *Vitis vinifera*), dok veliki broj drugih kultivara (euroazijski kultivar *Vitis labrusca* i američki kultivar *Muscadinia rotundifolia*) predstavljaju inficirane domačine bez vidnih simptoma bolesti (Naidu i sur. 2014). Od svih virusa pridruženih bolesti uvijenosti lista vinove loze, GLRaV-3 prepoznat je kao glavni uzročnik te bolesti, ali i glavni čimbenik povezan sa pojavom simptoma u bolesnim kultivarima (Burger i sur. 2017). Postoje dvije faze bolesti u kontekstu pojave simptoma koje su u skladu sa fenološkim fazama razvoja vinove loze. Razlikuju se asimptomatska faza, prije početka dozrijevanja plodova i simptomatska faza, gdje dolazi do pojave simptoma bolesti u razdoblju dozrijevanja plodova (Naidu i sur. 2015). Glavna distinkcija u simptomatologiji bolesti napravljena je između crvenih i bijelih kultivara *Vitis vinifera* (Rayapati i sur. 2008). Crveni kultivari imaju simptome koji su vizualno izraženiji od simptoma u bijelih kultivara. Na početku sezone simptomi se očituju vrlo suptilno, u formi kasnijeg početka razvoja pupova i mladica. Općenito simptomi bolesti postaju vidljivi tek u ljetnim mjesecima (kasni srpanj ili rani kolovoz) i lakše su uočljivi na crvenim kultivarima, posebice ako je infekcija uparena sa vodnim stresom (Maree i sur. 2013). Simptomi kod crvenih kultivara podrazumijevaju promjenu boje listova iz zelene u tamno crvenu, gotovo ljubičastu boju, koja najprije zahvaća područja između provodnih žila zrelih listova, ostavljajući žile listova karakteristično zelene boje (Slika 1). Međutim, listovi nekih crvenih kultivara mogu u cijelosti promijeniti boju, uključujući primarne i sekundarne provodne žile. Kako sezona napreduje, tako se obojanost listova intenzivira, ostavljajući mali dio tkiva lista uz provodnu žilu zelene boje. Napredovanje simptoma bolesti podjednako je za crvene i bijele kultivare, šireći se sa zrelih listova pri bazalnom dijelu jedinke prema mladim listovima na vršnom dijelu biljke. Naposljetku, listovi počinju gubiti svoj oblik i prema kraju sezone dolazi do uvijanja graničnih dijelova listova što je ujedno i najkarakterističniji simptom po kojem je ova bolest dobila i ime (Rayapati i sur. 2008; Maree i sur. 2013). Simptomatologija u bijelih kultivara se razlikuje u značajnoj mjeri od prethodno navedenih simptoma u crvenim kultivarima. Glavnina simptoma bijelih kultivara vezana je za suptilnu promjenu u boji listova iz zelene u svijetlo žutu

(Slika 1). Također, klorotični izgled listova koji neravnomjerno zahvaća područja između provodnih žila listova je lako uočljiv simptom kao i uvijanje listova potkraj sezone. Navedeni simptomi se vrlo sporadično pojavljuju u nekim bijelim kultivarima vinove loze, dok se uopće ne manifestiraju u drugim kultivarima (Rayapati i sur. 2008; Maree i sur. 2013; Naidu i sur. 2014; Burger i sur. 2017). Kompleksnost i neuniformnost simptoma bolesti pridonose i čimbenici kao što su starost vinograda, stadij infekcije, kompleks virusa prisutnih u biljci, abiotički čimbenici i mnogi drugi faktori (Martelli 2014). Detekcija bolesnih jedinki u vinogradu temeljena na vizualnim informacijama je često korištena praksa u vitikulturi. Međutim, opisivanje simptoma i razumijevanje varijabilnosti njihove pojavnosti nije dovoljno za dublje spoznaje o virusu i zaustavljanje infekcije. Osim što je vizualna detekcija u bijelim kultivarima gotovo nemoguća (Maree i sur. 2013) taj pristup je neadekvatan i za velik broj crvenih kultivara s obzirom da nutritivni poremećaj (nedostatak kalija), mehanička oštećenja i drugi čimbenici mogu uzrokovati promjenu boje listova koja nalikuje na simptome GLD (Naidu i sur. 2014).



**Slika 1.** Klasični simptomi bolesti uvijenosti lista vinove loze uzrokovane GLRaV-3 u crvenom kultivaru *Vitis vinifera* cv Cabernet franc (lijevo) i bijelom kultivaru *Vitis vinifera* cv Chardonnay (desno). Preuzeto iz Maree i sur. (2013).

Ipak, postoje određeni kultivari vinove loze koji bolje od ostalih razvijaju simptome virusne bolesti. Za GLRaV-3 to su: Merlot, Pinot Noir i Cabernet Franc. Ove biljke, uzgojene na vlastitom korijenju koriste se kao biološki indikatori zaraze s GLRaV te se upotrebljavaju kao



pouzdani indikatori GLD u sklopu kompleksnih programa proizvodnje certificiranog zdravog sadnom materijala.

### 1.3. Načini prijenosa GLRaV-3

Glavni način prijenosa GLRaV-3 je putem inficiranog biljnog materijala koji se koristi za potrebe vegetativnog razmnožavanja loze cijepljenjem (kalemljenjem). Metode propagiranja vinove loze koje su zasnovane na održavanju integriteta kultivara i očuvanju sortnih svojstava loze predstavljaju problem u širenju zaraze na velike udaljenosti, a inficirani materijal glavni je uzrok uvođenja virusne zaraze u zdrave vinograde (Naidu i sur. 2014). Iako prenošenje virusa između zdravih i oboljelih jedinki u vinogradu mehaničkim radnjama nije zabilježeno, njegovo progresivno širenje vinogradima ukazuje na vektorsko širenje zaraze (Almeida i sur. 2013). Glavni način prijenosa GLD unutar vinograda odvija se uz pomoć vektora (Naidu i sur. 2014). Prvi otkriveni vektor koji prenosi GLRaV-3 na zdrave jedinke vinove loze pri kratkim udaljenostima je *Pseudococcus ficus* (Engelbrecht i Kasdorf 1990). Od tada do danas opisan je veliki broj vektorskih štitarastih uši (*Coccidae* i *Pseudococcidae*) koji prenose pojedine viruse ove bolesti, izuzev GLRaV-2 i GLRaV-7 za koje nije ustanovljeno postojanje prenositelja (Naidu i sur. 2014). Štitaste uši insekti su koji se hrane floemskim sokom vinove loze, a posjeduju usni aparat koji im omogućuje adekvatno sisanje biljnih sokova (Daane i sur. 2012). Vektori ove bolesti razlikuju se po širenju bolesti na temelju njihova spola, a s obzirom da ženke jedine imaju usni aparat adekvatan za hranjenje asimilatima iz floema. Međutim, ženke za razliku od mužjaka ne posjeduju krila što ih limitira u širenju bolesti, ali utjecajem vjetrova, kretanjem radnika u vinogradu i drugim sredstvima, vektori mogu biti transportirani na prilično značajne udaljenosti (Naidu i sur. 2014). S obzirom da vizualni znakovi bolesti značajno variraju, potrebne su sigurnije metode detekcije bolesnih jedinki kako bi se degradacija vinograda smanjila i kvaliteta proizvedenog vina održala na zadovoljavajućoj razini. Metode detekcije koje se najviše koriste su biološko indeksiranje, serološke analize, metode bazirane na nukleinskim kiselinama poput lančane reakcije polimeraze i u novije vrijeme sekvenciranje nove generacije (Maree i sur. 2013).

#### 1.4. Interakcija virus - vinova loza

Bolest uvijenosti lista vinove loze definirana je s tri osnovne biološke komponente: kompleks virusa *Closteroviridae* (najproučavaniji GLRaV-3), vinova loza koja predstavlja biljku domaćina i vektorski organizmi (*Coccidae* i *Pseudococcidae*) (Almeida i sur. 2013). S obzirom na životni ciklus i strategiju infekcije, patogeni organizmi okarakterizirani su kao biotrofni, nekrotrofni ili hemibiotrofni. Virusi u pravilu ne ubijaju svoje domaćine već koriste postojeće mehanizme biljne stanice kako bi modificirali metaboličke procese u svrhu reprodukcije što ih čini obligatnim biotrofima (Glazebrook 2005). Biljni virusi mogu ući u međustanični prostor biljnih stanica gdje postaju direktno povezani sa citoplazmom i staničnim organelima što formira osnovu njihove infekcijske strategije (Hernández i sur. 2015). S obzirom da virusi nemaju mogućnost penetracije kroz stanične zidove biljke, njihov ulazak u organizam potpomognut je vektorskim organizmima, u ovom slučaju štitaštim ušima (Armijo i sur. 2016). Također, postupci kalemljenja predstavljaju značajan način ulaska GLRaV-3 u biljku vinove loze s obzirom da virusi vrlo lako migriraju floemom iz inficirane podloge u nakalemljenu plemku (Martelli 2014). Jednom kada su virusi prisutni u citoplazmi biljne stanice, dolazi do rastavljanja virusa i otpuštanja genoma koji nosi uputu za stvaranje proteina važnih za replikaciju, kretanje virusa između biljnih stanica i sl. (Zaitlin i sur. 1987). GLRaV-3 virus je ss(+)RNA što znači da nakon otpuštanja genoma u citoplazmu, odmah može započeti proces translacije, a prvenstveno se transliraju proteini helikaze, proteinaze i polimeraze (Armijo i sur. 2016). Nadalje, procesom transkripcije stvaraju se strukturalni proteini bitni za sastavljanje novih virusnih jedinki, međustanično kretanje i translokaciju virusa (Lucas 2006). U GLRaV-3, područje unosa i replikacije je u floemu, otkud se virus pasivnim kretanjem širi po vinovoj lozi što uzrokuje nastanak novih infekcijskih središta te postizanje sistemske infekcije biljke (Armijo i sur. 2016).

##### 1.4.1. Fiziološki odgovori vinove loze na infekciju

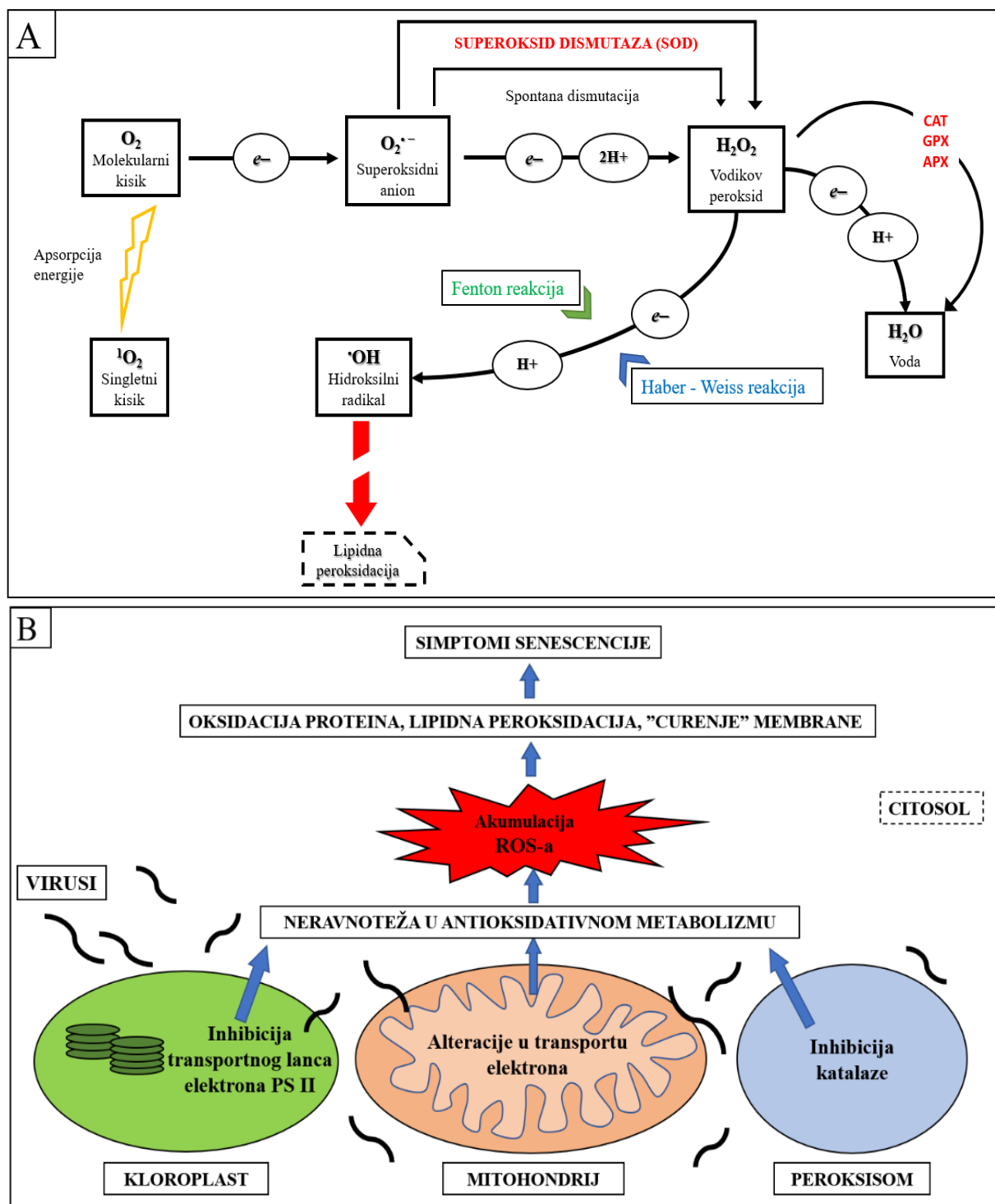
Prisutnost i replikacija virusa može imati značajne posljedice na domaćina, ali većina simptoma uzrokovana je sekundarnim procesima u biljkama kao odgovor na prisutnost virusa (Zaitlin i sur. 1987). Glavni fiziološki odgovori vinove loze na infekciju GLRaV-3 vezani su uz fiziologiju listova i plodova, a procesi koji pokazuju promjene u bolesnim jedinkama u odnosu na kontrolne jedinke, vezani su uz fotosintezu i metabolizam ugljikohidrata. Promjene u fiziologiji listova postaju najzraženije prilikom faze dozrijevanja plodova vinove loze kada dolazi i do uočljivih promjena na listovima (većinom kod crvenih kultivara) iako je GLRaV-3

prisutan u biljci i tijekom asimptomatskog perioda (Naidu i sur. 2015). Prisutnost GLRaV-3 u vinovoj lozi znatno smanjuje stopu fotosinteze, stomatalnu provodljivost i stopu transpiracije listova (Bertamini i sur. 2004). Međutim, utjecaj GLRaV-3 na fiziologiju vinove loze nije u potpunosti razjašnjen, a novija istraživanja pokazuju kako je inhibicija fotosinteze zapravo rezultat akumulacije ugljikohidrata u listovima (Halldorson i Keller 2018). Isto istraživanje pokazalo je kako su karakteristični GLD simptomi na listovima rezultat neprohodnosti vaskularnih elemenata zbog velikog broja virusa što otežava translokaciju ugljikohidrata prilikom dozrijevanja plodova te posljedično povećanu količinu ugljikohidrata u listovima. Prisutnost povećane koncentracije ugljikohidrata u listovima rezultira pojačanom biosintezom antocijanina (crvena obojanost listova) i stvara razliku u osmotskim tlakovima stanica parenhima listova što uzrokuje širenje gornjeg sloja stanica i uvijanje listova (Halldorson i Keller 2018). Istraživanja provedena na izoliranim tilakoidima utvrdila su inhibiciju linearnog transportnog lanca elektrona u inficiranim listovima uzrokovana gubitkom funkcionalnosti specifičnih polipeptida vezanih uz reakcijsko središte fotosistema II (Bertamini i sur. 2004). Inhibicija funkcionalnosti transportnog lanca elektrona može imati potencijalni utjecaj na izraženiju produkciju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS – reactive oxygen species) (Naidu i sur. 2015) za koje se smatra da su važni u obrani pri interakciji biljaka s patogenim organizmima. Infekcija vinove loze s GLRaV-3 kompatibilna je jer obrambeni mehanizmi koji uključuju produkciju ROS nisu dovoljno brzi kako bi se širenje virusa zaustavilo. Biljke koje nedovoljno brzo reagiraju na infekciju, imaju narušeni antioksidativni metabolizam i ulaze u stanje jakog stresa s klorotičnim i nekrotičnim posljedicama i sistemskim širenjem virusa (Hernandez i sur. 2015). U daljnjem tekstu fokus će biti usmjeren na parametre oksidativnog stresa vinove loze.

### 1.5. ROS, oksidativni stres i indikatori biotičkog stresa

Uobičajeni metabolizam biljaka podrazumijeva stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u malim količinama što je prisutno kod svih aerobnih organizama (Camejo i sur. 2016). Oksidativni stres biljke nastaje kao posljedica pretjeranog nakupljanja ROS što je odgovor na niz biotičkih i abiotičkih čimbenika koji narušavaju normalnu homeostazu biljnih stanica (Sharma i sur. 2012). ROS u najvećoj mjeri čine singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), superoksidni anion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidroksilni radikal ( $^{\cdot}\text{OH}$ ), a nastaju u kloroplastima, mitohondrijima, peroksisomima, apoplastu, endoplazmatskom retikulumu, membrani i staničnim stijenkama (Sharma i sur. 2012). Nastanak različitih vrsta ROS započinje aktivacijom molekule kisika putem dva različita mehanizma. Ako postoji direktni transfer energije na molekulu kisika, dolazi do ekscitacije elektrona i stvaranja singletnog kisika, a ako molekula kisika primi jedan elektron dolazi do monovalentne redukcije i produkcije superoksidnog radikala (Halliwell i Gutteridge 1984). Superoksidni radikal ili superoksidni anion nastaje uslijed nekontroliranog gubitka elektrona iz transportnog lanca elektrona ili djelovanjem NADPH oksidaze (Demidchik 2015). Novostvoreni superoksidni radikal vrlo lako prelazi u vodikov peroksid reakcijom s jednim elektronom i dva protona, neenzimatski ili enzimatski - putem superoksid dismutaze (SOD) (Sharma i sur. 2012). Neenzimatskim protoniranjem, superoksidni anion prelazi u reaktivniji hidroperoksilni radikal ( $\text{HO}_2^{\cdot-}$ ), a reakcijom dvaju nastala radikala proizvodi se  $\text{O}_2$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Slika 2) (Demidchik 2015). Iako superoksidni anion, a posebice vodikov peroksid, nisu izrazito reaktivni, njihova prisutnost u stanici omogućava nastanak vrlo reaktivnog hidroksilnog radikala. Nastanak hidroksilnog radikala u biološkim sustavima uvjetovan je oksidacijsko – redukcijskim ciklusom opisanim Fenton i Haber-Weiss reakcijama (Ayala i sur. 2014). Utjecaj hidroksilnog radikala u stanici značajan je s obzirom da je najreaktivniji radikal koji reagira s velikim organskim molekulama i sudjeluje u procesima koji dovode do staničnih oštećenja kao što je lipidna peroksidacija (Foyer i sur. 1997). To je proces lančane reakcije propagiranja slobodnih radikala, a smatra se jednim od glavnih obilježja i indikatora oksidativnog stresa (Farmer i Mueller 2013). Djelovanjem antioksidansa, odstranjuje se višak nakupljenih ROS, što umanjuje njihov negativni utjecaj na stanicu (Foyer 2005). Stresni uvjeti dovode do povećane produkcije ROS ili do smanjene aktivnosti antioksidansa što za posljedicu uzrokuje nagomilavanje ROS u stanicama. Kao rezultat stresnog stanja, u biljci se pokreće mehanizam programirane stanične smrti ili aklimatizacijski mehanizmi koji smanjuju količinu štetnih radikala (Foyer i Noctor 2003). Kao što je prije navedeno, proizvodnja ROS neizbježna je posljedica staničnog metabolizma na nekoliko različitih mjesta, a njihova uloga varira ovisno

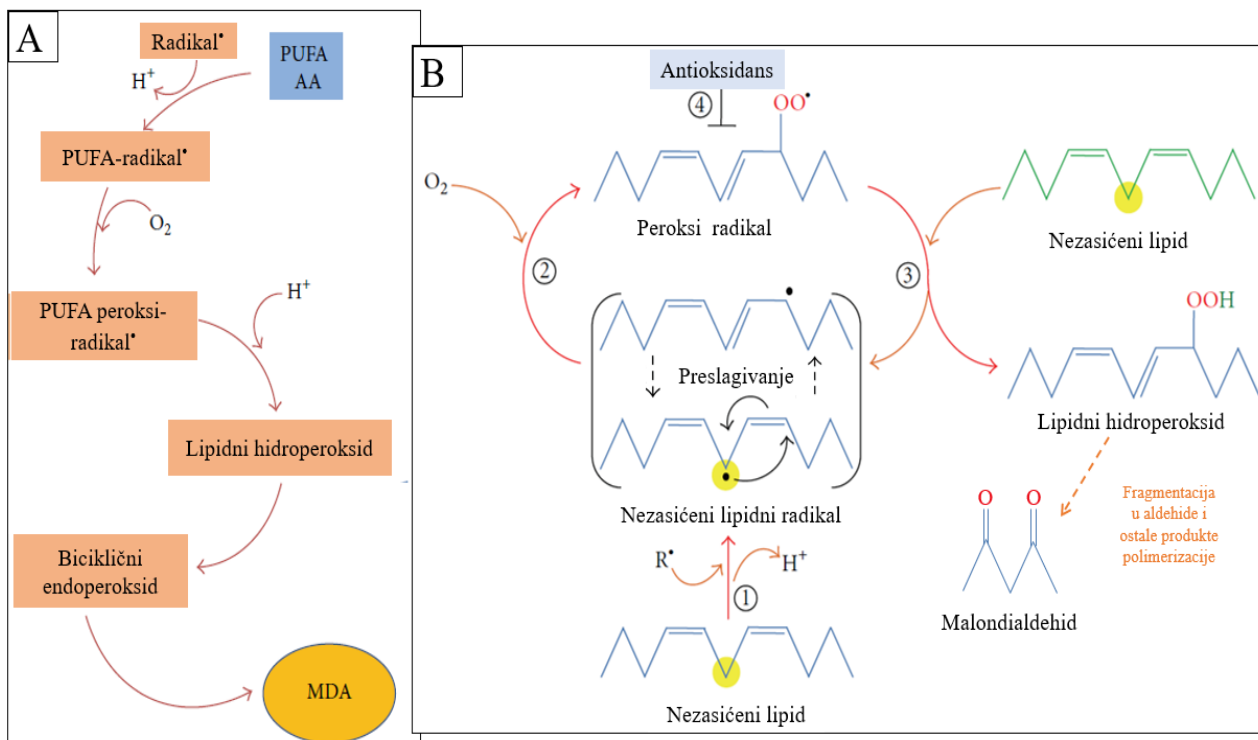
o količini. Pri niskim koncentracijama, ROS funkcioniraju kao signalne molekule koje induciraju početak brojnih procesa u biljkama, od ekspresije različitih gena i translacije do poticanja enzimske aktivnosti (Foyer i Noctor 2003). Pri velikim količinama, prisutnost ROS uzrokuje oksidativna oštećenja lipida, proteina i DNK što mijenja svojstva staničnih membrana, inhibira sintezu proteina i naposljetku promovira programiranu staničnu smrt (Sharma i sur. 2012). U kompatibilnim virusnim infekcijama, kao što je između GLRaV-3 i *Vitis vinifera*, produkcija ROS nije dovoljno brza i snažna da bi programirana stanična smrt limitirala utjecaj virusa, već je preživljavanje i širenje virusa gotovo sigurno, a sistemska infekcija biljke neizbježna (Hernandez i sur. 2015). Istraživanja pokazuju kako virusna inhibicija stvaranja ROS u biljci i izostanak programirane stanične smrti kao oblika hipersenzitivnog obrambenog odgovora biljke, služi kao strategija postizanja kompatibilne infekcije između različitih kombinacija virusa i domaćina (Lehto i sur. 2003, Perez-Bueno i sur. 2006). S druge strane, produkcija ROS u biljkama potencijalno je odgovorna za djelomičnu aktivaciju obrambenih mehanizama i promociju senescencije listova. Time se nutrijenti recikliraju iz inficiranih listova što može biti adaptacijski odgovor biljaka na dugotrajne virusne infekcije (Espinoza i sur. 2007). Kloroplasti su smatrani glavnom metom virusne infekcije gdje dolazi do inhibicije transportnog lanca elektrona u fotosustavu II, ometanja pravilnog odvijanja Calvinovog ciklusa, strukturalnih promjena i degradacije klorofila. Također, promjene u transportnom lancu elektrona mitohondrija i metabolizmu peroksisoma povezane su s kompatibilnim virusnim infekcijama, a zajedničke posljedice javljaju se u obliku povišenih koncentracija ROS koji dovode do štetnih procesa (Slika 2) (Hernandez i sur. 2015). Jedan od važnijih procesa je lipidna peroksidacija (LPO), a istaknuti produkt ove reakcije je malondialdehid. Malondialdehid (MDA) nastaje reakcijama LPO kao jedan od krajnjih produkata. Stoga, u ovom radu je korišten kao indirektni indikator LPO, odnosno oksidativnog stresa vinove loze.



**Slika 2. A)** Shematski prikaz nastanka ROS iz molekularnog kisika. Crvenom bojom naznačeni su enzimi koji kataliziraju produkciju pojedinih ROS. Superoksid dismutaza posreduje u nastanku vodikovog peroksida koji se naknadno prevodi u vodu pomoću katalaze (CAT) gvajakol peroksidaze (GPX) i askorbat peroksidaze (APX). Preuzeto i prilagođeno iz Sharma i sur. (2012). **B)** Pojednostavljeni shematski prikaz utjecaja ROS na fiziologiju određenih organela i djelovanja na razvoj simptoma tijekom kompatibilnog odnosa između virusa i biljke. Preuzeto i prilagođeno iz Hernandez i sur. (2015).

### 1.5.1. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je reakcija slobodnih kisikovih radikala ili neradikalnih vrsta s dvostrukim ugljikovim vezama koje su sastavni dio lipidnih spojeva, posebice višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) (Ayala i sur. 2014). Proces se odvija u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija (Shewfelt i Purvis 1995). Tijekom faze inicijacije ROS vrste, a posebice hidroksilni radikal, oduzimaju vodik PUFA spojevima što dovodi do stvaranja lipidnog radikala. Nastali radikal reagira s kisikom u fazi propagacije što rezultira nastankom peroksi radikala koji oduzima vodik od druge PUFA stvarajući lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi lipidni radikal. Ovaj proces promovira lančanu reakciju nastanka novih lipidnih i peroksi radikala. U fazi terminacije antioksidansi doniraju vodikov atom peroksi radikal, a nastali radikal antioksidansa reagira s drugim peroksi radikalom tvoreći neradikalne spojeve (Yin i sur. 2011). Primarni produkt LPO – lipidni hidroperoksid, prolazi kroz procese ciklizacije pri čemu nastaju biciklički endoperoksidi čijom fragmentacijom nastaje sekundarni produkt lipidne peroksidacije – MDA (Slika 3) (Ayala i sur. 2014). S obzirom da je LPO štetan proces, za svaki izvor radikala postoje obrambeni mehanizmi kako bi se smanjio fiziološki stres biljke. Superoksidni radikali prevode se u vodikov peroksid pomoću superoksid dismutaze, a vodikov peroksid je kontroliran katalazom čime se proizvodi kisik i voda (Shewfelt i Purvis 1995). U ovom radu su mjereni različiti spomenuti parametri koji su sastavi dio odgovora biljaka na biotičke i abiotičke stresove jer svako odstupanje u ovom delikatnom sustavu može predstavljati važne promjene u zdravlju i daljnjem razvoju biljke.



**Slika 3. A)** Shematski prikaz neenzimske proizvodnje malondialdehida iz polinezasićenih masnih kiselina tijekom lipidne peroksidacije. **B)** Proces lipidne peroksidacije odvija se u tri faze. Inicijacija (1) tijekom koje se stvara lipidni radikal. Propagacija (2 i 3) gdje se stvara lipidni peroksi radikal oduzimanjem vodika od druge masne kiseline što dovodi do lančane reakcije. Terminacija (4) u kojoj antioksidans „gasi“ lipidni peroksi radikal. Preuzeto i prilagođeno iz Ayala i sur. (2014).



### 1.6. Strategije upravljanja GLRaV-3 i osvrt na stanje u RH

Istraživanja o ekonomskom utjecaju GLD zaključuju kako su inicijalna stopa incidencije bolesti, cijena penala za vina niže kvalitete, početak bolesti u odnosu na starost vinograda i obujam smanjenja prinosa važni parametri pri odabiru metoda borbe protiv ove bolesti u svrhu održavanja profitabilnosti vinograda. Također, odstranjivanje zaraženih jedinki, presađivanje i tretiranje biljaka insekticidima optimalan je pristup za vinograde sa slabijom rasprostranjenošću bolesti. Pri visokoj incidenciji bolesti, predlaže se potpuno uklanjanje zaraženih trsova iz vinograda kako bi se umanjili ekonomski gubici (Ricketts i sur. 2015). Najbolji pristup u borbi protiv GLD je multi-strateški, s borbom protiv virusa i vektora bolesti na godišnjoj razini (Bell i sur. 2018), a istraživanje o utjecaju sistemskih insekticida pokazuje kako su oni važan alat za kontrolu populacije vektora u vinogradima, no ne pružaju dodatnu zaštitu vinovoj lozi od samog virusa (O'Hearn i Walsh 2020). Naposljetku, prevencija bolesti ostaje najvažnija stavka upravljanja vinogradima, a korištenje provjerenog, zdravog biljnog materijala i gdje je moguće, podloge vinove loze tolerantne na virusne vektore predstavljaju korak u pravom smjeru (Fuchs 2020).

U Hrvatskoj situacija je zabrinjavajuća, a istraživanja pokazuju kako je GLRaV-3 prisutan u gotovo 80 % ispitanih kultivara vinove loze na području Dalmacije (Vončina i sur. 2019). U novijem masovnom istraživanju koje je obuhvatilo ispitivanje 16 autohtonih kultivara loze sa područja srednje i južne Dalmacije, 95 % loza je bilo pozitivno na GLRaV-3 (Hančević i sur. 2021). U kontinentalnoj Hrvatskoj, gdje je više od 50 % ispitanih jedinki negativno na GLRaV-1, stanje je bolje, ali promjene u sanitarnim praksama i implementacija rigidnih metoda borbe protiv bolesti su nužne kako bi se bolest stavila pod kontrolu. Također, u kultivara s visokom stopom infekcije potrebni su značajni napori kroz klonalnu selekciju i sanitaciju kako bi se očuvala bioraznolikost vinovih loza, ali i povećala kvaliteta biljnog materijala i proizvedenog vina (Karoglan Kontić i sur. 2009).

### 1.7. Ciljevi istraživanja

- × Istražiti učinke čistih (pojedinačnih) sojeva GLRaV-3 na određene parametre oksidacijskog stresa u četiri kultivara vinove loze
- × Istražiti učinke različitih kombinacija GLRaV-3 sojeva na određene parametre oksidacijskog stresa u četiri kultivara vinove loze
- × Istražiti učinke poljskih inokuluma s različitim kombinacijama virusa, uključujući GLRaV-3, na parametre oksidacijskog stresa u četiri kultivara vinove loze

## 2. Materijali i metode

## 2.1. Biljni materijal

Korištene su četiri domaćinska kultivara vinove loze - Pinot Noir, Cabernet Franc i Merlot kao tri standardna bezvirusna crvena kultivara i Tribidrag kao autohtoni bezvirusni kultivar. Korišteni biljni materijal pripremljen je i uzgajan u eksperimentalnom stakleniku (Schwarzmann) Instituta za jadranske kulture u Splitu. Sva četiri kultivara inokulirana su s tri čista (monofiletska) soja virusa uvijenosti lista vinove loze 3 - GLRaV-3 - kao i s njihovim kombinacijama. Osim spomenutih sedam tretmana, pripremljena su i četiri tretmana koja su uključivala biljke inokulirane poljskim miješanim izolatima u kojima su pored GLRaV-3 bili prisutni i drugi virusi (Tablica 1). Izuzev tretiranih biljaka, određeni dio biljaka pojedinog kultivara nije inokuliran virusnim materijalom te je poslužio kao kontrolni materijal. Sav biljni materijal korišten u eksperimentalnom radu je uzorkovan četiri mjeseca nakon cijepjenja, liofiliziran i uprašen na Institutu za jadranske kulture u Splitu i poslan na daljnju obradu na Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu gdje sam ga u sklopu svog diplomskog rada koristio za određivanje indikatora stresa. Ukupan materijal čine četiri kultivara vinove loze u četrnaest tretmana (za svaki tretman je pripremljeno pet bioloških replika).

**Tablica 1.** : Pojašnjenje oznaka i tretmana korištenih biljnih materijala. Osim GLRaV-3, virusi koji su sastavni dio poljskih inokuluma i korišteni su u četiri tretmana (X, Y, Z, Q) su: virus uvijenosti lista vinove loze 1 i 2 (GLRaV-1, GLRaV-2), virus pjegavosti vinove loze (GFkV), virus vinove loze A (GVA), virus Pinota sivog (GPGV) i virus jamičavosti drveta vinove loze (Grapevine rupestris stem-pitting associated virus - GRSPaV).

OZNAKA	TRETMAN
C	Kontrola
I	monofiletski izolat GLRaV-3 koji se filogenetski grupira u grupu 1
II	monofiletski izolat GLRaV-3 koji se filogenetski grupira u grupu 2
III	monofiletski izolat GLRaV-3 koji se filogenetski grupira u grupu 3
I, II	dva GLRaV-3 izolata od kojih se jedan filogenetski grupira u grupu 1 a drugi u grupu 2
I, III	dva GLRaV-3 izolata od kojih se jedan filogenetski grupira u grupu 1 a drugi u grupu 3
II, III	dva GLRaV-3 izolata od kojih se jedan filogenetski grupira u grupu 2 a drugi u grupu 3
I, II, III	tri GLRAV-3 izolata od kojih se jedan filogenetski grupira u grupu 1, drugi u grupu 2, a treći u grupu 3
X	poljski virusni izolati sastavljeni od virusa vinove loze GLRaV-3, GVA, GPGV i GRSPaV
Y	poljski virusni izolati sastavljeni od virusa vinove loze GLRaV-3, GVA, GLRaV-1, GPGV i GRSPaV
Z	poljski virusni izolati sastavljeni od virusa vinove loze GLRaV-3 i GVA
Q	poljski virusni izolati sastavljeni od virusa vinove loze GLRaV-3, GVA, GLRaV-2, GFkV, GPGV i GRSPaV

### 2.2. Metode određivanja indikatora stresa

Indikatori stresa koje sam u ovom radu koristio za razumijevanje utjecaja virusne infekcije na četiri kultivara vinove loze su uključivali sadržaj ukupnih topivih proteina, aktivnost enzima superoksid dismutaze (SOD), sadržaj fotosintetskih pigmenata, sadržaj vodikovog peroksida kao pokazatelja oksidacijskog stresa, i sadržaj malondialdehida (MDA) kao jednog od krajnjih produkata lipidne peroksidacije.

#### 2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih topivih proteina

Za ekstrakciju proteina iz biljnog materijala izvagao sam 50 mg liofiliziranog i uprašenog lista vinove loze u prethodno označene Eppendorf epruvete. Prije ekstrakcije, pripremio sam matične otopine za izradu 50 mM kalij-fosfatnog (KP) pufera, pH vrijednosti 7.0, uz dodatak 10 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA). Za izradu 200 mL pufera odpiptirao sam 6152  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3848  $\mu\text{L}$  1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i 2000  $\mu\text{L}$  10 mM EDTA uz dodatak  $\text{dH}_2\text{O}$  do 200 mL. Ovako pripremljeni pufer sam koristio za homogeniziranje biljnog materijala. U svaku epruvetu s odvaganim biljnim materijalom dodao sam 1,5 mL KP pufera, te stavio po jednu čeličnu ili karbidnu kuglicu. Uzorke sam stavio u nosač za homogeniziranje, pričvrstio ga, namjestio homogenizator (mlin IST 400) na 1 min i 30 Hz i pokrenuo homogeniziranje. Nakon homogenizacije sam izvadio kuglice iz svake epruvete i dodao polivinil-polipirrolidin (PVPP). Tako pripremljene uzorke sam poslagaio u centrifugu (Sigma 3K18), namjestio parametre na  $25000 \times g$ , 30 min i temperaturu od 4 °C i pokrenuo uređaj. Dobiveni supernatant sam prebacio u čiste Eppendorf epruvete i koristio za određivanje sadržaja ukupnih topivih proteina, aktivnosti enzima SOD i sadržaja MDA.

Metoda koju sam koristio za određivanje sadržaja ukupnih topivih proteina u uzorcima vinovih loza modificirana je metoda po Bradford-u (1976). Metoda se zasniva na vezanju proteina iz ekstrakta na boju Coomasie Brilliant Blue G-250 iz reagensa pri čemu dolazi do promjene boje, a time i apsorpcijskog maksimuma sa 465 nm na 595 nm što se lako detektira spektrofotometrijski. U tu sam svrhu priredio 200 mL Bradford reagensa koji sadrži 170 mL  $\text{dH}_2\text{O}$ , 6 mL etanola, 12 mL 88 % fosfatne kiseline i 12 mL Bradford stock otopine čiji je sastav 96 % etanol, 88 % fosfatna kiselina i Coomasie Brilliant Blue boja. Sadržaj proteina u uzorcima sam odredio na način da sam prvo izmjerio apsorbanciju slijepe probe (50  $\mu\text{L}$  50 mM KP pufera

i 1 mL Bradford reagensa), a zatim i svih uzoraka (50  $\mu$ L ekstrakta i 1 mL Bradford reagensa) pri valnoj duljini od 595 nm na spektrofotometru (Specord, Analytik Jena). Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima izradio sam baždarnu krivulju dobivenu mjerenjem apsorbancija razrijeđenja goveđeg serumskog albumina (bovine serum albumine, BSA) koncentracija od 0,1 do 0,8 mg/mL nakon reakcije s Bradford reagensom. Sadržaj proteina izrazio sam u mg / g suhe tvari.

### 2.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima superoksid dismutaze

Aktivnost enzima SOD sam odredio prema metodi Beauchamp i Fridovich (1971). Metoda se temelji na indirektnom određivanju aktivnosti enzima SOD pomoću sustava ksantin – ksantin oksidaza (XOD) pri čemu se stvaraju superoksidni anioni. Za detekciju superoksidnih aniona se koristi nitro blue tetrazolium klorid (NBT) koji se u njihovom prisustvu reducira u NBT-diformazan što se očituje promjenom boje iz žute (NBT) u ljubičastu (NBT-diformazan). U prisutnosti SOD, dolazi do smanjenja koncentracije superoksidnih aniona i sukladno tome nastaje i manje NBT-diformazana te se apsorbancija također proporcionalno (količini NBZ-diformazana) smanjuje. Za određivanje aktivnosti enzima SOD, izradio sam 50 mL 100 mM KP ekstrakcijskog pufera (pH 7.0) koji je sadržavao 0,5 mL 10 mM EDTA. Nadalje, u menzuri sam pripremio 200 mL SOD reakcijskog pufera. Menzuru sam prethodno omotao aluminijskom folijom kako bi se umanjio neželjeni učinak svjetlosti na NBT. Za reakcijski pufer odpipetirao sam 9,08 mL 1 M  $K_2HPO_4$ , 0,92 mL 1 M  $KH_2PO_4$ , 2 mL 10 mM EDTA, izvagao 12,30 mg NBT i s  $dH_2O$  nadopunio otopinu do oznake od 200 mL. Također sam pripremio 20 mL 10,8 mM otopine ksantina na način da sam izvagao 32,80 mg ksantina, otopio u 20 mL  $dH_2O$ , te miješajući otopinu na magnetnoj miješalici dodavao 1 M KOH ili 1 M NaOH kako bi se ksantin u cijelosti otopio. Ksantin oksidaza (XOD) nestabilan je enzim koji se mora čuvati na 4 °C i priprema se neposredno prije spektrofotometrijskog mjerenja. Razrijeđeni enzim XOD (5  $\mu$ L XOD na 0,995  $\mu$ L  $dH_2O$ ) ostaje stabilan svega 60 min od pripreme, uz obavezno čuvanje na ledu. Prije mjerenja uzoraka izradio sam kalibracijsku krivulju dobivenu pomoću standardnih otopina različitih koncentracija goveđeg enzima SOD čiji je raspon vrijednosti usklađen s vrijednostima analiziranih uzoraka. Nakon pripreme razrijeđenog enzima XOD i mjerenja slijepe probe (Tablica 2), spektrofotometrijski sam izmjerio maksimalnu brzinu redukcije NBT u NBT-diformazan pri 560 nm (mjerenjem apsorbancije sedam puta s razmakom između mjerenja od 30 sekundi). Sustav sam namjestio tako da XOD proizvodi inicijalnu promjenu apsorbancije 0,025/min s dopuštenom pogreškom 0,020 – 0,030. Nakon toga, izmjerio sam apsorbanciju uzoraka vinove loze na isti način kao i maksimalnu brzinu redukcije NBT-a u

## 2. Materijali i metode

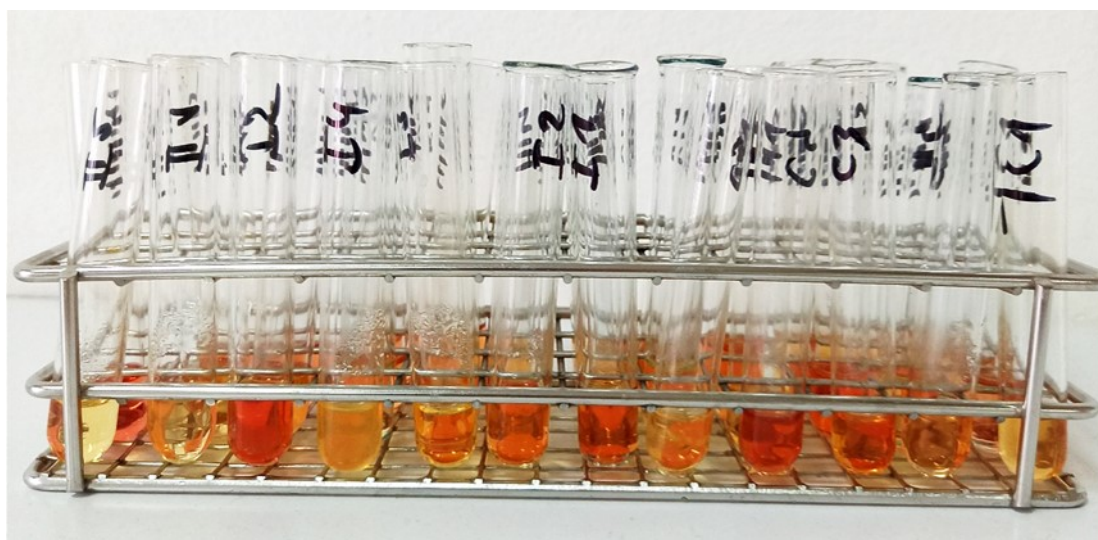
NBT-diformazan. Aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina (U / mg proteina).

**Tablica 2.** Volumeni pripremljenih otopina korišteni pri mjerenju apsorbancija za slijepu probu (blank), maksimalnu brzinu redukcije NBT u NBT-diformazan (max) i aktivnost SOD u uzorku.

	BLANK ( $\mu\text{L}$ )	MAX ( $\mu\text{L}$ )	UZORAK ( $\mu\text{L}$ )
SOD reakcijski pufer	825	825	825
ksantin	75	75	75
ekstrakcijski pufer	50	50	45
uzorak	-	-	5
dH <sub>2</sub> O	50	-	-
XOD	-	50	50

### 2.2.3. Određivanje sadržaja malondialdehida

Za određivanje sadržaja MDA, kao jednog od krajnjih produkata lipidne peroksidacije, u uzorcima vinovih loza koristio sam ekstrakt pripremljen za određivanje ukupnih topivih proteina i aktivnosti enzima SOD. Radni reagens sam pripremio miješanjem 0,25% tiobarbituratne kiseline (TBA) i 10% trikloroetene kiseline (TCA). Za volumen od 250 mL reagensa izvagao sam 25 g TCA, otopio u malo manje od 250 mL dH<sub>2</sub>O. U tako pripremljenu otopinu dodao sam 0,625 g TBA, namjestio volumen na točno 250 mL te stavio otopinu na mješanje magnetnoj miješalici uz zagrijavanje do potpunog otapanja. U staklene semimikroeprove odpipetirao sam 300  $\mu$ L ekstrakta pojedinog uzorka i 700  $\mu$ L pripremljenog reagensa. Paralelno sa pripremom uzoraka, pripremljena je i slijepa proba (300  $\mu$ L ekstrakcijskog pufera i 700  $\mu$ L reagensa). Uzorke sam stavio na zagrijavanje u sušionik na 95 °C u trajanju od 30 minuta. Tijekom zagrijavanja reakcijske otopine niskog pH dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica oksidacijskog stresa pri čemu nastaju malondialdehidi. Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA zbog čega nastaje crvenkasti kromogen (Slika 4) kojemu se mjeri apsorbancija. Kako bi zaustavio reakciju, uzorke sam nakon zagrijavanja stavio na led. Zatim sam svakom uzorku izmjerio apsorbanciju na 532 nm (apsorpcijski maksimum MDA) i 600 nm (korekcija za nespecifičnu zamućenost). Sadržaj MDA izračunao sam koristeći ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{532} = 155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Heath i Packer, 1968) i izrazio u  $\mu\text{mol} / \text{g}$  suhe tvari.



**Slika 4.** Razvoj boje uslijed zagrijavanja zbog raspadanja lipidnih peroksida i nastajanja malondialdehida koji reagira sa tiobarbituratnom kiselinom.



### 2.2.4. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida

Sadržaj vodikovog peroksida odredio sam na temelju reakcije  $\text{H}_2\text{O}_2$  s titanijevim sulfatom pri čemu se stvara precipitat peroksid-titanil kompleksa kojemu se, nakon otapanja, mjeri apsorbancija. Metodu određivanja sadržaja  $\text{H}_2\text{O}_2$  opisali su Mondal (1981) te Mukherjee i Choudhuri (1981). U pojedinu Eppendorf epruvetu od 2 mL izvagao sam po 20 mg liofiliziranog i uprašenog biljnog materijala, dodao po 1 mL hladnog acetona i čeličnu kuglicu za homogeniziranje. Parametri za homogeniziranje u mlinu IST 400 su bili isti kao i za pripremu proteinskih ekstrakata (1 min, 30 Hz). Uzorci su potom centrifugirani 3 min na  $1000 \times g$  u Sigma 3K18 centrifugi pri temperaturi od  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Zeleno obojani nadtalog koji je sadržavao otopljene fotosintetske pigmente sam odlio, a na talog sam dodao  $400\ \mu\text{L}$  titanovog sulfata i  $500\ \mu\text{L}$   $\text{NH}_4\text{OH}$  (konc.) kako bi precipitirao nastali peroksid-titanijev kompleks. Prilikom dodavanja navedenih kemikalija, uzorke sam držao na ledu zbog razvijanja snažne egzotermne reakcije. Uzorke sam zatim stavio u centrifugu, pri čemu sam namjestio parametre na  $10000 \times g$ , 10 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Nadtalog sam odlio i na talog dodao 1 mL koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Uzorke sam prebacio u staklene semimikroepruvete i dodao još 2 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (konc.). Obzirom da je obojanost uzoraka bila vrlo izražena, za mjerenje apsorbancije napravio sam završno razrjeđenje koje je sadržavalo  $100\ \mu\text{L}$  uzorka i  $900\ \mu\text{L}$  koncentrirane  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Tako pripremljenim uzorcima izmjerena je apsorbancija na 415 nm u plastičnim kivetama na spektrofotometru Specord, Analytik Jena. Koncentraciju  $\text{H}_2\text{O}_2$  odredio sam iz baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,23\text{--}1,27 \times 10^{-3}$  mol/l), te sam sadržaj vodikovog peroksida izračunao koristeći dobiveni ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{415} = 1,878\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  i izrazio u  $\mu\text{mol} / \text{g}$  suhe tvari.

### 2.2.5. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata

Sadržaj fotosintetskih pigmenata klorofila i karotenoida odredio sam spektrofotometrijskim mjerenjem apsorbancije pri 663 nm, 646 nm i 470 nm (Wellburn, 1994). U tu sam svrhu izvagao po 15 mg biljnog materijala u Eppendorf epruvete u koje sam zatim dodao ohlađeni 80%-tni aceton u volumenu od 1,5 mL i čeličnu kuglicu za homogeniziranje. Parametri za homogeniziranje u mlinu IST 400 su bili isti kao i za pripremu proteinskih ekstrakata (1 min, 30 Hz). Nakon homogenizacije, kuglice sam izvadio te sam uzorke zatim stavio u centrifugu, pri čemu sam namjestio parametre na  $5000 \times g$ , 10 min, 4 °C. Po završetku centrifugiranja nadtalog sam prelio u graduiranu epruvetu, a na talog sam dodao još 1,5 mL hladnog acetona kako bi se ekstrahirali preostali fotosintetski pigmenti. Postupak centrifugiranja sam ponovio i tako dobiven 1,5 mL supernatanta prelio u graduiranu epruvetu. Obzirom da je aceton hlapljiv, graduirane epruvete sam začepio, a prije mjerenja apsorbancije sam svakom uzorku prema potrebi dodao acetona do volumena od 3,0 mL (kako bi svi uzorci bili jednakog volumena). Sadržaj fotosintetskih pigmenata sam izračunao prema Lichtenthaleru (1987) i izrazio u mg / g suhe tvari.

### 2.2.6. Obrada podataka

Statistička analiza podataka i njihov grafički prikaz proveo sam korištenjem računalnog programa STATISTICA 13.3 (TIBCO Software Inc., SAD) i Excel programa Microsoft Office paketa. Svaki brojčani podatak prikazan grafikonom aritmetička je sredina pet replika. Razlike između eksperimentalnih grupa testirao sam jednosmjernom analizom varijance – one way ANOVA i post hoc testom Duncan višestrukih usporedbi nakon normalizacije pojedinog tretmana na odgovarajuće kontrole. Kontrolama je dodijeljena vrijednost 1, a statistički značajne razlike uz razinu značajnosti od 0,05 ( $p < 0,05$ ) između kontrole i tretiranih biljaka prikazane su različitim slovima. Originalni podaci prikazani su u Tablicama u prilogu.

## 3. Rezultati

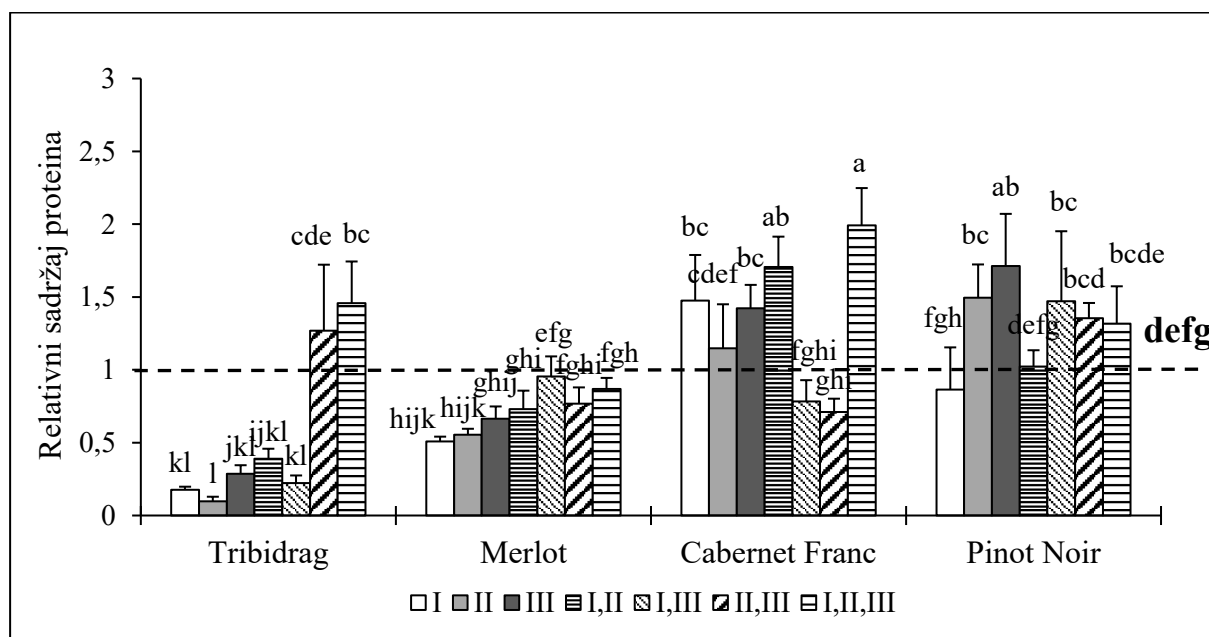
Sadržaj ukupnih topivih proteina, aktivnost SOD-a, sadržaj MDA, sadržaj vodikovog peroksida i sadržaj fotosintetskih pigmenata (klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi) izmjereni su prethodno opisanim postupcima, spektrofotometrijskim analizama. Rezultati istraživanja oblikovani su tako da je na grafičkim prikazima za pojedine indikatore stresa vidljiva usporedba sva četiri kultivara - Tribidrag, Merlot, Cabernet Franc, i Pinot Noir. Na taj je način dobro uočljiva varijabilnost između ispitivanih kultivara i zadržana reprezentativnost rezultata. Testni kultivari su tretirani različitim sojevima virusa GLRaV-3 (I, II i III i njihovim kombinacijama) i kombinacijom virusa GLRaV-3 s drugim virusima vinove loze tzv. poljski izolati označeni slovima X, Y, Z i Q.

#### 3.1. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj ukupnih topivih proteina

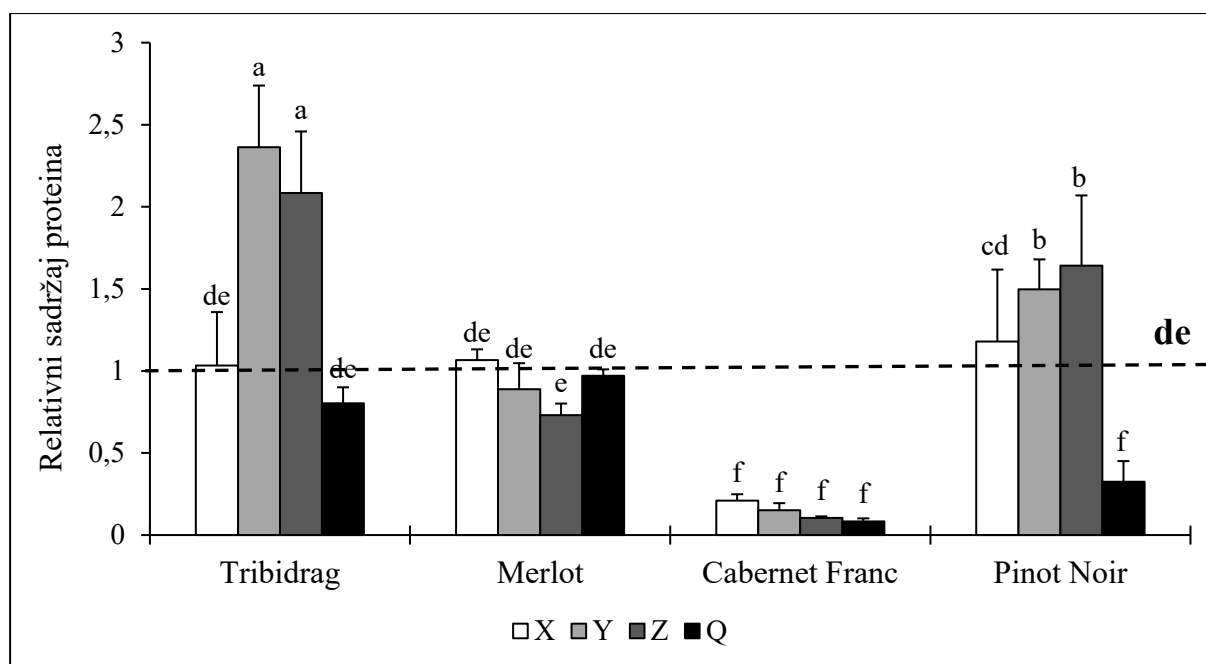
Općenito, rezultati utjecaja sojeva virusa GLRaV-3 i njihovih kombinacija na četiri ispitivana kultivara ne pokazuju uniforman trend povećanja ili smanjenja sadržaja proteina, ali je ipak vidljivo da su primijenjeni tretmani pokazali jači učinak na sadržaj proteina u listovima kultivara Tribidrag, te slabiji u listovima ostalih kultivara (Slika 5). Ispitivanjem ukupnog sadržaja topivih proteina u listovima navedenih kultivara, ustanovljeno je da su tretmani čistim (monofiletskim) sojevima I, II i III te njihovim kombinacijama u listovima Tribidraga statistički značajno smanjili sadržaj topivih proteina u odnosu na kontrolu i tretirane kultivare Cabernet Franc i Pinot Noir (Slika 5). Također, u listovima kultivara Merlot tretiranih sojevima I i II utvrđen je značajno smanjen sadržaj ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolne vrijednosti. Značajno povećanje sadržaja proteina zabilježeno je u listovima kultivara Tribidrag i Cabernet Franc tretiranih kombinacijom sva tri soja virusa GLRaV-3. Virusni sojevi I i III te kombinacija sojeva I i II uzrokovali su povećanje sadržaja proteina i u listovima kultivara Cabernet Franc, dok su virusni sojevi II i III te kombinacija sojeva I i III uzrokovali povećanje sadržaja proteina i u listovima kultivara Pinot Noir. Sve kombinacije virusnih sojeva u listovima kultivara Merlot, te pojedine kombinacije virusnih sojeva u listovima Cabernet Franc i Pinot Noir nisu značajno utjecale na sadržaj topivih proteina u odnosu na kontrolu.

U listovima vinove loze Cabernet Franc tretiranog sa svim poljskim izolatima (X, Y, Z i Q) utvrđeno je statistički značajno smanjenje sadržaja ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolu i ostale tretirane kultivare (Slika 6). Točnije, značajno smanjenje sadržaja proteina u usporedbi s kontrolom zabilježeno je još samo u listovima kultivara Pinot Noir tretiranog poljskim izolatom Q. Poljski izolati Y i Z su u listovima kultivara Tribidrag i Pinot Noir doveli

do statistički značajnog povećanja sadržaja ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolu, a u listovima kultivara Merlot nisu utjecali na vrijednost tog parametra. Sličan sadržaj proteina kao i u kontroli zabilježen je i u listovima kultivara Tribidrag tretiranog s izolatima X i Q te u listovima kultivara Pinot Noir tretiranog s izolatima X.



**Slika 5.** Relativni sadržaj proteina u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj ukupnih topivih proteina u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „defg“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).



**Slika 6.** Relativni sadržaj proteina u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima X, Y, Z i Q koji sadrže različite viruse vinove loze. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj ukupnih topivih proteina u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „de“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

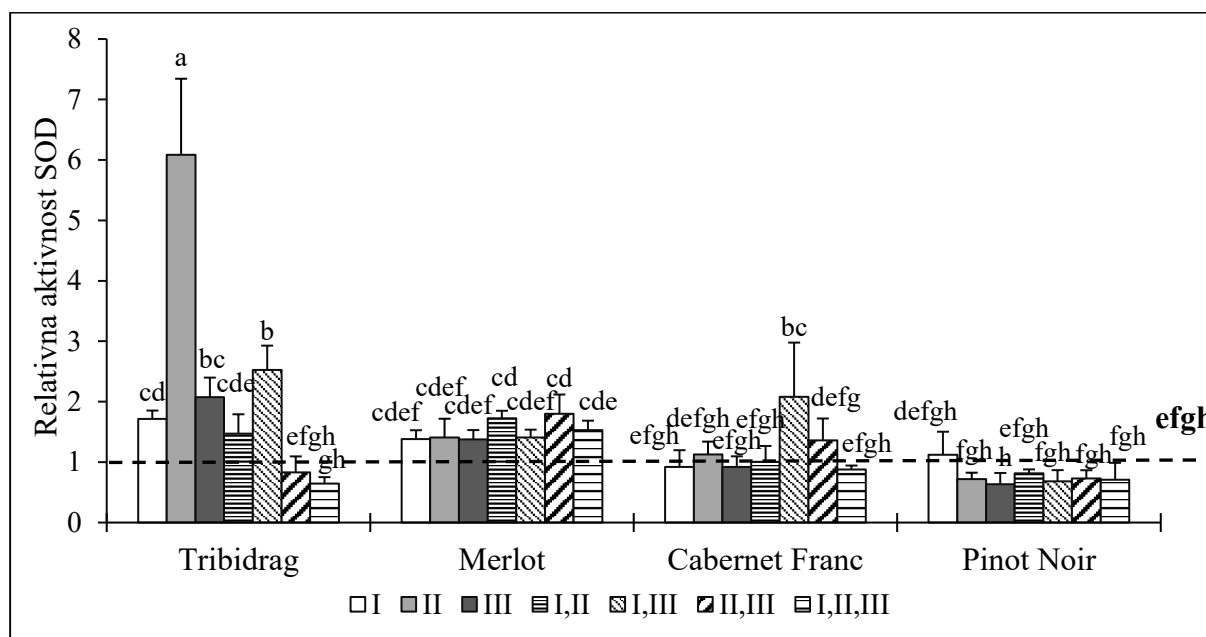
### 3.2. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na aktivnost superoksid dismutaze

Općenito, vidljivo je da sojevi virusa GLRaV-3 I, II i III i njihove kombinacije uglavnom nisu značajno utjecali na aktivnost SOD u listovima kultivara Merlot, Cabernet Franc i Pinot Noir u usporedbi s kontrolom (Slika 7). Iznimka je povećana aktivnost SOD u listovima kultivara Cabernet Franc tretiranog kombinacijom sojeva GLRaV-3 I,III te u listovima kultivara Merlot tretiranog kombinacijama sojeva GLRaV-3 I,II i II,III.

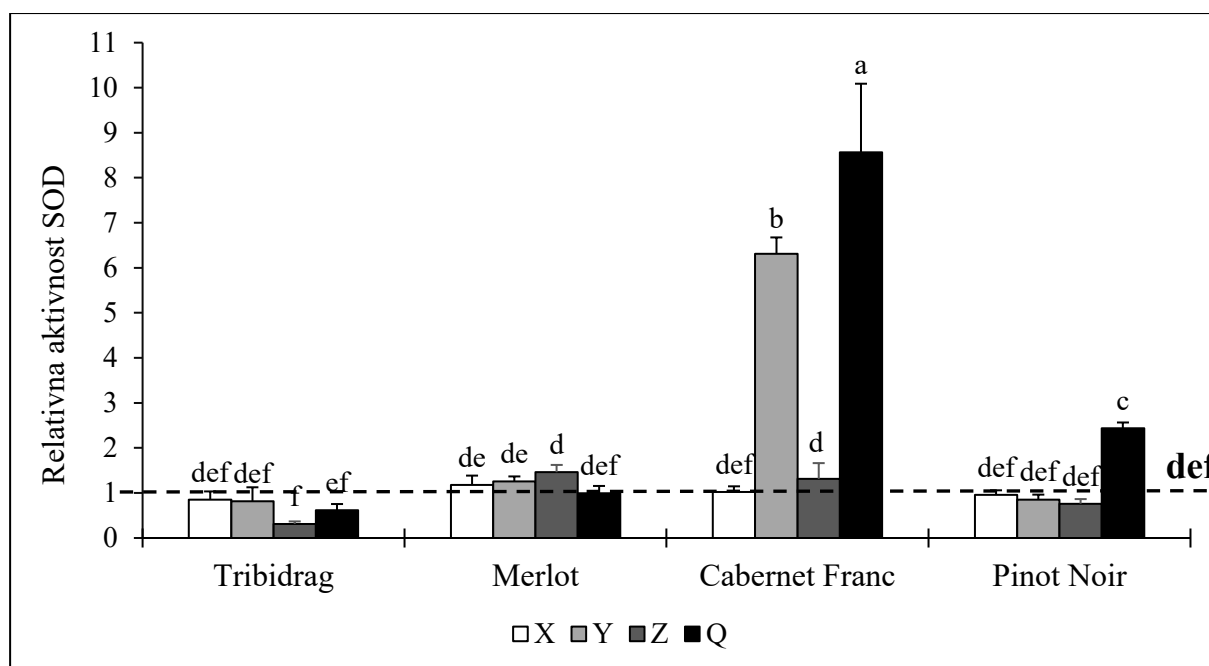
Najveća varijabilnost u aktivnost SOD utvrđena je u listovima kultivara Tribidrag kod kojeg su tretmani monofiletskim virusnim izolatima I, II i III i kombinacijom virusnih izolata I,III uzrokovali statistički značajno povećanu aktivnost SOD-a u odnosu na kontrolu (Slika 7). Ostale kombinacije (I,II; II,III i I,II,III) nisu uzrokovale značajnu promjenu aktivnosti SOD u listovima kultivara Tribidrag u odnosu na kontrolu.

Slično učinku sojeva virusa GLRaV-3, ni tretmani s poljskim izolatima X, Y, Z i Q uglavnom nisu značajno utjecali na aktivnost SOD u listovima testnih kultivara (Slika 8). Iznimka je

jedino uočena u listovima kultivara Cabernet Franc i Pinot Noir kod kojih je u pojedinim tretmanima utvrđeno bitno povećanje aktivnosti SOD. Listovi navedenih kultivara tretirani poljskim inokulumom označenim kao Q, koji sadrži ukupno šest različitih virusa (Tablica 1), pokazuju statistički značajno povećanje aktivnosti SOD. Aktivnost tog enzima bila je povećana i u listovima kultivara Cabernet Franc tretiranog poljskim inokulumom označenim kao Y, koji sadrži ukupno pet različitih virusa vinove loze.



**Slika 7.** Relativna aktivnost SOD u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama. Vrijednosti su izražene u odnosu na aktivnost SOD u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „efgh“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).



**Slika 8.** Relativna aktivnost SOD u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima X, Y, Z i Q koji sadrže različite viruse vinove loze. Vrijednosti su izražene u odnosu na aktivnost SOD u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „def“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

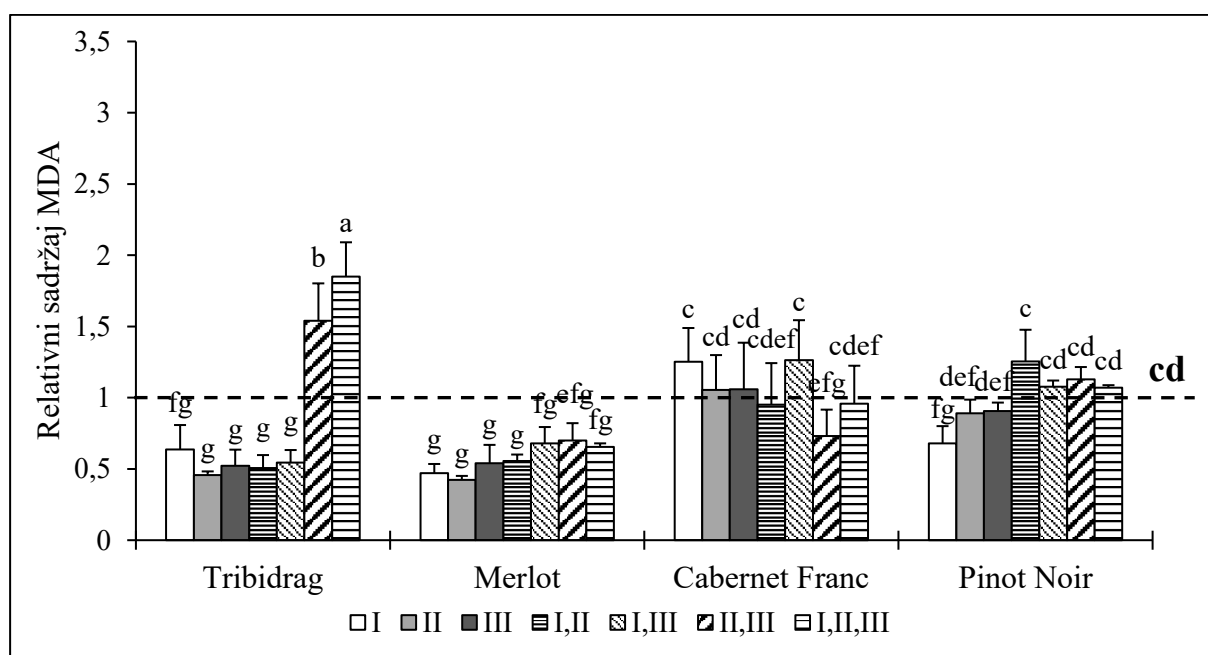
### 3.3. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj malondialdehida

Općenito, vidljivo je da sojevi virusa GLRaV-3 I, II i III i njihove kombinacije uglavnom nisu uzrokovali lipidnu peroksidaciju u listovima kultivara Cabernet Franc i Pinot Noir u usporedbi s kontrolom (Slika 9). Naime, u listovima navedenih kultivara nisu zabilježena statistički značajna odstupanja sadržaja MDA od kontrolne vrijednosti. U listovima kultivara Merlot tretiranog sojevima virusa GLRaV-3 i njihovim kombinacijama utvrđeno je statistički značajno smanjenje sadržaja MDA u odnosu na kontrolu. Slično učinku sojeva virusa GLRaV-3 na kultivar Merlot, gotovo svi tretmani su uzrokovali smanjenje sadržaja MDA u listovima kultivara Tribidrag. Iznimke kod kultivara Tribidraga su biljke tretirane kombinacijama virusnih sojeva II,III i I,II,III u kojima je zabilježeno statistički značajno povećanje sadržaja MDA u odnosu na kontrolu.

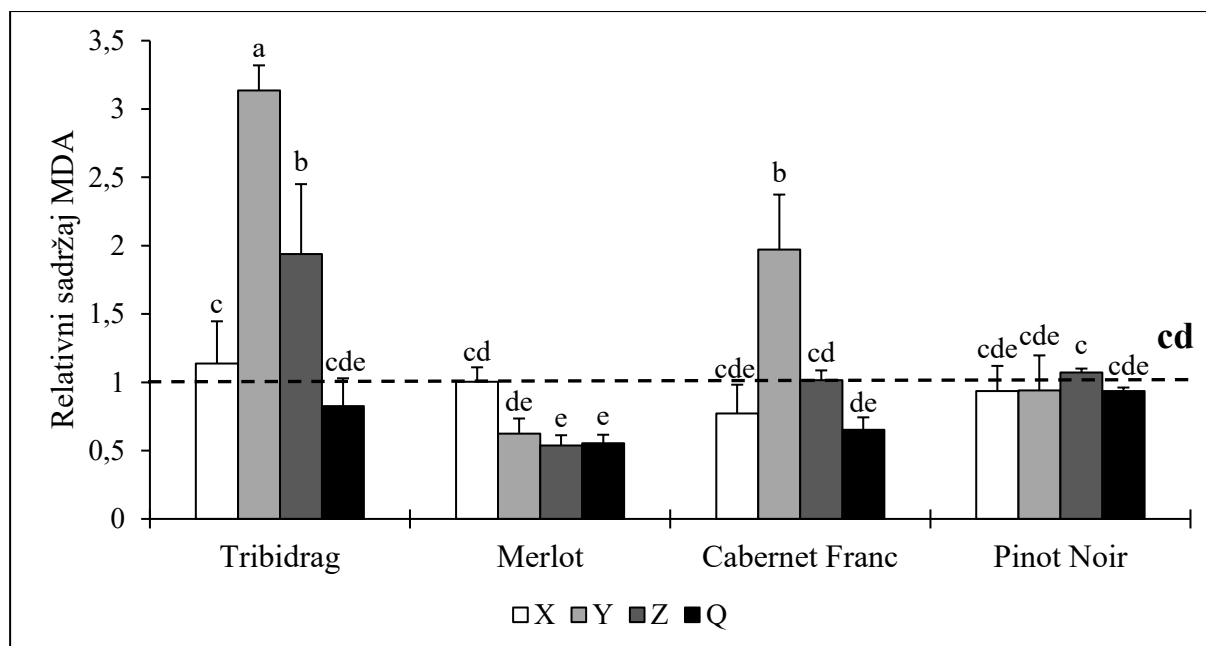
Rezultati vezani uz učinak GLRaV-3 u kombinaciji s različitim virusima vinove loze na sadržaj MDA u četiri ispitana kultivara prikazani su na slici 10. Statistički značajno smanjenje sadržaja MDA zabilježeno je kod kultivara Merlot tretiranog poljskim izolatima virusa označenim kao



Z i Q. Također, statistički značajno povećanje sadržaja MDA u odnosu na kontrolu zabilježeno je samo u listovima kultivara Tribidrag tretiranog poljskim izolatima virusa označenim kao Y i Z te u listovima kultivara Cabernet Franc tretiranog poljskim izolatima virusa označenim kao Y. Preostali tretmani rezultirali su slabijim povećanjem ili smanjenjem sadržaja MDA u kultivarima vinove loze u odnosu na kontrolu, ali te promjene nisu bile od statističkog značaja.



**Slika 9.** Relativni sadržaj MDA u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj MDA u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „cd“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

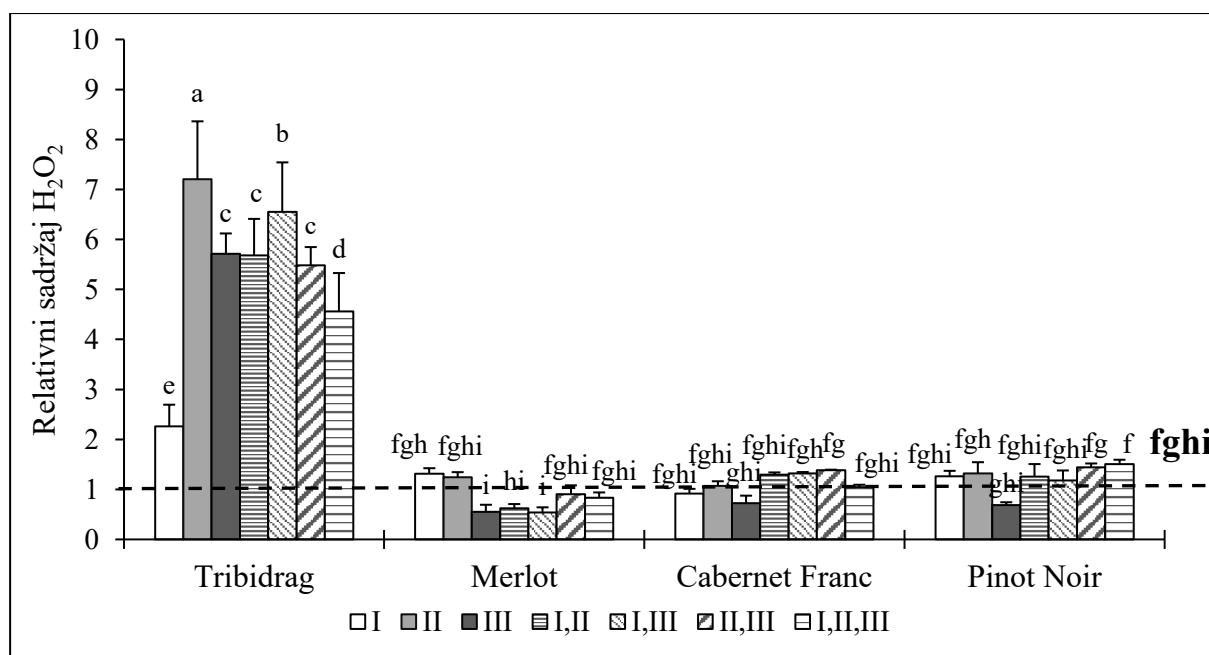


**Slika 10.** Relativni sadržaj MDA u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima X, Y, Z i Q koji sadrže različite viruse vinove loze. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj MDA u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „cd“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

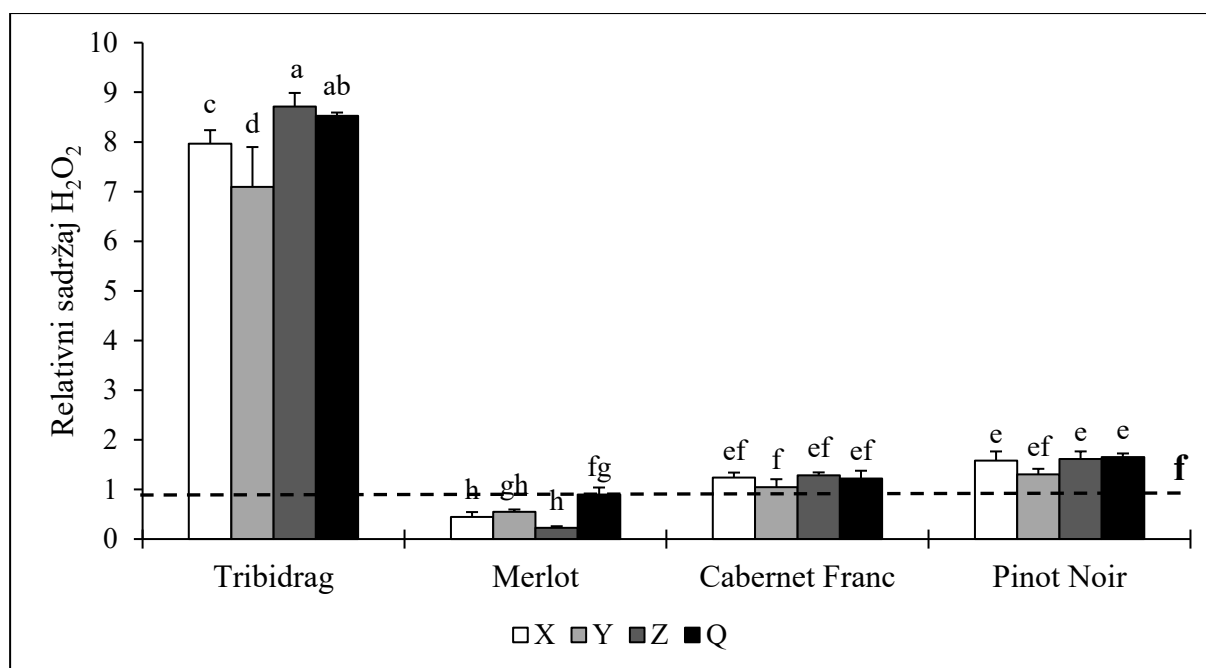
### 3.4. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj vodikovog peroksida

Rezultati učinka GLRaV-3 virusnih izolata i njihovih kombinacija na sadržaj vodikovog peroksida u četiri kultivara prikazani su na slici 11. Statistički značajno povećanje sadržaja  $H_2O_2$  u odnosu na kontrolu zabilježeno je u listovima kultivara Tribidrag pri svim primijenjenim tretmanima. Sadržaj tog signalnog metabolita u listovima ostalih kultivara pri svim tretmanima bio je sličan kontrolnim vrijednostima.

Vrlo slični rezultati uočeni su u listovima kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima (Slika 12). Višestruko povećanje sadržaja  $H_2O_2$  u odnosu na kontrolu zabilježeno je u listovima kultivara Tribidrag pri svim primijenjenim tretmanima. Značajan porast  $H_2O_2$  u odnosu na kontrolu također je zabilježen u listovima kultivara Pinot Noir tretiranog izolatima X, Y i Q. No, porast tog metabolita je znatno manji u usporedbi s onim utvrđenim u listovima kultivara Tribidrag. U listovima kultivara Merlot tretiranog virusnim izolatima X, Y i Z utvrđeno je statistički značajno smanjenje sadržaja  $H_2O_2$  u odnosu na kontrolu. Sadržaj  $H_2O_2$  u listovima kultivara Cabernet Franc pri svim tretmanima bio je sličan kontrolnim vrijednostima.



**Slika 11.** Relativni sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „fghi“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).



**Slika 12.** Relativni sadržaj  $H_2O_2$  u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima X, Y, Z i Q koji sadrže različite viruse vinove loze. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj  $H_2O_2$  u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „f“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

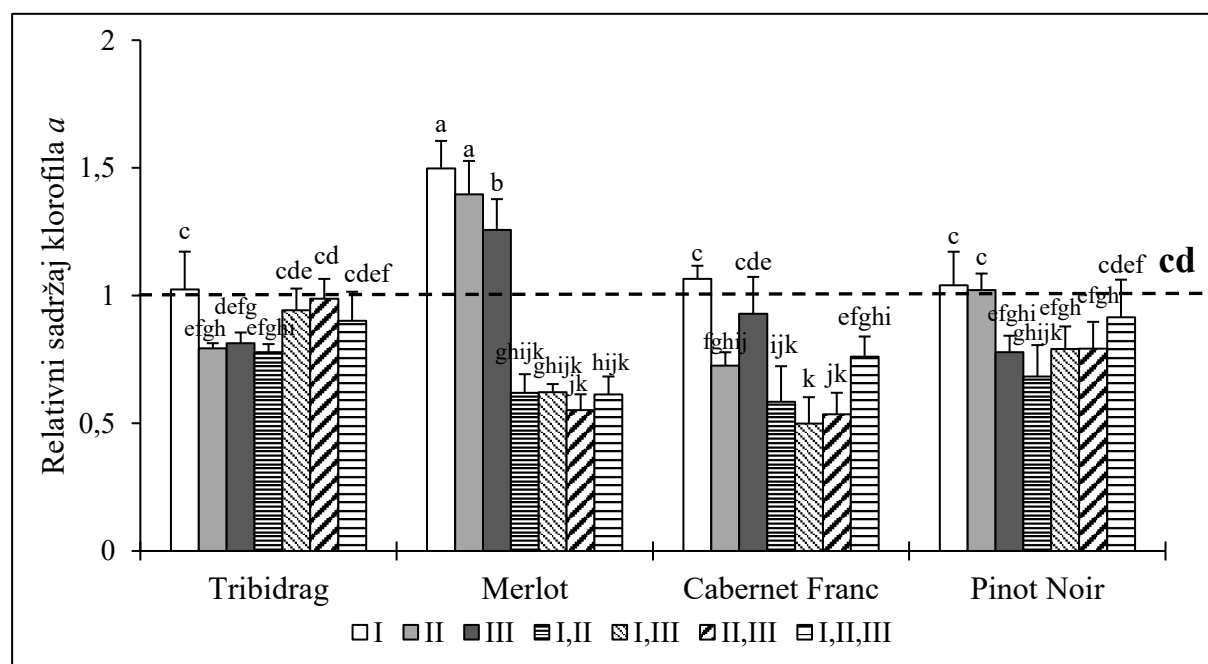
### 3.5. Učinak GLRaV-3 i poljskih inokuluma na sadržaj fotosintetskih pigmenta

#### 3.5.1. Promjene u sadržaju klorofila *a*

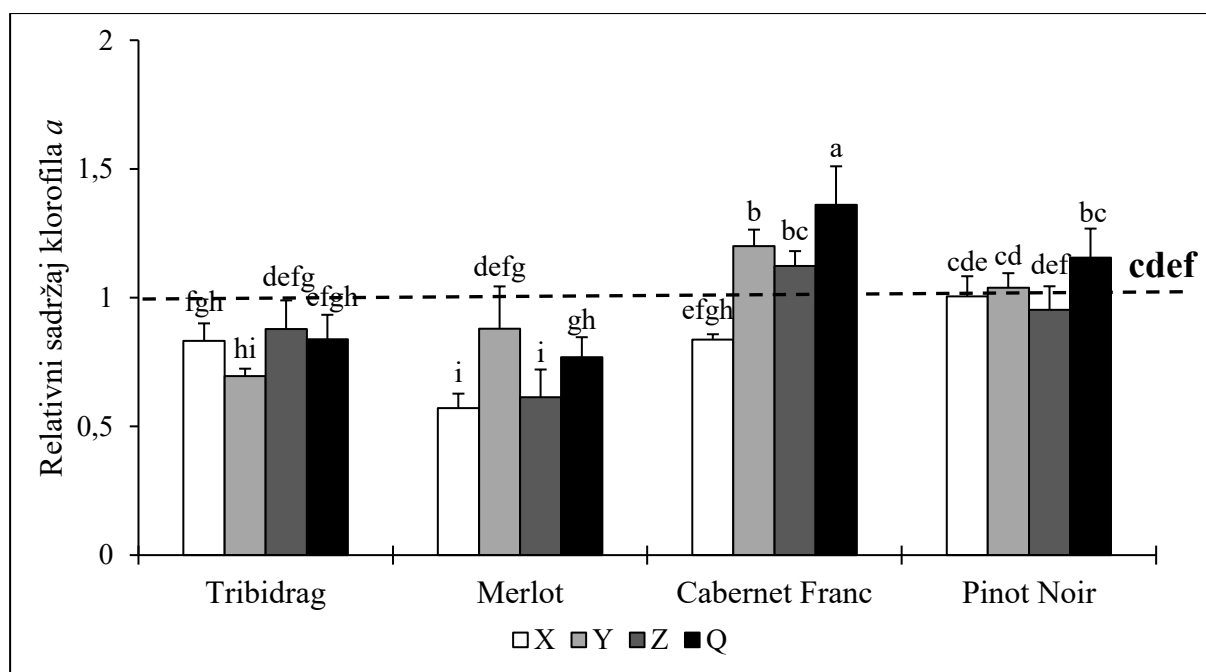
Učinak različitih sojeva GLRaV-3 i njihovih kombinacija na sadržaj klorofila *a* u testnim kultivarima vinove loze prikazan je na slici 13. Vidljivo je da se sadržaj tog pigmenta u listovima kultivara Tribidrag uglavnom nije bitno razlikovao od kontrole; statistički značajno smanjenje sadržaja klorofila *a* u tom kultivaru uočeno je pri tretmanima virusnim sojem II i kombinaciji virusnih sojeva I i II. Učinak svih kombinacija virusnih sojeva na sadržaj klorofila *a* u listovima kultivara Merlot i Cabernet franc bio je sličan. Naime, pri tim je tretmanima u oba spomenuta kultivara uočen značajan pad sadržaja klorofila *a* u odnosu na kontrolu. S druge strane, tretman kultivara Merlot s pojedinim virusnim sojevima GLRaV-3 uzrokovao je statistički značajno povećanje sadržaja klorofila *a* u odnosu na kontrolu. U listovima kultivara Cabernet Franc tretiranih pojedinim virusnim sojevima I i III nisu zabilježena odstupanja od kontrolnih vrijednosti, izuzev tretmana sa virusnim sojem II pri kojem je utvrđeno smanjenje tog pigmenta. Što se tiče kultivara Pinot Noir, virusni sojevi I i II kao i kombinacija tri soja nisu

utjecali na sadržaj klorofila *a*, a svi ostali tretmani su u listovima tog kultivara doveli do statistički značajnog smanjenja sadržaja tog pigmenta u odnosu na kontrolu.

Što se tiče učinka poljskih izolata na sadržaj klorofila *a*, on nije bio značajan za kultivare Pinot Noir i Tribidrag (Slika 14). Jedina statistički značajna razlika zabilježena je u listovima tog kultivara tretiranog poljskim inokulumom Y, gdje je sadržaj klorofila *a* bio statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu. Sadržaj tog pigmenta u kultivaru Merlota bio je statistički značajno smanjen pri tretmanima X, Z i Q, a nije se razlikovao od kontrole pri tretmanu Y. U listovima kultivara Cabernet Franc tretman s izolatom X nije bitno utjecao na sadržaj klorofila *a*, a ostali poljski virusni izolati su uzrokovali povećanje sadržaja tog pigmenta (koje nije bilo statistički značajno u slučaju izolata Z).



**Slika 13.** Relativni sadržaj klorofila *a* u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj klorofila *a* u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „cd“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

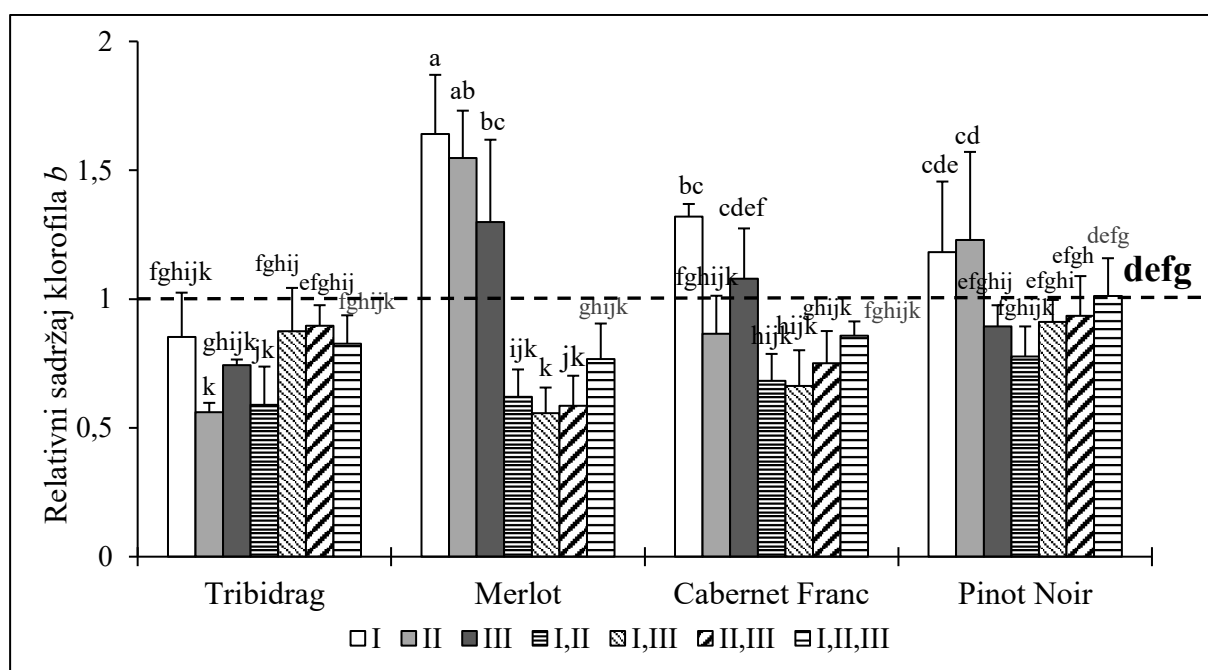


**Slika 14.** Relativni sadržaj klorofila *a* u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima X, Y, Z i Q koji sadrže različite viruse vinove loze. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj klorofila *a* u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „cdef“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

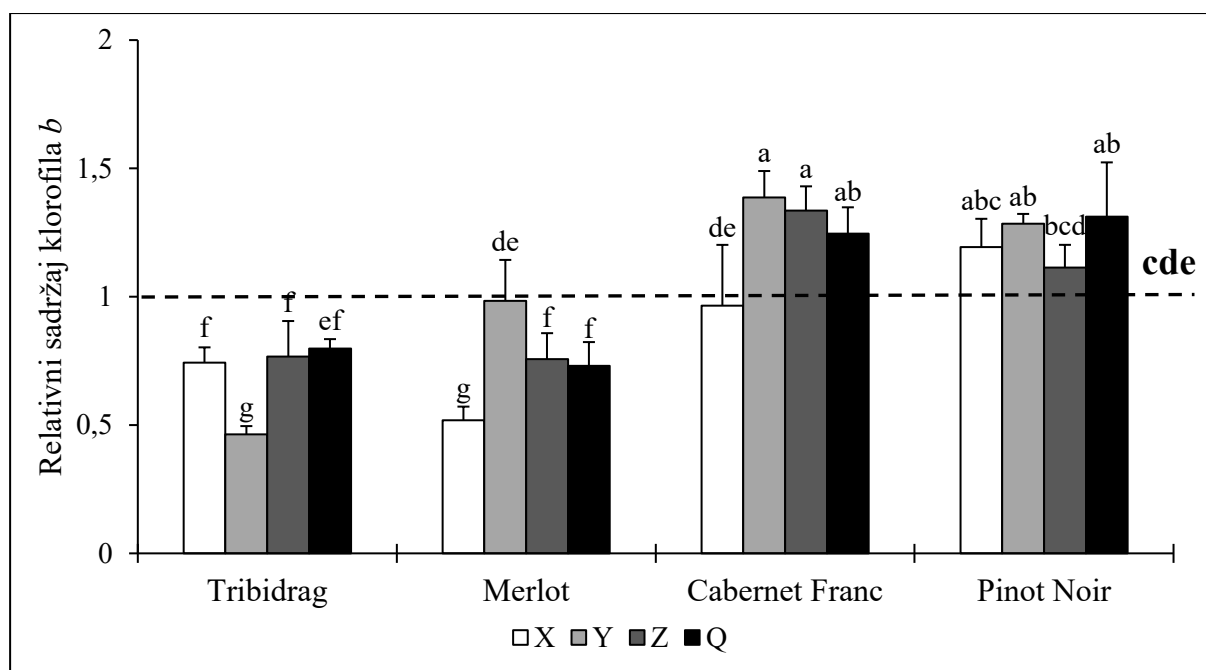
### 3.5.2. Promjene u sadržaju klorofila *b*

Negativan učinak čistih sojeva GLRaV-3 i njihovih kombinacija na sadržaj klorofila *b* u listovima kultivara Tribidrag uočen je samo pri tretmanima sojem II i kombinacijom sojeva I,II gdje je zabilježeno statistički značajno smanjenje sadržaja tog pigmenta u odnosu na kontrolu (Slika 15). Dinamika promjena u sadržaju klorofila *b* u listovima kultivara Merlot i Cabernet Franc bila je slična onoj koja je uočena za sadržaj klorofila *a*. Što se tiče kultivara Merlot, tretmani pojedinim sojevima rezultirali su značajnim povećanjem sadržaja klorofila *b*, dok su kombinacije tri soja uglavnom izazvale statistički značajno smanjenje sadržaja tog pigmenta. Kod kultivara Cabernet Franc, uzorci koji pokazuju statistički značajne razlike od kontrolnih vrijednosti su tretirani virusnim sojem I gdje je zabilježen porast sadržaja klorofila *b*, a uzorci tretirani kombinacijom virusnih sojeva I,II i I,III pokazuju smanjenje sadržaja tog pigmenta u odnosu na kontrolne vrijednosti. Naposljetku, u tretiranim biljkama kultivara Pinot Noir zamijećeno je lagano smanjenje ili povećanje sadržaja klorofila *b*, ali te promjene nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolu (Slika 15).

Što se tiče učinka poljskih izolata, sadržaj klorofila *b* bio je statistički značajno smanjen pri gotovo svim tretmanima kultivara Tribidrag i Merlot. Međutim, kod preostala dva kultivara, Cabernet Franc i Pinot Noir, sadržaj tog pomoćnog pigmenta je pri gotovo svim tretmanima bio statistički značajno povećan (Slika 16). Iznimke u kojima kod tih kultivara nije zabilježena promjena u sadržaju klorofila *b* od statističkog značaja je pri tretmanu X te kod Pinot Noira pri tretmanu Z.



**Slika 15.** Relativni sadržaj klorofila *b* u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj klorofila *b* u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „defg“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).



**Slika 16.** Relativni sadržaj klorofila *b* u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima X, Y, Z i Q koji sadrže različite viruse vinove loze. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj klorofila *b* u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „cde“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

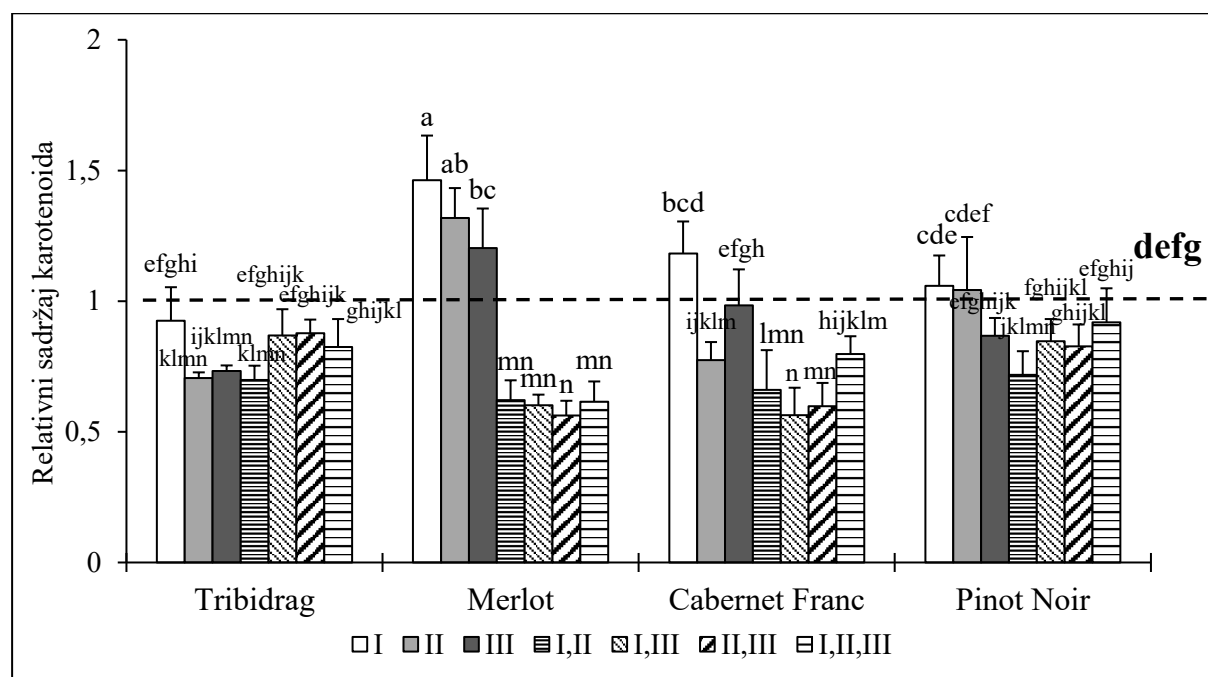
### 3.5.3. Promjene u sadržaju ukupnih karotenoida

Slično kao i kod sadržaja klorofila *b*, negativan učinak čistih sojeva GLRaV-3 i njihovih kombinacija na sadržaj karotenoida u listovima kultivara Tribidrag uočen je pri tretmanima sojem II, sojem III i kombinacijom sojeva I,II gdje je zabilježeno statistički značajno smanjenje sadržaja tog pigmenta u odnosu na kontrolu (Slika 17). Tretmani pojedinim virusnim sojevima i njihovim kombinacijama u kultivarima Merlot i Cabernet franc izazvali su istu dinamiku promjena u sadržaju karotenoida kao i kod klorofila *a*. Kod kultivara Pinot Noir, jedini uzorci koji se statistički značajno razlikuju od kontrole tretirani su kombinacijom virusnih sojeva I,II i pokazuju smanjenje sadržaja karotenoida u odnosu na kontrolu.

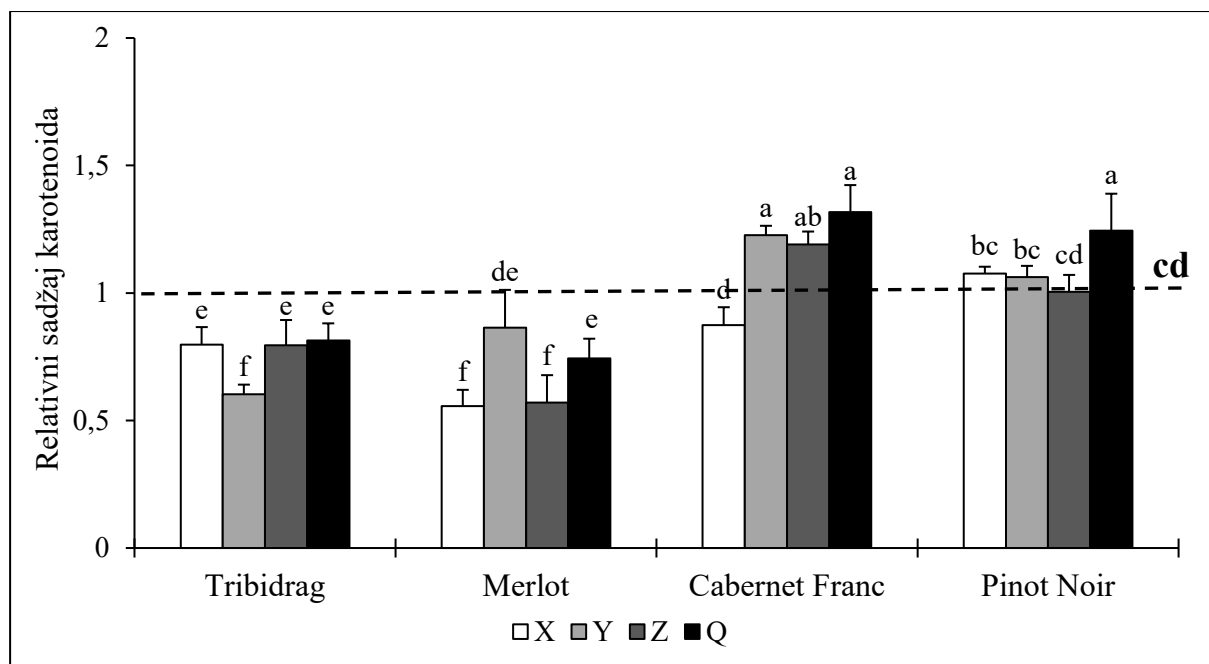
Što se tiče učinka poljskih izolata, sadržaj karotenoida statistički značajno je smanjen pri gotovo svim tretmanima kultivara Tribidrag i Merlot sa iznimkom tretmana Y kod kultivara Merlot gdje nije zabilježena razlika u sadržaju karotenoida od statističkog značaja (Slika 18). Međutim, kod kultivara Cabernet Franc sadržaj tog pomoćnog pigmenta je pri gotovo svim tretmanima bio statistički značajno povećan, izuzev kod tretmana X gdje je sadržaj karotenoida



bio sličan kontroli (Slika 18). Primijenjeni tretmani nisu pokazali učinak na sadržaj karotenoida u kultivaru Pinot Noir, izuzev kod tretmana Q gdje je zabilježeno bitno povećanje sadržaja tih pomoćnih pigmenata.



**Slika 17.** Relativni sadržaj ukupnih karotenoida u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj karotenoida u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „defg“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).



**Slika 18.** Relativni sadržaj ukupnih karotenoida u listovima četiri kultivara vinove loze tretiranih poljskim virusnim izolatima X, Y, Z i Q koji sadrže različite viruse vinove loze. Vrijednosti su izražene u odnosu na sadržaj karotenoida u kontrolnim biljkama. Kontrolne vrijednosti su normalizirane na vrijednost 1 i na ovom grafičkom prikazu označene su kao „cd“. Iznad stupaca označena je standardna devijacija. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0.05$ ).

## 4. Rasprava

### 4.1. Utjecaj pojedinih virusnih sojeva GLRaV-3 i njihovih kombinacija na vinovu lozu

Jedan od ciljeva ovog rada bilo je istražiti učinak pojedinih virusnih sojeva GLRaV-3 i njihovih kombinacija na oksidacijski stres u vinovoj lozi, proučavanjem pet odabranih parametara – ukupnog sadržaja topivih proteina, aktivnost SOD, sadržaja MDA, sadržaja H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i sadržaja fotosintetskih pigmenata. Za ispitivanje fizioloških promjena u listovima vinove loze uslijed infekcije sojevima GLRaV-3, korištena su četiri kultivara; Tribidrag, Merlot, Cabernet Franc i Pinot Noir. Na temelju rezultata utvrđeni su trendovi različitog stupnja osjetljivosti kultivara na biotički stres. Tribidrag je zabilježen kao kultivar s najizraženijim fiziološkim odgovorom na infekciju kako čistim sojevima GLRaV-3 tako i njihovim kombinacijama. Slabiji stres u odgovoru na sojeve GLRaV-3 i njihove kombinacije pokazuje Merlot, a stresni odgovor je izostao ili bio vrlo slab u preostala dva kultivara Cabernet Franc i Pinot Noir.

Što se tiče ukupne količine proteina, infekcija vinove loze sojevima virusa GLRaV-3 (bilo pojedinim sojevima ili njihovim kombinacijama) je u kultivarima Cabernet Franc i Pinot Noir uglavnom dovela do povećanja sadržaja proteina, a u kultivaru Merlot nije bitno utjecala na njihov sadržaj (izuzev pri tretmanu sojem I gdje je utvrđena smanjena količina proteina). No, u kultivaru Tribidrag je pri gotovo svim tretmanima utvrđena uglavnom smanjena količina proteina, što je zabilježeno kao jedan od fizioloških odgovora na biotički stres u nekoliko znanstvenih istraživanja. Bertamini i sur. (2004) utvrdili su smanjenu količinu topivih proteina u listovima vinove loze inficirane GLRaV-3, a kao moguće uzroke navode oštećenja u kloroplastima ili inhibiciju sinteze proteina. Smanjenje količine topivih proteina uslijed biotičkog stresa utvrđeno je i u listovima kultivara Merlot, dok takav stresni odgovor izostaje kod preostala dva kultivara Cabernet Franc i Pinot Noir. U ovom radu smanjena količina proteina u listovima kultivara Tribidrag mogla bi biti rezultat smanjene sinteze proteina, posebice onih koji su vezani uz funkcioniranje kloroplasta. Naime, u ovom radu zabilježeno je smanjenje klorofila *a*, *b* i karotenoida, koje međutim nije bilo toliko izraženo da bi se moglo smatrati jedinim uzrokom smanjene količine topivih proteina. Detaljnija istraživanja sinteze proteina i moguće inhibicije njihove sinteze uzrokovane virusom bi se trebala provesti kako bi se utvrdio utjecaj GLRaV-3 na količinu topivih proteina. Rezultati nam također pokazuju da je tretman kombinacijom sva tri soja virusa GLRaV-3 doveo do povećanja sadržaja proteina u listovima kultivara Tribidrag, a tretman kombinacijom sojeva II i III nije bitno utjecao na sadržaj tog parametra. Stoga bi zanimljivo bilo detaljnije istražiti utjecaj kombiniranih infekcija u kultivaru Tribidrag kako bi se utvrdilo dolazi li do određene rezistencije u tom kultivaru na navedenu virusnu kombinaciju.

Nadalje, mjerenjem aktivnosti superoksid dismutaze, zabilježen je trend koji je u skladu sa prijašnjim parametrom. Najsnažniji odgovor SOD je zabilježen u kultivaru Tribidrag tretiranim čistim sojevima virusa i određenim kombinacijama virusnih sojeva, dok je povećanje aktivnosti tog enzima zabilježeno i u listovima kultivara Merlot i Cabernet Franc samo pri pojedinim kombiniranim tretmanima sa sojevima virusa GLRaV-3. Slični rezultati povećanja aktivnosti SOD zabilježili su Cui i sur. (2016) pri proučavanju kombiniranog stresa virusne infekcije i vodnog stresa na vinovu lozu. U navedenom radu utvrđeno je tek blago povećanje aktivnosti SOD u odgovoru na virusnu infekciju, dok u kombinaciji s vodnim stresom biljka značajno potiče enzimske sustave uklanjanja slobodnih radikala, poput povećanja aktivnosti SOD i drugih antioksidativnih enzima. Također, Hančević i sur. (2017) navode pojačanu aktivnosti SOD kao jednu od glavnih fizioloških promjena u dugogodišnjoj kompatibilnoj infekciji citrusa meksičke limete s tristeza virusom. Međutim, u ovom radu infekcija čistim sojevima virusa GLRaV-3 ili njihovim kombinacijama uglavnom nije uzrokovala značajne promjene u aktivnosti SOD u listovima kultivara Merlot, Cabernet Franc i Pinot Noir što potencijalno ukazuje na izostanak stresa u tim kultivarima vinove loze.

Rezultati mjerenja količine malondialdehida u listovima tretiranih kultivara Cabernet Franc i Pinot Noir ukazuju na nepromijenjenu razinu lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolne vrijednosti tog parametra. No, vrijednosti MDA ni u listovima kultivara Tribidrag (izuzev pri kombiniranim tretmanima sa sojevima II, III i I,II,III gdje je utvrđeno povećanje) i Merlot nisu bile povećane uslijed virusne infekcije, dapače bile su čak i niže u usporedbi s kontrolnim vrijednostima, što znači da GLRaV-3 nije uzrokovao lipidnu peroksidaciju u ispitivanim listovima ovih kultivara. Ti rezultati također upućuju na zaključak da su vodikov peroksid i drugi ROS bili efikasno eliminirani iz biljke, čime je manja i vjerojatnost stvaranja hidroksilnih radikala i posljedično tome i lipidne peroksidacije. Te pretpostavke je potrebno potvrditi odgovarajućim analizama enzimske aktivnosti, ali možemo pretpostaviti da je došlo do indukcije enzima koji razgrađuju vodikov peroksid. U ovom radu značajno nakupljanje MDA je utvrđeno samo u listovima kultivara Tribidrag tretiranog kombinacijama virusnih sojeva II, III i I,II,III što upućuje na povećanu razinu lipidne peroksidacije. U objavljenoj literaturi, istraživanja o virusnoj indukciji akumulacije MDA su vrlo oskudna. Cui i sur. (2016) ustanovili su da infekcija virusom uvijenosti lista vinove loze ne uzrokuje akumulaciju MDA, dok su Debona i sur. (2012) zabilježili povećanje akumulacije MDA neposredno nakon inokulacije listova pšenice patogenom *Pyricularia oryzae*. Nadalje, kao jedno od potencijalnih objašnjenja za niže vrijednosti MDA, autori navode pojačanu aktivnost određenih enzima koji

kataliziraju reakciju prevođenja vodikovog peroksida u vodu, kao što su askorbat peroksidaza ili katalaza pri povećanoj akumulaciji vodikovog peroksida. Također, vrijedno je naglasiti kako se u posljednje vrijeme dovodi u pitanje vjerodostojnost analize MDA kao i interpretacija zabilježenih i objavljenih rezultata. Morales i Munné-Bosch (2019) ističu nedostatke ove analize, ali i naglašavaju kako je MDA mahom korišten kao alat za procjenu oksidativnog oštećenja biljaka. Autori zaključuju da taj parametar možemo smatrati pouzdanim u slučajevima kada je utvrđena jaka akumulacija MDA kroz dulji vremenski period, što nedvosmisleno ukazuje na visok stupanj oksidacije membraniskih lipida i nerijetko dovodi do nepopravljivih oštećenja i naposljetku smrti biljke. Međutim, u epizodičnim akumulacijama MDA, vjerojatnije je da biljke koriste ovu taktiku kao metodu signalizacije u svrhu pojačane produkcije ROS, što omogućava biljkama kvalitetnije podnošenje stresa bez pretjeranih oksidativnih oštećenja. U ovom radu, predstavljeni rezultati o indikatoru lipidne peroksidacije pokazuju da ispitivane biljke u vrijeme uzorkovanja nisu bile izložene snažnom oksidativnom stresu, što je u skladu sa opažanjima Naidu i sur. (2015) te Halldorson i Keller (2018) koji su zaključili da vinova loza prolazi kroz najstresniji period u vrijeme dozrijevanja plodova („veraison“) kada i simptomi bolesti postaju najizraženiji.

Čisti virusni izolati uzrokovali su promjene i u relativnom sadržaju vodikovog peroksida u ispitivanim kultivarima. Gotovo svi tretmani su u listovima kultivara Tribidrag uzrokovali značajnu akumulaciju vodikovog peroksida, dok se sadržaj tog metabolita u listovima preostala tri kultivara nije značajno razlikovao u odnosu na odgovarajuće kontrolne vrijednosti. Zabilježene promjene vodikovog peroksida u listovima kultivara Tribidrag u skladu su s rezultatima Cui i sur. (2016). Diaz-Vivancos i sur. (2006), proučavanjem dugogodišnje infekcije marelica s virusom šarke šljive, ustanovili su da pri kompatibilnim interakcijama povećana količina vodikovog peroksida kroz dulji vremenski period dovodi do pojačane lipidne peroksidacije i oksidacije proteina. S obzirom da je Tribidrag jedini kultivar u kojem je utvrđeno značajno povećanje relativne količine vodikova peroksida u odgovoru na pojedinačne sojeve GLRaV-3 i gotovo sve kombinacije, a paralelno je s tim detektirano drastično smanjenje količine toplivih proteina, ali bez izražene lipidne peroksidacije, možemo pretpostaviti da je vodikov peroksid kao signalna molekula potaknuo sintezu antioksidacijskih enzima. Kao što je već spomenuto, jedini izuzetak kod kultivara Tribidrag se odnosi na kombinirane tretmane sojevima virusa GLRaV-3 II,III i I,II,III pri kojima je utvrđen povećani opseg lipidne peroksidacije uz istovremeno povećanu produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ali i nepromijenjenu aktivnost enzima SOD. Takvi rezultati ukazuju na nastanak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nekim drugim putem, moguće kao posljedica

aktivnosti membranskih NADPH oksidaza ili apoplastnih peroksidaza, a moguće i lipoksigenaza i drugih oksidaza (Camejo i sur. 2016).

Što se tiče utjecaja virusa GLRaV-3 na sadržaj fotosintetskih pigmenata, vidljiv je relativno ujednačen trend u promjeni sadržaja klorofila i karotenoida kod pojedinih kultivara. Većina tretmana je kod svih ispitivanih kultivara (izuzev kulivara Merlot tretiranog čistim izolatima gdje je zabilježeno povećanje fotosintetskih pigmenata) uzrokovala u većoj ili manjoj mjeri smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata ili nije bitno utjecala na njihov sadržaj. No, najveće smanjenje klorofila *a*, *b* i karotenoida zabilježeno je u listovima kultivara Merlot i Cabernet Franc tretiranih s kombinacijama sojeva virusa GLRaV-3. Obzirom da u listovima tih kultivara uglavnom nije utvrđeno jače oksidacijsko oštećenje membranskih lipida, moguće je da je uslijed infekcije došlo do oksidacijskog oštećenja proteina u kloroplastima. Stoga, potrebna su detaljnija istraživanja o produkciji i utjecaju različitih ROS kako bi se razotkrio uzrok jačeg smanjenja količine fotosintetskih pigmenata u tretmanima kombiniranih infekcija kod kultivara Merlot i Cabernet Franc. Slični rezultati utjecaja virusa uvijenosti vinove loze na sadržaj pigmenata su u skladu s literaturnim podacima (Bertamini i sur. 2004, Endeshaw i sur. 2014). Iako je smanjenje fotosintetskih pigmenata relativno slabo kod većine kultivara tretiranih čistim sojevima GLRaV-3, potrebno je naglasiti da je to odraz fizioloških promjena u listovima u trenutku uzorkovanja. Međutim, u literaturi su zabilježene najsnažnije promjene u količini fotosintetskih pigmenata u periodu dozrijevanja vinove loze, odnosno prilikom pojavljivanja makroskopskih simptoma bolesti (Kyselakova i sur. 2013).

U ovom je radu svaki kultivar pokazao jedinstveni odgovor na infekcije različitim sojevima GLRaV-3, ali je negativni utjecaj infekcije najizraženiji kod kultivara Tribidrag što ga čini osjetljivijim od preostala tri kultivara. Kultivari Merlot, Cabernet Franc i Pinot Noir u ovom radu pokazuju minimalne promjene u odgovoru na biotički stres. No, pri interpretaciji rezultata mora se uzeti u obzir da su u ovom istraživanju korišteni kultivari vinove loze na svom korijenju, a ne na podlogama što je uobičajeno u vinogradarstvu. Također, uzevši u obzir da su biljke bile mlade i izlaganje virusima je bilo relativno kratko (period od četiri mjeseca), a vinova loza je višegodišnja biljna kultura, ne čudi izostanak promjena kod većine kultivara. Indikativno je što su promjene najznačajnije u kultivaru Tribidrag koji je naš autohton kultivar i nije biološki indikator za GLRaV-3 kao ostali kultivari. S obzirom da su literaturni podaci o osjetljivosti različitih kultivara na biotički stres vrlo oskudni, potrebna su ekstenzivna istraživanja kako bi se produbila saznanja o razlikama u fiziološkim odgovorima između

kultivara. Takva istraživanja mogu potencijalno biti korisna u vitikulturi, pri odabiru rezistentnijih kultivara za područja s visokom stopom inficiranosti vinove loze.

### 4.2. Utjecaj poljskih inokuluma na vinovu lozu

Osim istraživanja učinka čistih sojeva virusa GLRaV-3 i njihovih kombinacija na kultivare vinove loze, cilj ovog rada bio je istražiti i učinak kombinacija virusa, u obliku poljskih inokuluma, na testne kultivare. Opaženi trendovi osjetljivosti kultivara na oksidacijski stres uslijed infekcije poljskim inokulima, naizgled prate trendove kod kultivara tretiranih GLRaV-3 sojevima. Naime, na temelju rezultata može se primijetiti da je Tribidrag najosjetljiviji kultivar, iako se i kultivar Merlot pokazao razmjerno osjetljivim dok su Cabernet Franc i posebno Pinot Noir pokazale manju osjetljivost na zarazu. Kod kultivara Tribidrag je pri svim tretmanima zabilježena pojačana akumulacija vodikovog peroksida i smanjena količina fotosintetskih pigmenata, posebice klorofila *b* i karotenoida. Međutim, tretman s Y i Z poljskim inokulima izazvao je u listovima tog kultivara i bitno povećanje sadržaja proteina i MDA, a tretman s Y inokulumom je izazvao najveće smanjenje fotosintetskih pigmenata. Razlika između Y poljskog inokuluma i preostala tri tretmana prisutnost je GLRaV-1. Prema istraživanjima Cretazzo i sur. (2010) i Moutinho-Pereira i sur. (2012), kombinirane infekcije GLRaV-1 i GLRaV-3 u vinovoj lozi predstavljaju značajan biotički stres koji je u trogodišnjem periodu drastično utjecao na smanjenje prinosa. U ovom istraživanju, akumulacija vodikovog peroksida u jedinkama Tribidraga vrlo je izražena što otvara pitanja o kompatibilnosti samih infekcija i utjecaju korištenih virusa na ovu autohtonu vrstu. Naime, Tribidrag je autohtona hrvatska vinova loza čije se područje rasprostranjenosti značajno smanjilo kroz povijest što može ukazivati na nedostatak izloženosti ovog kultivara nekim od korištenih virusa, iako bi moglo ukazivati na suprotno tj. na izloženost ovog kultivara virusima koji su u konačnici smanjili područje uzgoja kultivara Tribidrag. Madhusudhan i sur. (2009) navode da pojačana akumulacija endogenog vodikovog peroksida i pojačana oksidacija proteina mogu predstavljati kvalitetne parametre za razlikovanje kompatibilnih od nekompatibilnih interakcija između domaćina i patogenog organizma. Također, pri stresnim uvjetima, pojačana produkcija ROS korisna je za indukciju obrambenog mehanizma, što kod biotičkog stresa ukazuje na prepoznavanje patogenog organizma i rezultira nekompatibilnim odnosom s domaćinom (Foyer i Noctor 2003). Moguće je da se upravo to dogodilo kod kultivara Tribidrag: prepoznavanje patogena, i pojačana produkcija ROS za razliku od ostalih korištenih kultivara-bioloških indikatora koji, moguće, zbog smanjenog odgovora na virusnu infekciju u konačnici bolje razvijaju simptome bolesti zbog čega se i koriste kao biološki indikatori za GLRaV-3. Kako bi



se razotkrila potencijalna nekompatibilnost kultivara Tribidrag s nekim od korištenih virusa, potrebna su detaljnija istraživanja koja bi uzela u obzir bogatu povijest ovog kultivara, njegovu izloženost korištenim virusima kao i dublje razumijevanje utjecaja različitih virusa na fiziologiju ovog specifičnog kultivara.

Što se tiče kultivara Merlot, vrijednosti parametara oksidacijskog stresa (ukupni topivi proteini, aktivnost SOD, sadržaj MDA i vodikovog peroksida) slični su kontrolnim vrijednostima, pa se prema tim rezultatima može zaključiti da nije došlo do oksidacijskog stresa. No, istovremeno je u tom kultivaru uslijed infekcije poljskim izolatima zabilježeno smanjenje sadržaja fotosintetskih pigmenata koje je bilo značajno kod tretmana X, Z i Q. Do smanjenja fotosintetskih pigmenata moglo je doći djelovanjem singletnog kisika koji nastaje u reakcijskom središtu fotosistema II i antenskom kompleksu grana tilakoida prijenosom ekscitacijske energije s tripletnog stanja klorofila na molekularni kisik (Dogra i Kim 2020). Poznato je naime da singletni kisik kao jaki oksidans može izazvati ireverzibilno oštećenje susjednih molekula kao što su lipidi, proteini i karotenoidi, a posebno su osjetljive molekule koje sadrže dvostruke veze primjerice u nezasićenim masnim kiselinama, u aromatskim aminokiselinama, u bazi gvanin u DNA i tiolnim grupama (Dogra i Kim 2020). U ovom radu možemo pretpostaviti da je singletni kisik doveo do smanjenja sadržaja karotenoida u kultivaru Merlot tretiranom poljskim izolatima, a moguće je da je izazvao i oksidacijsko oštećenje proteina u reakcijskom središtu fotosistema II proteina, poglavito D1 (Dogra i Kim 2020).

Na temelju mjerenih parametara može se zaključiti da su kultivari Cabernet Franc i Pinot Noir slični u odgovoru na infekciju poljskim izolatima, izuzev nekoliko razlika. Naime, korišteni poljski tretmani uzrokovali su drastično smanjenje količine ukupnih topivih proteina u listovima Cabernet Franc kultivara. Značajan utjecaj virusnih infekcija na smanjenje količine topivih proteina dobro je istražen (Cui i sur. 2016), a Bertamini i sur. (2004) pripisuju smanjenje količine topivih proteina ometanoj sintezi ribuloze 1,5-bifosfata. Nadalje, tretmani izolatima Y i Q su u kultivaru Cabernet Franc uzrokovali pojačanu aktivnost SOD, dok je tretman Y uzrokovao i pojačanu lipidnu peroksidaciju u ovom kultivaru, što je vidljivo iz povišene količine MDA. Međutim, sadržaj svih mjerenih fotosintetskih pigmenata u listovima kultivara Cabernet Franc tretiranim poljskim virusnim izolatima Y, Z i Q bio je značajno povećan ili se nije promijenio u odnosu na kontrolne vrijednosti u slučaju tretmana s virusnim izolatima X. Ti rezultati moguće ukazuju na izostanak oksidacijskog oštećenja u kloroplastima listova kultivara Cabernet Franc tretiranog poljskim izolatima. Kod kultivara Pinot Noir tretman s poljskim izolatom Q je izazvao povećanje aktivnosti SOD te sadržaja klorofila *b* i karotenoida,

tretman s poljskim izolatom Y je doveo do povećanja saržaja proteina i klorofila *b* dok drugi testni poljski izolati uglavnom nisu doveli do bitnih promjena u vrijednostima mjerenih parametara. Navedeni poljski inokulumi koji su u kultivarima Cabernet Franc i Pinot Noir potaknuli oksidativni stres, sadržavali su GLRaV-1 (tretman Y) ili GLRaV-2 (tretman Q) što može ukazivati na određeni sinergijski utjecaj ovih srodnih virusa te pojačani stresni odgovor vinove loze. S obzirom da veliki postotak inficiranih vinovih loza u Hrvatskoj pokazuje miješane infekcije navedenim virusima (Vončina i sur. 2019), potrebna su detaljnija istraživanja kombiniranog učinka spomenutih srodnih virusa kako bi se jasnije razumio potencijalan sinergijski utjecaj GLRaV virusa.

Na kraju, saznanja dobivena u ovom radu mogu biti korištena kao smjernica za daljnja istraživanja utjecaja kombiniranih infekcija na fiziologiju vinove loze obzirom da su literaturni podatci o utjecaju kombiniranih infekcija na vinovu lozu vrlo limitirani.

## 5. Zaključak

## 5. Zaključak

Dobiveni rezultati pokazuju određene trendove utjecaja GLRaV-3 na korištene kultivare. Najsnažniji stresni odgovor, kako sa čistim sojevima virusa GLRaV-3 i njihovim kombinacijama, zabilježen je u kultivaru Tribidrag. Nadalje, kod kultivara Merlot zabilježene su kao posljedica virusne infekcije s GLRaV-3 negativne promjene u količini topivih proteina i fotosintetskih pigmenata, dok je kod preostala dva kultivara zabilježena minimalna promjena u količini fotosintetskih pigmenata bez snažnijih indikacija za pretrpljeni biotički stres.

Poljski inokulumi proizveli su sličan fiziološki odgovor u kultivara kao što je zabilježeno sa čistim GLRaV-3 sojevima, a Tribidrag se opet pokazao najosjetljivijim kultivarom. No, inokulumi koji su izazvali najizraženiji odgovor u testnim kultivarima su bili Y i Q koji između ostalih, sadrže viruse srodne GLRaV-3 virusu, a to su GLRaV-1 i GLRaV-2. Takav rezultat ukazuje na potencijalni sinergijski utjecaj GLRaV virusa.

Naposljetku, predstavljeno istraživanje pridonosi dosadašnjim saznanjima o odnosu GLRaV-3 virusa s vinovom lozom i ukazuje na kompleksnost interakcija između korištenih virusnih sojeva i različitih kultivara. Ovaj rad može predstavljati temelj za daljnja istraživanja koja će upotpuniti dostupna znanja o interakciji vinove loze i GLRaV-3, u svrhu kontroliranja negativnog utjecaja biotičkog stresa na vinovu lozu i kvalitetnije vinogradarske prakse.

## 6. Literatura

- Almeida, R. P., Daane, K. M., Bell, V. A., Blaisdell, G. K., Cooper, M. L., Herrbach, E., Pietersen, G. (2013): Ecology and management of grapevine leafroll disease. *Frontiers in Microbiology* 4: 159-171.
- 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 of Plant Science* 7: 382.
- Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014): Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1-32.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287
- Bell, V. A., Hedderley, D. I., Pietersen, G., & Lester, P. J. (2018): Vineyard-wide control of grapevine leafroll-associated virus 3 requires an integrated response. *Journal of Plant Pathology*, 100: 399-408
- Bradford M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Bertamini, M., Muthuchelian, K., Nedunchezian, N. (2004): Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. cv. Lagrein). *Journal of Phytopathology* 152: 145-152.
- Burger, J. T., Maree, H. J., Gouveia, P., Naidu, R. A. (2017): Grapevine leafroll-associated virus 3. U: Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., Fuchs, M. (Ur.); *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer, str.167-195.
- Camejo, D., Angel Guzman-Cedeno, A., Moreno, A. (2016): Reactive oxygen species, essential molecules, during plant - pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 103: 10-23.
- Cretazzo, E., Padilla, C., Carambula, C., Hita, I., Salmerón, E., Cifre, J. (2010): Comparison of the effects of different virus infections on performance of three Majorcan grapevine cultivars in field conditions. *Annals of Applied Biology* 156(1): 1-12.
- 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: 203.

- Daane, K. M., Almeida, R. P. P., Bell, V. A., Botton, M., Fallahzadeh, M., Mani, M., Miano, H. L., Sforza, R., Walton, V. M., Zaviezo, T. (2012): Biology and management of mealybugs in vineyards. U: Bostanian, N. J., Vincent, C., Isaacs, R. (ur.) *Arthropod Management in Vineyards*. Springer, str. 271-308.
- Debona, D., Rodrigues, F. Á., Rios, J. A., Nascimento, K. J. T. (2012): Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *Phytopathology* 102: 1121-112.
- Demidchik, V. (2015): Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109: 212-228
- 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(12): e0208862.
- Diaz-Vivancos, P., Rubio, M., Mesonero, V., Periago, P., Ros Barcelo, A., Martinez-Gomez, P., Hernandez, J. (2006): The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3813-3824.
- Dogra, V., Kim, C. (2020): Singlet oxygen metabolism: From genesis to signaling. *Frontiers in Plant Science* 10: Article 1640.
- Dolja, V. V., Kreuze, J. F., Valkonen, J. P. T. (2006): Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117(1): 38-51.
- Endeshaw, S.T., Sabbatini, P., Romanazzi, G., Schilder, A.C., Neri, D. (2014): Effects of grapevine leafroll associated virus 3 infection on growth, leaf gas exchange, yield and basic fruit chemistry of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Franc. *Scientia Horticulturae*. 17: 228-236.
- Engelbrecht, D. J., Kasdorf, G. G. F. (1990): Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* 22: 341-346.
- Espinoza, C., Medina, C., Somerville, S., Arce-Johnson, P. (2007): Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 58 (12): 3197-3212.

- Farmer, E. E., Mueller, M. J. (2013): ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annual Review of Plant Biology* 64: 429-450.
- Foyer, C., Lopezdelgado, H., Dat, J. F., Scott, I. M. (1997): Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100(2): 241-254.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2003): Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.
- Foyer, C. H. (2005): Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell Online* 17(7): 1866-1875.
- 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.
- Glazebrook, J. (2005): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227.
- Halldorson, M. M., Keller, M. (2018): Grapevine leafroll disease alters leaf physiology but has little effect on plant cold hardiness. *Planta* 248(5): 1201-1211.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219(1): 1-14.
- Hančević, K., Radić, T., Pasković, I., Urlić, B. (2017): Biochemical and physiological responses to long-term Citrus tristeza virus infection in Mexican lime plants. *Plant Pathology* 67(4): 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* 10(1): 17.
- Heath, R. L. & Packer, L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189- 198.
- Hernández, J. A., Gullner, G., Clemente-Moreno, M. J., Künstler, A., Juhász, C., Díaz-Vivancos, P., Király, L. (2015): Oxidative stress and antioxidative responses in plant-virus interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 94: 134-148.



- Karoglan Kontić, J., Preiner, D., Šimon, S., Zdunić, G., Poljuha, D. i Maletić, E. (2009): Sanitary Status of Croatian Native Grapevine Varieties. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74 (2): 99-103.
- Kyseláková, H., Sedlářová, M., Kubala, M., Nožková, V., Piterková, J., Luhová, L., Novák, O., Ilík, P. (2013): Reactive oxygen and nitrogen species and hormone signalling in systemic infection of pea by *Pea enation mosaic virus*. *Plant Protection Science* 49: 105-119.
- Lehto, K., Tikkanen, M., Hiriart, J. B., Paakkari, V., Aro, E. M. (2003): Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the Flavum strain of Tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 1135-1144.
- Ling, K. S., H. Y. Zhu, Gonsalves, D. (2004): Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine leafroll-associated virus 3, type member of the genus *Ampelovirus*. *Journal of General Virology* 85: 2099-2102.
- Lucas, W. J. (2006): Plant viral movement proteins: agents for cell to cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344: 169-184.
- Madhusudhan, K. N., Srikanta, B. M., Shylaja, M. D., Prakash, H. S., Shetty, H. S. (2009): Changes in antioxidant enzymes, hydrogen peroxide, salicylic acid and oxidative stress in compatible and incompatible host-tobamovirus interaction. *Journal of Plant Interactions* 4(3): 157-166.
- Maree, H. J., Freeborough, M. J., Burger, J. T. (2008): Complete nucleotide sequence of a South African isolate of grapevine leafroll-associated virus 3 reveals a 5'UTR of 737 nucleotides. *Archives of Virology* 153(4): 755-757.
- Maree, H. J., Almeida, R. P., Bester, R., Chooi, K. M., Cohen, D., Dolja, V. V., Fuchs, M. F., Golino, D. A., Jooste, A. E., Martelli, G. P., Naidu, R. A., Rowhani, A., Saldarelli, P., & Burger, J. T. (2013): Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in microbiology* 4: 138-158.
- Maree, H. J., Pirie, M. D., Oosthuizen, K., Bester, R., Rees, D. J. G., Burger, J. T. (2015): Phylogenomic analysis reveals deep divergence and recombination in an economically important grapevine virus. *PLOS ONE* 10(5): e0126819.
- Martelli, G. P. (2014): Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology* 96: 51-70
- Martelli, G. P., 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 in a Sicilian herbarium of the past century. *Vitis* 13: 329-335.
- Mondal R., Choudhuri, M. A. (1981): Role of hydrogen peroxide in senescence of excised leaves of rice and maize. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 176: 700-709.
- Morales, M., Munné-Bosch, S. (2019): Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology* 180(3): 1246-1250.
- 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(3): 237-249.
- Mukherjee S. P., Choudhuri M. A. (1981): Water stress – induced changes in glycolate metabolism in *Vigna* seedlings. *Indian Journal of Experimental Biology* 19: 666-668.
- 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 (9): 1172-1185.
- Naidu, R.A., Maree, H. J., Burger, J. (2015): Grapevine leafroll disease and associated viruses – A unique pathosystem. *Annual Review of Phytopathology* 53: 613-634.
- Namba, S., Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K., Terai, Y., Yano, R. (1979): Grapevine leafroll virus, a possible member of closteroviruses. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 45: 497-502.
- O’Hearn, J. S., Walsh, D. B. (2020): Effectiveness of imidacloprid, spirotetramat, and flupyradifurone to prevent spread of GLRaV-3 by grape mealybug, *Pseudococcus maritimus* (Hemiptera: Pseudococcidae). *Journal of Plant Diseases and Protection* 127: 805-809.
- Perez-Bueno, M. L., Ciscato, M., van de Ven, M., García-Luque, I., Valcke, R., Barón, M. (2006): Imaging viral infection: studies on *Nicotiana benthamiana* plants infected with the pepper mild mottle tobamovirus. *Photosynthesis Research* 90(2): 111-123.

- Rayapati, A.N., S. O'Neil, and D. Walsh. (2008): Grapevine leafroll disease. WSU Extension Bulletin. <http://whatcom.wsu.edu/ag/documents/smallfruit/eb2027e.pdf>
- Ricketts, K. D., Gomez, M. I., Atallah, S. S., Fuchs, M. F., Martinson, T. E., Battany, M. C., Bettiga, L. J., Cooper, M. L., Verdegaal, P. S., Smith, R. J. (2015): Reducing the economic impact of grapevine leafroll disease in California: identifying optimal disease management strategies. *American Journal of Enology and Viticulture* 66: 138-147.
- Sharma, P., Bhushan Jha, A., Shanker Dubey, R., Pessarakli, M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-27.
- Shewfelt, R. L., Purvis, A. C. (1995): Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant tissue disorders. *Horticultural Science* 30: 213-218.
- This, P., Lacombe, T., Thomas, M. R. (2006): Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in genetics* 22 (9): 513-519.
- Thompson, B., 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* 103: 509-518.
- Turturo, C., Saldarelli, P., Yafeng, D., Digiaro, 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.
- Vončina, D., Preiner, D., Šimon, S., Cvjetković, B., Maletić, E., Pejić, I. 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 (1): 262-273.
- Wellburn, A. R. (1994): The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal Plant Physiology* 144: 307-313.
- Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. (2011): Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* 111: 5944–5972.
- Zaitlin, M., Hull, R. (1987): Plant virus - host interaction. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 291-315.

# 7. Prilozi

**Tablica 1.** Vrijednosti mjerenih parametara u listovima kultivara vinove loze tretirane sojevima virusa GLRaV-3 I, II i III i njihovim kombinacijama (sirovi podatci). U zagradi je naznačena SD.

		proteini	SOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MDA	klorofil <i>a</i>	klorofil <i>b</i>	karotenoidi
kultivar	tretman							
Tribidrag	K	4,16 (0,86)	205 (23,4)	7,4 (0,10)	0,16 (0,007)	2,97 (0,27)	1,03 (0,13)	1,37 (0,08)
	I	0,74 (0,09)	351 (27,9)	16,7 (3,17)	0,10 (0,028)	3,04 (0,44)	0,88 (0,18)	1,27 (0,18)
	II	0,40 (0,14)	1244 (257)	53,1 (8,52)	0,07 (0,004)	2,36 (0,06)	0,58 (0,04)	0,97 (0,17)
	III	1,20 (0,24)	424 (66,3)	42,1 (3,00)	0,09 (0,019)	2,41 (0,12)	0,77 (0,02)	1,00 (0,03)
	I,II	1,62 (0,28)	301 (65,2)	41,9 (5,39)	0,08 (0,015)	2,31 (0,09)	0,61 (0,15)	0,96 (0,08)
	I,III	0,93 (0,21)	516 (82,6)	48,3 (7,29)	0,09 (0,014)	2,80 (0,25)	0,90 (0,17)	1,19 (0,14)
	II,III	5,28 (1,89)	169,3 (54,5)	40,4 (2,71)	0,25 (0,042)	2,94 (0,23)	0,92 (0,08)	1,20 (0,07)
	I,II,III	6,07 (1,19)	132 (22,2)	33,6 (5,65)	0,30 (0,039)	2,68 (0,34)	0,85 (0,11)	1,13 (0,15)
Merlot	K	9,04 (0,45)	135 (21,2)	35,9 (3,44)	0,35 (0,035)	2,07 (0,04)	0,65 (0,02)	0,96 (0,19)
	I	4,59 (0,31)	186 (19,7)	47,2 (3,95)	0,16 (0,023)	3,10 (0,22)	1,06 (0,15)	1,40 (0,16)
	II	5,00 (0,38)	189 (41,8)	44,6 (3,62)	0,15 (0,009)	2,89 (0,27)	1,00 (0,12)	1,26 (0,11)
	III	6,00 (0,77)	185 (20,8)	19,9 (4,99)	0,19 (0,044)	2,60 (0,25)	0,84 (0,21)	1,15 (0,15)
	I,II	6,60 (1,15)	232 (16,9)	22,3 (3,07)	0,19 (0,016)	1,28 (0,15)	0,40 (0,07)	0,59 (0,07)
	I,III	8,63 (1,25)	189 (17,4)	19,4 (3,65)	0,24 (0,039)	1,29 (0,06)	0,36 (0,06)	0,58 (0,04)
	II,III	6,94 (1,01)	242 (43,2)	32,3 (6,48)	0,24 (0,042)	1,14 (0,13)	0,38 (0,08)	0,54 (0,05)
	I,II,III	7,85 (0,69)	206 (20,9)	30,0 (3,76)	0,23 (0,009)	1,27 (0,15)	0,50 (0,09)	0,59 (0,07)
Caberent Franc	K	5,45 (1,21)	157 (4,1)	49,2 (5,23)	0,20 (0,035)	2,60 (0,13)	0,67 (0,05)	1,10 (0,06)
	I	8,05 (1,70)	144 (43,5)	45,0 (4,79)	0,25 (0,047)	2,76 (0,13)	0,89 (0,03)	1,30 (0,14)
	II	6,26 (1,65)	177 (32,8)	52,8 (4,48)	0,21 (0,049)	1,88 (0,14)	0,58 (0,10)	0,85 (0,08)
	III	7,76 (0,87)	144 (27,3)	35,7 (7,40)	0,21 (0,065)	2,41 (0,38)	0,72 (0,13)	1,08 (0,15)
	I,II	9,30 (1,14)	157 (41,5)	63,8 (2,13)	0,19 (0,058)	1,51 (0,36)	0,46 (0,07)	0,73 (0,17)
	I,III	4,27 (0,79)	326 (140,4)	64,9 (1,38)	0,25 (0,056)	1,29 (0,27)	0,44 (0,09)	0,62 (0,12)
	II,III	3,87 (0,49)	213 (56,9)	68,2 (0,43)	0,15 (0,037)	1,39 (0,22)	0,50 (0,08)	0,66(0,09)
	I,II,III	10,86 (1,06)	137 (10,5)	51,5 (2,26)	0,19 (0,053)	1,97 (0,21)	0,58 (0,04)	0,88 (0,07)

Pinot Noir	K	2,64 (1,12)	252 (23,9)	37,9 (5,99)	0,15 (0,031)	3,03 (0,26)	0,86 (0,22)	1,31 (0,08)
	I	2,29 (0,76)	283 (96,6)	47,9 (4,10)	0,11 (0,019)	3,15 (0,40)	1,02 (0,24)	1,39 (0,15)
	II	3,95 (0,60)	181 (26,7)	50,0 (8,49)	0,14 (0,015)	3,09 (0,66)	1,06 (0,29)	1,36 (0,27)
	III	4,53 (0,94)	160 (46,7)	26,1 (2,08)	0,14 (0,009)	2,36 (0,19)	0,77 (0,07)	1,14 (0,09)
	I,II	2,70 (0,29)	206 (16,3)	47,6 (9,50)	0,19 (0,034)	2,07 (0,37)	0,67 (0,10)	0,94 (0,12)
	I,III	3,89 (1,27)	173 (46,5)	44,7 (4,59)	0,17 (0,007)	2,39 (0,27)	0,78 (0,07)	1,11 (0,11)
	II,III	3,58 (0,28)	184 (34,7)	54,6 (2,95)	0,18 (0,013)	2,40 (0,32)	0,80 (0,13)	1,08 (0,11)
	I,II,III	3,48 (0,68)	179 (70,2)	57,0 (3,32)	0,17 (0,003)	2,77 (0,45)	0,87 (0,13)	1,20 (0,17)

**Tablica 2.** Vrijednosti mjerenih parametara u listovima kultivara vinove loze tretirane poljskim virusnim izolatima. (sirovi podatci). U zagradi je naznačena SD.

		proteini	SOD	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MDA	klorofil a	klorofil b	karotenoidi
kultivar	tretman							
Tribidrag	K	4,16 (0,86)	205 (23,4)	7,4 (0,10)	0,16 (0,007)	2,97 (0,27)	1,03 (0,13)	1,37 (0,08)
	X	4,30 (1,36)	351 (27,9)	58,7 (2,01)	0,18 (0,050)	2,47 (0,20)	0,77 (0,06)	1,09 (0,09)
	Y	9,84 (1,56)	1244 (257,4)	52,3 (5,91)	0,51 (0,030)	2,07 (0,09)	0,48 (0,03)	0,83 (0,05)
	Z	8,67 (1,56)	424 (66,3)	64,2 (2,00)	0,31 (0,083)	2,61 (0,33)	0,79 (0,14)	1,09 (0,14)
	Q	3,34 (0,40)	301 (65,2)	62,9 (0,47)	0,13 (0,033)	2,49 (0,28)	0,82 (0,04)	1,12 (0,09)
Merlot	K	9,04 (0,45)	135 (21,2)	35,9 (3,44)	0,35 (0,035)	2,07 (0,04)	0,65 (0,02)	0,96 (0,19)
	X	9,64 (0,58)	159 (27,5)	16,0 (3,51)	0,35 (0,037)	1,18 (0,12)	0,34 (0,03)	0,53 (0,06)
	Y	8,03 (1,43)	169 (15,2)	19,7 (1,68)	0,22 (0,039)	1,82 (0,34)	0,64 (0,10)	0,83 (0,14)
	Z	6,60 (0,64)	197 (21,7)	8,2 (1,08)	0,19 (0,026)	1,27 (0,22)	0,49 (0,07)	0,55 (0,10)
	Q	8,78 (0,35)	133 (22,2)	32,2 (5,07)	0,19 (0,022)	1,59 (0,16)	0,47 (0,06)	0,71 (0,07)
Caberent Franc	K	5,45 (1,21)	157 (4,1)	49,2 (5,23)	0,20 (0,035)	2,60 (0,13)	0,67 (0,05)	1,10 (0,06)
	X	1,15 (0,21)	160 (19,8)	60,9 (4,98)	0,15 (0,042)	2,17 (0,05)	0,65 (0,16)	0,96 (0,08)
	Y	0,82 (0,24)	989 (56,8)	51,5 (7,83)	0,39 (0,080)	3,11 (0,17)	0,93 (0,03)	1,35 (0,04)
	Z	0,57 (0,05)	206 (54,7)	63,1 (3,00)	0,20 (0,014)	2,91 (0,15)	0,90 (0,06)	1,31 (0,06)
	Q	0,45 (0,10)	1341 (238,7)	59,9 (7,78)	0,13 (0,018)	3,53 (0,39)	0,84 (0,07)	1,45 (0,12)
Pinot Noir	K	2,64 (1,12)	252 (23,9)	37,9 (5,99)	0,15 (0,031)	3,03 (0,26)	0,86 (0,22)	1,31 (0,08)
	X	3,12 (1,16)	242 (25,9)	59,8 (7,04)	0,15 (0,028)	3,04 (0,24)	1,03 (0,09)	1,41 (0,03)
	Y	3,96 (0,48)	215 (27,8)	49,3 (4,30)	0,15 (0,040)	3,15 (0,17)	1,10 (0,03)	1,39 (0,06)
	Z	4,34 (1,13)	192 (26,2)	61,1 (5,82)	0,17 (0,004)	2,88 (0,28)	0,96 (0,07)	1,31 (0,09)
	Q	0,86 (0,33)	615 (32,1)	62,5 (2,86)	0,15 (0,039)	3,50 (0,34)	1,13 (0,18)	1,63 (0,19)

## 8. Životopis



## 8. Životopis

Rođen sam u Zagrebu, gdje sam odrastao pohađajući Osnovnu školu Retkovec. Obrazovanje sam nastavio u smjeru prirodnih znanosti, školujući se u Prirodoslovnoj školi Vladimir Prelog. Pohađanje strukovnog smjera „Ekološki tehničar“ razvilo je zanimanje za okoliš i njegovu zaštitu što me potaklo na upis Prirodoslovno-matematičkog fakulteta gdje sam stekao dosadašnje zvanje prvostupnika Znanosti o okolišu. Na navedenom studiju teorijska znanja sam upotpunio praktičnim radom u Herbarium Croaticum i laboratorijskim stručnim radom, a dio studija sam odradio na Sveučilištu u Beču.