

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet

Bruno Pavletić

**Detekcija virusa u hrvatskim autohtonim kultivarima
vinove loze metodom RT-PCR prije i nakon
ozdravljivanja**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na zavodu za molekularnu biologiju biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić i predan je na natječaj za dodjelu rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Vinogradarstvo i proizvodnja vina u Republici Hrvatskoj	2
1.2. Hrvatski autohtoni kultivari vinove loze.....	2
1.2.1. <i>Vitis vinifera</i> 'Babica'.....	3
1.2.2. <i>Vitis vinifera</i> 'Malvazija istarska'.....	3
1.2.3. <i>Vitis vinifera</i> 'Plavac mali sivi'	3
1.3. Virusne bolesti vinove loze.....	4
1.3.1. Virusi skupine GLRaV.....	4
1.3.2. Virus mozaika gušarke ArMV	5
1.3.3. Virus šarene pjegavosti lista GFkV	6
1.3.4. Virus lepezastog lista GFLV	6
1.4. Tehnike ozdravljanja biljaka.....	7
1.5. Dokazivanje virusnih infekcija u vinove loze.....	8
1.5.1. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA)	9
1.5.2. Kombinirana metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom	9
1.6. Cilj i obrazloženje istraživanja.....	10
2. Hipoteze	11
3. Materijali i metode	12
3.1. Biljni materijal	12
3.2. Analiza fenotipa listova vinove loze.....	12
3.3. Izolacija RNA iz uzoraka listova	13
3.2. Dobivanje komplementarne DNA reverznom transkripcijom.....	15
3.4. Umnažanje virusnih gena lančanom reakcijom polimerazom	15
3.5. Elektroforeza i vizualizacija DNA na agaroznom gelu	16
4. Rezultati.....	18

4.1. Fenotipska analiza simptoma viroza na listovima <i>V. vinifera</i> ‘Babica’, ‘Plavac mali sivi’ i ‘Malvazija istarska’	18
4.2. Analiza prisutnosti virusa metodom RT-PCR kod neozdravljenih jedinki	20
4.3. Analiza prisutnosti virusa metodom RT-PCR nakon postupka ozdravljanja	23
5. Rasprava	26
6. Zaključak	31
7. Zahvale	32
8. Literatura	33
9. Sažetak	38
10. Summary	39
11. Životopis autora.....	40

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera*) je vrsta velike agronomske važnosti, najviše iz razloga što se od njezinih plodova proizvodi vino. Patogeni koji parazitiraju na njoj i ograničavaju prinose čine veliku štetu vinskoj industriji. Virusima zaražene sadnice vinove loze rezultiraju bitno nekvalitetnijom sirovinom za proizvodnju vina te skraćuju životni vijek vinograda. Produktivni vijek vinograda uslijed infekcije sa GFLV iznosi 15 – 20 godina umjesto 30 – 40 ili više (Andret-link i sur., 2004). Kvaliteta je grožđa smanjena zbog niže koncentracije šećera i povećane ukupne kiselosti (Andret-link i sur., 2004) a ekonomski gubici i do 60% (Váradi i sur., 2007), 80% (Andret-Link i sur., 2005), odnosno 100% (Raski i sur., 1983, Diklić, 2014). U Hrvatskoj je većina sadnog materijala još zaražena virusima, iako se u Europskoj uniji preporučuje jedino prodaja certificiranog bezvirusnog sadnog materijala. Zbog toga je poljoprivrednicima koji se bave vinogradarstvom od velikog interesa smanjiti njihovu raširenost u svojim vinogradima.

U Hrvatskoj je moguće nabaviti certificirane bezvirusne sadnice vinove loze međunarodnih kultivara poput Merlota i Chardonnay-a uvozom iz inozemnih rasadnika. Tek odnedavno moguće je nabaviti i bezvirusne sadnice hrvatskih autohtonih kultivara poput *V. vinifera* 'Plavac mali', 'Tribidrag' ili 'Žlahtina'. Prema propozicijama bezvirusne sadnice moraju biti oslobođene 5 vrsta virusa: Arabis mosaic virus (ArMV), Grapevine fanleaf virus (GFLV), Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) i Grapevine fleck virus (GFkV) (European and Mediterranean Plant Protection Organization, 2008).

U ovom radu istraživana je učinkovitost ozdravljivanja vinove loze tehnikama kulture tkiva iz početnog zaraženoga materijala triju kultivara velikog agronomskog značaja u Republici Hrvatskoj: *V. vinifera* 'Babica', *V. vinifera* 'Malvazija istarska' i *V. vinifera* 'Plavac mali sivi'. Istraživanjem je testirana uspješnost ozdravljivanja od šest virusa karakterističnih za naše i europske vinograde (Mirošević, 2007): virusa lepezastog lista vinove loze (*Grapevine Fanleaf Virus*, GFLV), virusa mozaika gušarke (*Arabis Mosaic Virus*, ArMV), tri virusa uvijenosti lista vinove loze (*Grapevine Leafroll-Associated Virus*, GLRaV) - GLRaV-1, 2, 3 i virusa šarene pjegavosti lista (*Grapevine Fleck Virus*, GFkV), a primjenjena metoda predstavlja trenutno najosjetljiviju metodu detekcije virusa (Gambino i Gribaudo, 2006).

1.1. Vinogradarstvo i proizvodnja vina u Republici Hrvatskoj

Vinogradarstvo je već dugo jedna od vodećih poljoprivrednih grana na području Hrvatske i danas poprima sve veći značaj u prehrambenoj industriji države. Unatoč tome, broj hrvatskih autohtonih kultivara se značajno smanjio, većinom zbog dolaska američkih prenositelja bolesti vinove loze krajem 19. stoljeća od kojih je najveći utjecaj imala filoksera (*Daktulosphaira vitifoliae*; Ivandija, 2008). U novije vrijeme intenzivno se radi na poticanju uzgoja naših autohtonih kultivara te podizanju njihove trajnosti i kvalitete. Budući da je područje Hrvatske klimatski različito postoji velik potencijal za uzgoj mnogih autohtonih kultivara vinove loze.

Jedan od načina kojim se pokušava riješiti problem osjetljivosti na patogene je klonska selekcija i uzgajanje samo zdravih i otpornih klonova autohtonih kultivara. Tehnike kulture tkiva već zaraženih jedinki od virusa pružaju mogućnost ozdravljanja odabranih visokokvalitetnih klonova.

1.2. Hrvatski autohtoni kultivari vinove loze

Hrvatska je iznimno bogata po broju autohtonih kultivara vinove loze. Nacionalna kolekcija hrvatskih autohtonih kultivara sadrži njih čak 130 što je rezultat duge tradicije uzgoja vinove loze na ovim područjima i velike klimatske raznolikosti (Maletić i sur., 2015). Svakom je od tih kultivara točno određen genotip na 9 standardnih mikrosatelitnih lokusa SSR (od engl. *Simple sequence repeat*) i dva seta markera SNP (od engl. *Single nucleotide polymorphism*) (Žulj Mihaljević, 2017). Gotovo svi kultivari su kritično ugroženi budući da se uzgajaju u izrazito uskom području, rijetko se ili teško razmnožavaju i u Hrvatskoj ima manje od 1000 jedinki (Maletić i sur., 2015). U najugroženiju kategoriju spadaju npr. *V. vinifera* 'Plavac mali sivi', *V. vinifera* 'Kozjak' i *V. vinifera* 'Pošip crni'. Od velikog je gospodarskog interesa pokušati revitalizirati takve kultivare radi povećanja raznolikosti ponude vina na hrvatskom tržištu. Kultivari koji već imaju znatnu važnost u gospodarstvu poput *V. vinifera* 'Babica', *V. vinifera* 'Babić', *V. vinifera* 'Malvazija istarska' ili *V. vinifera* 'Tribidrag' (Malenica i sur., 2011) spadaju u gotovo ugrožene ili najmanje zabrinjavajuće kultivare, ali također je vrijedno poticati njihov uzgoj u Hrvatskoj.

1.2.1. *Vitis vinifera* 'Babica'

V. vinifera 'Babica' je dalmatinski crni kultivar malih bobica koja se uzgaja na području Kaštela (Maletić i sur., 2015). Smatra se mladim, ali važnim kultivarom jer služi za proizvodnju Opola - tradicionalnog kaštelanskog vina. Direktni je potomak kultivara *V. vinifera* 'Plavac mali' tako da je blisko srodan ostalim dalmatinskim kultivarima (Maletić i sur., 2015; Skračić i Banović, 2017). Dobivanje novih varijeteta ovog kultivara moglo bi ga proširiti na šire geografsko područje uzgoja i potaknuti proizvodnju vina. Budući da do sada nisu pronađene jedinke ovog kultivara koje nisu zaražene virusima (Maletić i sur., 2015), ozdravljanje ovog kultivara bi moglo imati veliki gospodarski značaj.

1.2.2. *Vitis vinifera* 'Malvazija istarska'

V. vinifera 'Malvazija istarska' je najrašireniji kultivar vinove loze uzgajan u Istri i jedan od najviše uzgajanih kultivara općenito u Hrvatskoj. Razlog je tome što daje izuzetno kvalitetne plodove pa ga poljoprivrednici često biraju umjesto drugih kultivara. Daje bijele plodove i ima visoku rodnost. Točno podrijetlo kultivara nije poznato, ali smatra se izvornim istarskim kultivarom (Maletić i sur., 2015). Vina proizvedena od ovog kultivara se uzgajaju i izvan Hrvatske što ju čini gospodarski izuzetno značajnom. Zbog toga, nije teško vidjeti da patogeni *V. vinifera* 'Malvazije istarske' čine veliku gospodarstvenu štetu. Metoda ozdravljanja koja funkcionira na ovom kultivaru bi zato znatno doprinjela njezinom značaju u RH ali i šire.

1.2.3. *Vitis vinifera* 'Plavac mali sivi'

V. vinifera 'Plavac mali sivi' je izrazito slabo rasprostranjen kultivar, uzgajan samo u manjim vinogradima na Korčuli, Braču i Pelješcu. On je zapravo identičan *V. vinifera* 'Plavcu malom crnom' po svemu osim što ima mutaciju zbog koje nakuplja puno manje antocijana u kožici ploda pa služi za proizvodnju bijelog vina, za razliku od *V. vinifera* 'Plavca malog crnog' koji daje crna vina (Maletić i sur., 2015). Iako je njegov uzgoj jako ograničen, smatra se da ima velik gospodarski potencijal upravo zbog velike sličnosti s *V. vinifera* 'Plavcem malim crnim'

koji je vrlo cijenjeni kultivar, te zbog manje oporog okusa i visoke potražnje za bijelim vinima u ljetnim mjesecima. Zbog toga je potrebno proširiti uzgojni areal *V. vinifera* 'Plavca malog sivog' te dobiti nove varijetete.

1.3. Virusne bolesti vinove loze

Danas je poznato oko 60 virusa koji parazitiraju na vinovoj lozi, ali samo neki stvaraju veliku gospodarsku štetu (Perrone i sur., 2017). Takvi virusi za Europu se nalaze na popisu Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO, od engl. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, <https://www.eppo.int/>) Primjeri takvih virusa su GLRaV-1, 2 i 3, ArMV, GFkV i GFLV (Mirošević, 2007; Ivić i Fazinić, 2011; Vončina i sur., 2017; Xiao i sur., 2018). Glavni način širenja virusa među lozama je vegetativno razmnožavanje jedinki u poljoprivredi, ali mogu se prenositi i vektorima koji su najčešće insekti u kontaminiranim tlima. Kada se jednom nađu u biljci, najčešće se po njoj šire floemom. Protiv virusnih bolesti vinove loze se ne treba boriti samo djelovanjem na njihove vektore već i na viruse same, ozdravljanjem zaraženih jedinki kako bi se spriječilo širenje virusa naciepljivanjem te ozdravili već zaraženi visokovrijedni kultivari.

1.3.1. Virusi skupine GLRaV

U ovu skupinu spadaju virusi porodice *Closteroviridae* koji uzrokuju bolest zakrivljenosti lista i uz GFLV, jedni su od najraširenijih virusa vinove loze na svijetu (Maree i sur., 2013; Burger i sur., 2017). Oni rade veliku gospodarsku štetu jer ometaju fiziologiju biljke pa time domaćin daje slabiji urod manje kvalitete. Naime, udio šećera zaraženih biljaka je oko 30% manji i vrijeme zrenja njihovih plodova je produženo (Byzova i sur., 2018). Najčešći prenosioci ovih virusa su vunaste (*Pseudococcidae*) i štitaste uši (*Coccidae*), koje ubadaju biljku do floema i unose virusne čestice. Zbog toga se ovi virusi nakupljaju u floemu i ometaju promet hranjivih tvari prema plodovima i listovima (Poojari i sur., 2017; Sabella i sur., 2018).

Virus GLRaV-2 spada u rod *Closterovirus* i jedini u ovoj skupini nema poznat vektor u prirodi (Sharma i sur., 2015.; Bertazzon i sur., 2010). GLRaV-1 i GLRaV-3 spadaju u rod

Ampelovirus i oni su najrašireniji virusi skupine GLRaV u cijelom svijetu pa su zbog toga ekonomski najznačajniji (Sabella i sur., 2018; Alliaume i sur., 2018). Ovi su virusi u Europi postojali i prije dovođenja filoksere u 19. stoljeću (Gale, 2003), ali tek su od tad poznati po stvaranju iznimne štete u poljoprivredi jer su se nakon toga znatno proširili. Za sada nisu pronađeni varijeteti vinove loze koji su otporni na njih.

Ovi virusi kod crnih kultivara uzrokuju crvenjenje listova zbog nakupljanja antocijana u uznapredovaloj fazi, a u ranijim fazama tamnjenje područja oko lisnih žila. Kod bijelih kultivara uzrokuju žućenje i tamnjenje područja oko lisnih žila. Kod svih kultivara uzrokuju savijanje listova na rubovima (Martelli, 1993; Ivić i Fazinić, 2011; Meng i sur., 2017).

1.3.2. Virus mozaika gušarke ArMV

Virus mozaika gušarke spada u rod *Nepovirus* porodice *Secoviridae* (Sanfaçon i sur., 2009). Kod vinove loze simptomi koje uzrokuje su kratki internodiji, u potpunosti žuti listovi i crveno drvo mladice. Budući da požućuje listove, lako je uvidjeti da virus interferira sa procesom fotosinteze pa zbog toga izgledniju biljku i ozbiljno smanjuje prinose ili ju u ekstremnim slučajevima čak ubija. Takvi simptomi su slični onima koje uzrokuje GFLV i ti virusi često zajedno inficiraju domaćina (Huss i sur., 1989; Mirošević, 2007). Najpoznatiji vektor ArMV je oblič *Xiphinema diversicaudatum* (Sanfaçon i sur., 2009; Thierry i sur., 2013). Genom mu se sastoji od dvije jednolančane molekule (+)RNA koje na 5'-kraju imaju vezan specifični virusni protein, a na 3'-kraju poliadeninski rep (Thierry i sur., 2013). Takav genom je okružen ovojnicom koju gradi jedan protein, a cijela virusna čestica ima promjer oko 30 nm (Francki i sur., 1985). ArMV osim vinove loze napada i mnoge druge biljke poput jagode što znatno pogoduje njegovom širenju, ali i čini kontrolu širenja ovog virusa mnogo važnijom jer se problem širi na druge dijelove prehrambene industrije.

1.3.3. Virus šarene pjegavosti lista GFkV

Virus šarene pjegavosti lista pripada u porodicu *Tymoviridae* i rod *Maculavirus*. Infekcija je obično latentna tj. ne pokazuje simptome kad je domaćin *Vitis vinifera*, no kod njezinog bliskog srodnika, *Vitis rupestris*, uzrokuje izrazitu deformaciju lista (Mirošević, 2007). Latentnost infekcije ovim virusom je vjerojatno razlog zašto se uspio znatno proširiti. Iako nema poznatog prenositelja u prirodi, zabilježeno je njegovo širenje kroz vinograde u Južnoafričkoj republici (Engelbrecht i Kasdorf, 1990) i Italiji (Fortusini i sur., 1996) što ukazuje da bi vektor ipak mogao postojati. Uz to je poznato da se virus GFkV izrazito dobro širiti floemom nakon nacjepljivanja (Martelli, 1993). Ozdravljivanje kultivara eliminacijom ovog virusa, kao i u slučaju drugih virusa, omogućuje dobivanje skupine zdravih jedinki koje bi se mogle koristiti kao baza za nacjepljivanje čime bi se ograničilo širenje ovog virusa u populaciji vinove loze.

1.3.4. Virus lepezastog lista GFLV

Virus lepezastog lista spada u porodicu *Secoviridae* i rod *Nepovirus*. To je najrašireniji virus vinove loze na svijetu. Još je veći problem činjenica da uzrokuje ozbiljne, gospodarski značajne simptome: izražena deformacija listova, kloroza, mozaične mrlje, skraćivanje internodija, slabiji urod, kržljivost biljke, male plodove koji kasno dozrijevaju, kiseliji su i imaju značajno smanjen udio šećera (Andret-Link i sur., 2004; Mirošević, 2007). Kao i ostali virusi, može se prenositi nacjepljivanjem, ali poznato je i više prenositelja od kojih je najznačajniji *Xiphinema index* (Hewitt i sur., 1958; Andret-Link i sur., 2004). Genom ovog virusa čine dvije jednolančane molekule (+)RNA koje su obje nužne za infektivnost (Quacquarelli i sur., 1976; Vigne i sur., 2004). Svaka na svojem 5'-kraju ima vezan protein VPg, a 3'-kraj je poliadeniliran. Proteini koje kodiraju moraju se proteolitički aktivirati nakon ulaska u stanicu za početak infekcije (Andret-Link i sur., 2004). Genom je omotan kapsidom sačinjenom od ponavljajućih jedinica proteina 2C^{CP} (Quacquarelli i sur., 1976). Kristalna struktura njegove kapside je poznata (PDB ID: 4V5W, Bonnefond i sur., 2011). Čestice GFLV-a se vjerojatno šire u okolne stanice kroz plazmodezmije (Andret-Link i sur., 2004). Ovaj virus ima snažan genetički potencijal za postizanje velike genetičke varijabilnosti jer mu je genom

sačinjen od RNA i njegova RNA-ovisna RNA polimeraza nema tzv. *proofreading* aktivnost. Rezultat toga je velika podložnost mutacijama i ubrzana divergencija ovog virusa.

1.4. Tehnike ozdravljivanja biljaka

Velika plastičnost biljnih tkiva omogućila je razvoj brojnih metoda kulture biljnog tkiva i uzgoja biljaka *in vitro*. Te metode su potaknule razvoj tehnika za dobivanje novih, zdravih biljaka iz onih zaraženih virusima i uklanjanje patogena iz inficiranih jedinki. Tehnike ozdravljivanja su poznate i usavršavaju se već dugi niz godina na raznim biljnim vrstama i danas su neizbježne u onim aspektima industrije koji se bave uzgojem biljaka, a važne su i u fundamentalnim istraživanjima. Najznačajnija tehnika eliminacije virusa i drugih patogena je kultura vršnog meristema i efikasna je u velikog broja biljnih vrsta, no odlikuje je niska učinkovitost u eliminaciji virusa iz inficiranih biljaka vinove loze. Tehnika je vrlo zahtjevna, ponajviše zbog činjenice da veličina izoliranog meristema (eksplantata) mora biti što manja (za vinovu lozu je maksimum 0.5 mm) kako bi se umanjio rizik kontakta s provodnim sustavom i virusnim česticama tijekom manipulacije (Sim, 2010). Kao otežavajuća okolnost javlja se niska stopa preživljavanja malih eksplantata u kulturi tkiva koja prema aktualnim podacima iznosi 10-30% (Sim, 2006). Zbog navedenog ponekad je potrebno usporiti širenje virusa kroz meristem kratkotrajnim izlaganjem biljke povišenim temperaturama tzv. termoterapijom, a u novije vrijeme zbog nedostataka navedenih metoda istražuju se nove metode koje uključuju postupke tzv. kemoterapije odnosno aplikacije „kemoterapeutskih“ tvari na biljno tkivo, što otvara novi set neželjenih posljedica poput fitotoksičnosti ili interferencije s istraživanim tretmanima. Termoterapija i kemoterapija podrazumijevaju izlaganje biljaka *in vitro* povišenoj temperaturi ili kemikalijama na 4-6 tjedana, ovisno o vrsti, tijekom rasta. Zabilježena je uspješna termoterapija vinove loze na 36 °C u trajanju od 57 dana kojom je uklonjen vitivirus vinove loze A (*Grapevine vitivirus A*, Panattoni i sur., 2007). Kemoterapije su uglavnom tretmani kemikalijama poput ribavirina koje inhibiraju sintezu virusne RNA ili unose mutacije (Simpkins i sur., 1981; Wang i sur., 2018). Ove terapije se obično koriste u kombinaciji s kulturom meristema te značajno povećavaju efektivnost metode (Wang i sur., 2018).

Kombinacijom kulture vršnog meristema i termoterapije moguće je iz zaraženih biljaka ukloniti određeni broj različitih vrsta virusa, s različitom uspješnosti. Trajanje ozdravljivanja ovim postupcima u uhodanim laboratorijima traje u prosijeku 8 tjedana tijekom kojih se iz

jednog izoliranog meristema dobije tzv. mikroizdanak, uz stopu preživljenja od 10-30%. Efikasnost eliminacije virusa iznosi 70-80% ovisno o njegovoj vrsti, no pokazano je da neki tipovi virusa vinove loze preživljavaju sve do sada opisane postupke bazirane na kulturi meristema (Sim, 2006).

Alternativna metoda jest metoda somatske embriogeneze za koju se pretpostavlja da bi mogla biti efikasna za eliminaciju većine virusa (Goussard i sur., 1991; Popescu i sur., 2003; Gambino i sur., 2006). Uz to, neki preliminarni rezultati pokazuju da bi mogla biti efikasna i pri eliminaciji „teških“ virusa kao što su virusi „*Rugose wood*“ kompleksa (Gribaudo i sur. 2006), što metodi donosi poseban značaj. Nažalost, metoda je zahtjevna u svojoj provedbi te sama indukcija somatske embriogeneze varira u vinove loze od kultivara do kultivara (Dhekney i sur., 2009) što onemogućuje standardizaciju somatske embriogeneze za dobivanje ozdravljenog materijala.

Upravo zbog navedenog i dalje se traga za uspostavom standardizirane, reproducibilne i efikasne metode eliminacije virusa iz zaraženih jedinki vinove loze, pri čemu se sustavno testiraju različite kombinacije tehnika kulture biljnoga tkiva koje daju mogućnost regeneracije cijelih biljaka očuvanog sortnog identiteta.

U slučaju pronalaska metode efikasnog ozdravljivanja vinove loze, bio bi dugoročno omogućen siguran uvoz i izvoz kultivara među zemljama bez opasnosti od širenja patogena koji bi mogli štetno utjecati na prehrambenu industriju općenito.

1.5. Dokazivanje virusnih infekcija u vinove loze

Najbolji način za ograničavanje širenja virusnih bolesti među vinovim lozama je započinjanje vinograda sadeći u potpunosti zdrave jedinke. Tri su najčešće metode identifikacije i detekcije virusa: morfološka i fenotipska analiza, enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA od engl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*) i kombinirana metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR). Problem morfološke analize je što virusi ponekad ne uzrokuju morfološki vidljive simptome (Martelli, 2014) ili različiti virusi mogu uzrokovati slične promjene. S druge strane, test ELISA će detektirati proteine, a RT-PCR nukleinske kiseline karakteristične za pojedine viruse tako da su puno precizniji, pri čemu je RT-PCR najosjetljiviji test (Mekuria i sur., 2003).

1.5.1. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA)

Enzimski imunotest na čvrstoj fazi je test za detekciju virusa na temelju njihovih antigena. Antigeni su proteini specifični za svaku vrstu virusa. Koriste se primarna antitijela koja se vežu za antigen čija se prisutnost testira. Nakon toga se isperu i dodaju se sekundarna antitijela koja se vežu na primarna i na sebi imaju vezanu molekulu koja daje neki signal, bilo fluorescencijski, reakcijski ili u obliku obojenja. Zatim se preostala antitijela opet isperu. Ako se nakon ispiranja zabilježi signal, to dokazuje prisutnost virusa, odnosno njegovog proteina.

Iako je ova metoda prilično osjetljiva, nije dovoljna za detekciju virusa u iznimno niskim koncentracijama u čemu je PCR mnogo bolja metoda (Ling i sur., 2001). Također, problem ove metode je visoka cijena jer se za svako istraživanje moraju dobiti antigeni za istraživani virus. Uz to, procedura same metode je kompleksna pa je zbog toga podložna lažnim pozitivima (Diklić, 2014).

1.5.2. Kombinirana metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom

Kombinirana metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR) zasniva se na izolaciji RNA iz zaražene biljke koja se potom prepisuje u cDNA (reverzna transkripcija) koja se potom umnaža u lančanoj reakciji polimerazom specifičnim početnicama za svaki virus. S dobivenim umnoženim molekulama provedi se elektroforeza u agaroznom gelu i boje se bojama za DNA.

Iako osjetljivost ove metode varira od vrste do vrste biljke, kod svih do sada testiranih biljaka ona je osjetljivija od ELISE (Matic i sur., 2009). Problem kod ove metode je što za svaki virus treba dizajnirati početnice koje su za njega specifične, ali to je i dalje jeftinije od proizvodnje antitijela na njegove proteine. Osim toga, RT-PCR odlikuje veća reproducibilnost rezultata od ELISE (Gambino i Gribaudo, 2006).

1.6. Cilj i obrazloženje istraživanja

Tehnike kulture biljnog tkiva s ciljem eliminacije virusa i regeneracije cjelovitih biljaka ustaljene su u Laboratoriju za razvojnu biologiju biljaka, Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za veliki broj hrvatskih autohtonih kultivara (*V. vinifera* 'Plavac mali sivi', *V. vinifera* 'Babica', *V. vinifera* 'Malvazija istarska', *V. vinifera* 'Babić', *V. vinifera* 'Pošip', *V. vinifera* 'Malvazija dubrovačka'; Leljak Levanić, osobna komunikacija).

Cilj ovog istraživanja bila je procjena uspješnosti ozdravljivanja na primjeru dva gospodarski važna (*V. vinifera* 'Babica' i *V. vinifera* 'Malvazija istarska') i jednom kritično ugroženom kultivaru (*V. vinifera* 'Plavac mali sivi') od šest gospodarski značajnih virusa: virusi grupe uvijenosti lista vinove loze 1, 2 i 3 (GLRaV-1, 2 i 3), virus mozaika gušarke (ArMV), virus šarene pjegavosti lista (GFkV) i virus lepezastog lista (GFLV), primjenom tehnike RT-PCR.

Ovo je prvo istraživanje koje se bazira na primjeni metode RT-PCR za detekciju virusa u hrvatskim kultivarima vinove loze prije i poslije potencijalnog postupka ozdravljivanja, te osim metodološkog značaja, ima važnost za evaluaciju nove, do sada neopisane metode ozdravljivanja. Zbog navedenog, metodologija i rezultati ovog rada značajan su doprinos za usmjeravanje daljnjih istraživanja te eventualnu primjenu u dijagnostici i ozdravljanju vinove loze.

2. Hipoteze

Glavna hipoteza istraživanja je eliminacija virusnih infekcija u biljaka regeneriranih kombinacijom tehnika kulture biljnoga tkiva iz početnih eksplantanata inficiranih biljka. Očekuje se da prisutnost virusa nakon provedbe tehnike kulture tkiva na eksplantatima zaraženog biljnog materijala, a s ciljem eliminacije virusa, neće biti detektirana u regeneriranim biljkama ili njihovom značajnom udjelu niti primjenom najosjetljivije metode detekcije virusa - metode RT-PCR.

Druga hipoteza temelji se na pretpostavci da izdanci regenerirani iz zimskih pupova tijekom svog razvitka nakupljaju virusne čestice iz matične biljke te da predstavljaju pogodan materijal za detekciju virusnih infekcija.

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Prisutnost virusa (GLRaV-1, 2, 3, ArMV, GFkV i GFLV) analizirana je u tri hrvatska autohtona kultivara vinove loze *V. vinifera* 'Plavac mali sivi', *V. vinifera* 'Babica' i *V. vinifera* 'Malvazija istarska'. Svi analizirani kultivari nalaze se u nasadu hrvatskih autohtonih kultivara Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu „Jazbina”. Analize su provedene na listovima koji su prikupljeni direktno sa trsova ili na listovima koji su bili potaknuti iz mladica izraslih iz zimskih pupova. Mladice su prikupljene tijekom siječnja 2019. te potaknute na razvitak uzgojem u destiliranoj vodi, svaka zasebno, u uvjetima dugog dana u klima komori (24 °C, fotoperiod 16h dan/8h noć). Analizirana su po dva lista s po dvije jedinice svakog kultivara.

Analiza prisutnosti virusa nakon ozdravljanja provedena je na listovima biljaka regeneriranim kroz postupke kulture biljnoga tkiva s ciljem eliminacije virusa. Analizirana su po dva lista s 1 – 3 jedinice svakog kultivara'.

Potencijalno ozdravljene biljke dostupne su u Laboratoriju za kulturu biljnoga tkiva, Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Analiza fenotipa listova vinove loze

Fenotipske osobine analizirane su na po dva potencijalno zaražena mlada lista razvijena na mladica z zimskih pupova. Analizirani su boja, oblik i pjegavost te su navedene karakteristike uspoređene s poznatim simptomima zaraze virusima GLRaV-1, 2 i 3, ArMV, GFkV i GFLV. Ista je analiza napravljena i na starijim listovima matičnih biljaka iz nasada hrvatskih autohtonih sorata vinove loze Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu „Jazbina”, no kako su simptomi virusa bili djelomično prekriveni i podudarni sa simptomima starenja rezultati te analize ovdje nisu prikazani.

3.3. Izolacija RNA iz uzoraka listova

Po 100 mg lisnog tkiva s pripadajućim lisnim žilama u svakom uzorku bilo je, nakon kratkotrajnog smrzavanja u tekućem dušiku ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), skladišteno do postupka izolacije RNA na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Izolacije RNA provedene su upotrebom kompleta Qiagen RNeasy® Plant Mini za izolaciju RNA, prema uputama proizvođača. Prije izolacije, svaki uzorak smrznut je u tekućem dušiku te su mu za homogenizaciju dodane četiri sterilne metalne kuglice promjera 3 mm prethodno smrznute u tekućem dušiku. Homogenizacija je provedena na homogenizatoru (Retsch MM 200) 3 min na 30 Hz. U pufer za lizu RLT iz kompleta Qiagen RNeasy® Plant Mini dodano je 40 mg/mL PVP-a i 10 $\mu\text{L/mL}$ β -merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, $c = 14.3\text{ M}$). Nakon homogenizacije, na tkivo je dodano po 450 μL tako pripremljenog pufera, a metalne kuglice su izvađene magnetom. Homogenat je centrifugiran 1 min na $8000 \times g$ (Eppendorf Centrifuge 5415 C) kako bi se ostaci tkiva i stanica istaložili. Dobiveni supernatant dodatno je centrifugiran 2 min na maksimalnoj brzini na koloni „QIAshredder“ (Qiagen RNeasy® Plant Mini) kako bi se na membrani kolone izdvojili svi zaostali stanični dijelovi. Filtratu, izdvojenom u novu epruvetu, dodano je pola volumena etanola ($w/v = 96\%$) te je nakon miješanja otopina prebačena na kolonu „RNeasy“ (Qiagen RNeasy® Plant Mini) i centrifugirana 15 s na $8000 \times g$. Membrana „RNeasy“ kolone je isprana s 350 μL Qiagen RW1 puferske otopine centrifugiranjem 15 s na $8000 \times g$. Molekule DNA uklonjene su dodatkom 80 μL DNazne otopine (10 μL otopine DNaze I i 70 μL pufera RDD, Qiagen) na kolonu te je inkubacija provedena pri sobnoj temperaturi 15 min. Potom je dodano 350 μL Qiagen RW1 puferske otopine na svaku kolonu kako bi se centrifugiranjem 15 s na $9000 \times g$, (Eppendorf Centrifuge 5415 R) isprala RNA vezana za membranu. Kolona je dodatno isprana s 500 μL Qiagen RPE puferske otopine (Qiagen RNeasy® Plant Mini) s prethodno dodanim etanolom prema uputama proizvođača i centrifugiranjem 15 s na $9000 \times g$. Ovaj je korak ponovljen još jednom uz centrifugiranje 2 min na $9000 \times g$ radi sušenja kolone. Kolone su prebačene u nove epruvete te je na membrane dodano po 40 μL otopine Tris HCl (Invitrogen, $c = 1\text{ M}$, $\text{pH} = 7.5$). Centrifugiranjem 1 min na $9000 \times g$, eluirana je izolirana RNA, a dobivenom eluatu dodan je 1 μL inhibitora RNaze (Thermo Scientific) uz inkubaciju 5 min na sobnoj temperaturi.

Zbog niskih koncentracija izolirane RNA te prvenstveno niske čistoće izolata iz nekih uzoraka, postupak izolacije je iz tih uzoraka dodatno proveden kompletom Thermo Scientific MagJET Plant RNA Kit. Za ovu je metodu korišteno 50 mg tkiva po uzorku. Homogenizacija tkiva je provedena u jednakim uvjetima kao i za izolaciju RNA kompletom Qiagen RNeasy®

Plant Mini. Pripremljeno je po 600 μL pufera za lizu (Thermo Scientific) uz dodatak 12 mg PVP-a (Sigma-Aldrich) i 20 μL otopine ditiotreitola (Fermentas, $c = 2 \text{ M}$) po uzorku. Po 600 μL ove otopine dodano je homogeniziranom biljnom materijalu. Dobivene smjese su dobro promiješane vorteksiranjem te inkubirane 5 min na $56 \text{ }^\circ\text{C}$ na termobloku Eppendorf Thermomixer® comfort. Nakon toga, uzorci su centrifugirani 10 min na maksimalnoj brzini (centrifuga: Eppendorf Centrifuge 5415 C). Odvojeno je po 400 μL supernatanta te je svakom dodano po 400 μL etanola ($w/v = 96\%$) i 25 μL magnetskih kuglica (Thermo Scientific *MagJET Magnetic Beads*). Otopine su dobro promiješane vorteksiranjem i kratko centrifugirane kako bi se volumen zaostao na stjenkama oborio na dno epruvete. U ovom koraku RNA se veže za magnetne kuglice. Uzorci su zatim ostavljeni na magnetu (DynaL *MPC-S Magnetic Particle Concentrator*) 2 do 3 min kako bi se kuglice u potpunosti privukle na stjenku epruvete koja je uz magnet. Potom je uklonjen supernatant, a na magnetne kuglice je dodano po 700 μL pufera za ispiranje 1 (Thermo Scientific *Wash Buffer 1*). Svaka otopina je opet dobro promiješana i kratko centrifugirana pa ostavljena na magnetu nakon čega je uklonjen supernatant. Cijeli postupak ponovljen je još jednom s 700 μL pufera za ispiranje 1 te još dva puta sa 700 μL pufera za ispiranje 2 (Thermo Scientific *Wash Buffer 2*). Nakon ispiranja, magnetne su kuglice s RNA ostavljene na magnetu još 5 min kako bi se osušile. Na suhe kuglice je dodano 50 μL vode oslobođene nukleaza (Thermo Scientific *Nuclease free water*) s ciljem otapanja molekula RNA. Smjesa je dobro pomiješana, kratko centrifugirana i ostavljena na magnetu 2-3 min. Potom je 50 μL supernatanta s otopljenom RNA odvojeno od magnetnih kuglica i prebačeno u čistu epicu. Uzorci RNA su tretirani otopinom DNaze I nakon mjerenja koncentracije i čistoće. Po 2 μg izolirane RNA tretirano je DNazom I u ukupno 11 μL reakcijske smjese pripremljene s 1.1 μL 10x pufera za DNazu I i 2 μL otopine DNaze I (Invitrogen) te su svi uzorci nadopunjeni vodom predtretiranom dietilpirokarbonatom (DEPC-voda) do 11 μL . Takva je otopina držana 15 min na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, reakcijskoj smjesi je dodano 2 μL otopine EDTA (Invitrogen, $c = 25 \text{ mM}$) te je enzim inaktiviran inkubacijom 10 min na $65 \text{ }^\circ\text{C}$ na grijalici Eppendorf Thermomixer® comfort.

Koncentracija i čistoća dobivenih otopina RNA određivana je spektrofotometrijski na spektrofotometru NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific) i softwareom NanoDrop 1000 (verzija 3.8.1).

3.2. Dobivanje komplementarne DNA reverznom transkripcijom

Od izolirane RNA dobivene su komplementarne molekule DNA (cDNA) reakcijom reverzne transkripcije (RT), upotrebom nasumičnih nonamera kao početnica. Smjesa za RT-reakciju pripremljena je prema Tablici 1. Reakcija je provođena 50 min pri 37 °C u uređaju za PCR Applied Biosystems GeneAmp™ PCR System 2700.

Tablica 1. Sastav jedne reakcijske smjese za RT-PCR u svrhu dobivanja cDNA na kalupima izolirane RNA.

Komponenta	Volumen/ μL
Reverzna transkriptaza (Thermo Scientific, 200 U/ μL)	1
5x RT-PCR-pufer (Thermo Scientific)	4
Inhibitor RNaza (Thermo Scientific, 40 U/ μL)	1.25
Nasumični nonameri (Sigma-Aldrich, c = 25 μM)	1
dNTP (Sigma-Aldrich, c = 10 mM)	4
RNA	8.75
Ukupno	20

3.4. Umnažanje virusnih gena lančanom reakcijom polimerazom

Kako bi se utvrdila prisutnost virusnih gena u genomu biljaka korištena je metoda lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) na prethodno dobivenim molekulama cDNA upotrebom početnica specifičnih za pojedine viruse (Gambino i Gribaudo, 2006). Pripremljeno je osam jednakih reakcijskih otopina za svaki uzorak cDNA (Tablica 2). U sedam otopina su stavljene pripadajuće početnice (Tablica 3) i cDNA. Jedna je otopina služila kao negativna kontrola. U tu otopinu je stavljeno 2 μL vode miliQ umjesto cDNA i po 0.25 μL svake početnice. Uvjeti reakcije PCR-a bili su sljedeći: početna denaturacija 2 min na 95 °C, 35 ciklusa denaturacije (30 s na 95 °C), sparivanja početnica (30 s na 57 °C) i elongacije (1 min na 72 °C) te na kraju 5 min završne elongacije na 72 °C. Za tu reakciju je korišten Applied Biosystems GeneAmp™ PCR System 2700 uređaj za PCR.

Tablica 2. Sastav jedne reakcijske smjese za PCR.

Komponenta	Volumen/ μL
5x PCR-pufer (Promega)	5
MgCl ₂ (Fermentas, c = 25 mM)	2.5
dNTP (Sigma-Aldrich, c = 10 mM)	0.5
DNA polimeraza (Promega, 5 U/ μL)	0.1
miliQ H ₂ O	13.9
FW početnica	0.5
RV početnica	0.5
cDNA	2
Ukupno	25

Tablica 3. Vrsta virusa, specifične početnice i očekivane duljine fragmenata u parovima baza za svaki navedeni par početnica

Ciljni gen/virus	Početnice	Duljina/pb
18S (pozitivna kontrola)	FW 5'CGCATCATTCAAATTTCTGC3' RV 5'TTCAGCCTTGCGACCATACT3'	844
GLRaV-2	FW 5'GGTGATAACCGACGCCTCTA3' RV 5'CCTAGCTGACGCAGATTGCT3'	543
ArMV	FW 5'TGACAACATGGTATGAAGCACA3' RV 5'TATAGGGCCTTTCATCACGAAT3'	402
GLRaV-3	FW 5'TACGTTAAGGACGGGACACAGG3' RV 5TGCGGCATTAATCTTCATTG'3'	336
GLRaV-1	FW 5'TCTTTACCAACCCCGAGATGAA3' RV 5'GTGTCTGGTGACGTGCTAAACG3'	232
GfKv	FW 5'TGACCAGCCTGCTGTCTCTA3' RV 5'TGGACAGGGAGGTGTAGGAG3'	179
GFLV	FW 5'ATGCTGGATATCGTGACCCTGT3' RV 5'GAAGGTATGCCTGCTTCAGTGG3'	118

3.5. Elektroforeza i vizualizacija DNA na agaroznom gelu

Za vizualizaciju rezultata umnažanja PCR-om korišteni su agarozni gelovi (w/v = 2.5%) pripremljeni u TAE puferu. Elektroforeza dobivene cDNA je provođena u istom puferu. Po 5 μL uzorka je pomiješano s 1 μL boje (Thermo Scientific *DNA Loading Dye*) te naneseo u jažice gela. Uzorak markera (Thermo Scientific Gene Ruler 100 bp DNA Ladder) na gel je nanesen u volumenu od 3 μL . Elektroforeza je provođena u Embi Tec RunOne™ sustavu za elektroforezu, prvo na 25 V oko 2 min pa na 50 V 30-40 min.

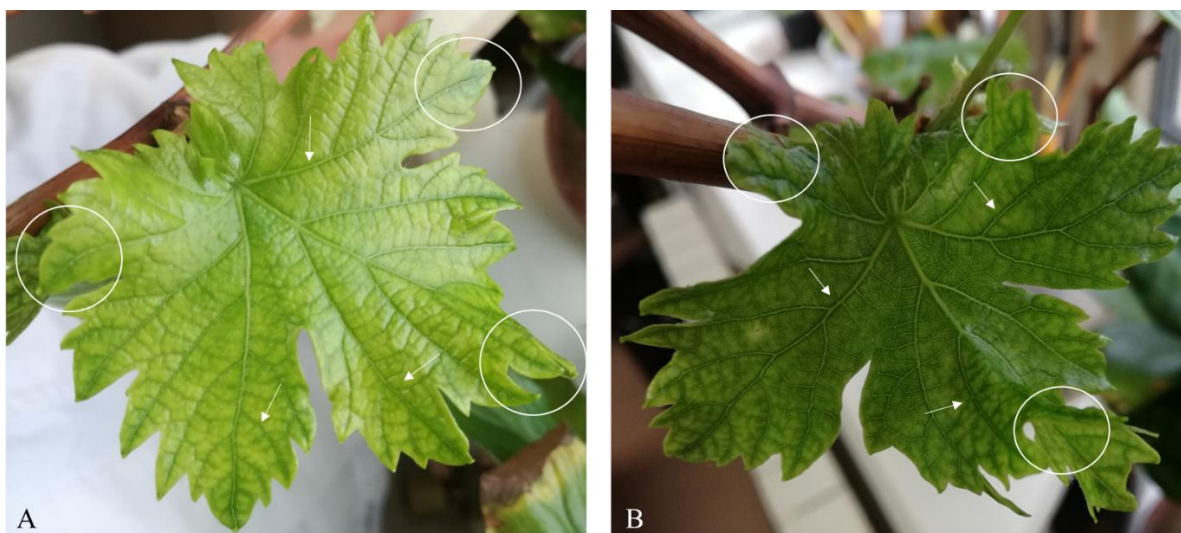
Nakon elektroforeze, gel je inkubiran 10-15 min u otopini etidijevog bromida ($c = 1 \mu\text{g/mL}$) u TAE puferu, te je DNA vizualizirana pod UV-svjetlom (Transiluminator: Uvitec) i snimljena pomoću Kodak EDAS 290 sustava za snimanje.

4. Rezultati

4.1. Fenotipska analiza simptoma viroza na listovima *V. vinifera* 'Babica', 'Plavac mali sivi' i 'Malvazija istarska'

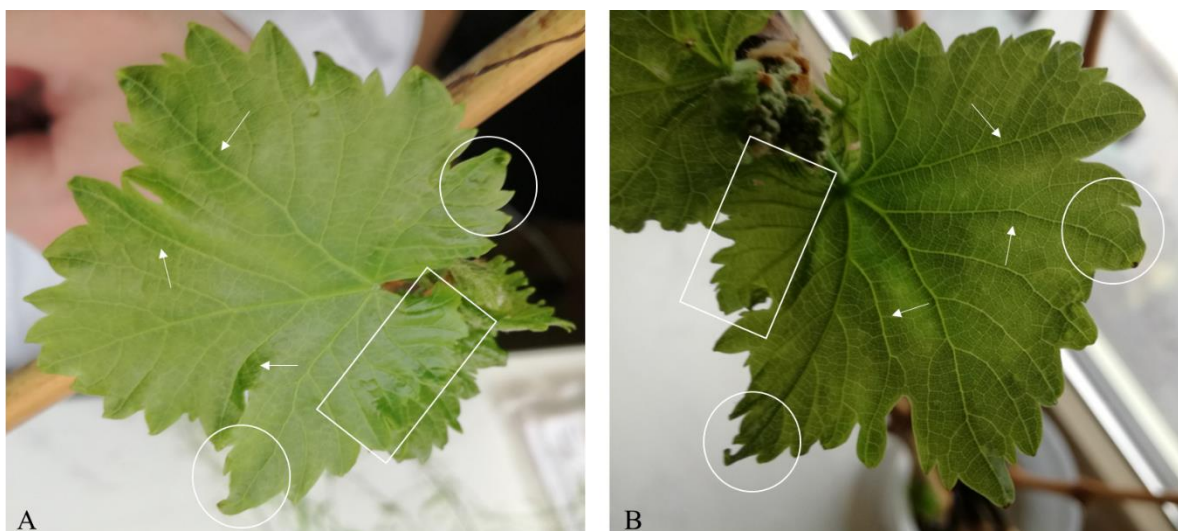
Analiziran biljni materijal bili su listovi potaknuti iz mladica vinove loze zimskih pupova, prikupljene i potaknute na razvoj u siječnju 2019. Na listovima svih ispitivanih kultivara jasno su bile vidljive fenotipske karakteristike viroza (Slike 1, 2 i 3) koje su u literaturi opisane kao karakteristični simptomi (Andret-Link i sur., 2004; Mirošević, 2007; Martelli, 1993; Ivić i Fazinić, 2011; Meng i sur., 2017).

Listovi kultivara *V. vinifera* 'Babica' pokazuju odstupanja od zdravog fenotipa što je bilo vidljivo na gotovo svim listovima analiziranih mladica. Dva reprezentativna lista prikazana su na slici 1. Kod većine listova područje oko lisnih žila bilo je zatamnjeno (Slika 1). Kako su neki listovi požutjeli, zatamnjenje oko žila bilo je slabije izraženo (Slika 1A). Listovi su bili uvijeni na rubovima, neki izrazito (Slika 1B), a neki slabije. Na slici 1B vidljivo je karakteristično žućenje na rubovima te mozaično žućenje po cijelom listu. Izraženost simptoma u kultivara *V. vinifera* 'Babica' varirala je između listova.



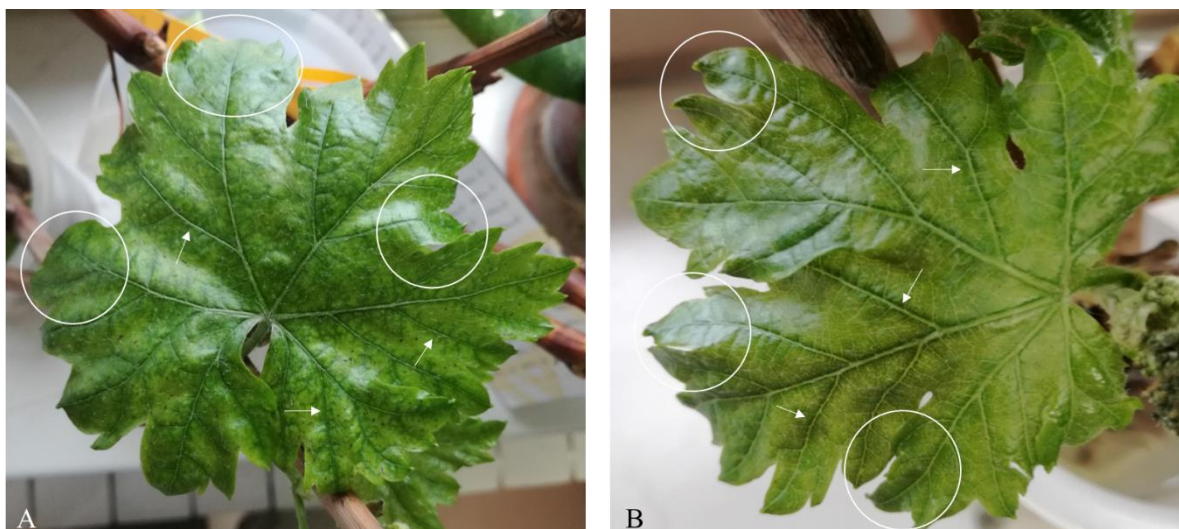
Slika 1. Dva tjedna stari listovi kultivara *V. vinifera* 'Babica' dobiveni iz mladica zimskih pupova iz nasada autohtonih kultivara „Jazbina“. Na listovima se vide znakovi virusnih infekcija u obliku zatamnjenja područja oko lisnih žila (strelice), deformiranosti i uvijenosti na rubovima (zaokruženo).

Područje oko lisnih žila kultivara 'Malvazija istarska' bilo je zatamnjeno (Slika 2). Kod oba prikazana lista počelo se pojavljivati mozaično žutilo jačeg (Slika 2B) ili slabijeg intenziteta (Slika 2A). Rubovi listova nisu požutjeli, ali su bili vidljivo uvijeni. Uvijenost listova na rubovima je slabije izražena nego kod 'Babice' (Slika 1, 2). Na listovima kultivara 'Malvazija istarska' uočljiv je fenotip lepezastog rasta (Slika 2A, B) Iako su prisutne male varijacije u izražajnosti simptoma viroza između listova, 'Malvazija istarska' ne pokazuje toliku varijabilnost kao 'Babica' .



Slika 2. Dva tjedna stari listovi kultivara *V. vinifera* 'Malvazija istarska' dobiveni iz mladica zimskih pupova iz nasada autohtonih kultivara „Jazbina“. Na listovima se vide znakovi virusnih infekcija u obliku zatamnjenja područja oko lisnih žila (strelice), uvijenosti na rubovima (zaokruženo) i lepezastog rasta (unutar pravokutnika).

Na listovima kultivara 'Plavac mali sivi', simptomi virusnih infekcija bili su jasno izraženi (Slika 3). Listovi su izrazito deformirani - najsnažnije od svih kultivara. Zbog već jako uznapredovalog mozaičnog žutila na oba prikazana lista, slabo je bilo vidljivo zatamnjeno područje oko lisnih žila (Slika 3A, B). Kao i kod 'Malvazije istarske', žutilo po rubovima listova nije bilo prisutno, ali su bili vidljivo uvijeni. Kod 'Plavca malog sivog', većina simptoma viroza je snažnije izraženo nego kod drugih kultivara i ne vidi se velika varijabilnost između listova.

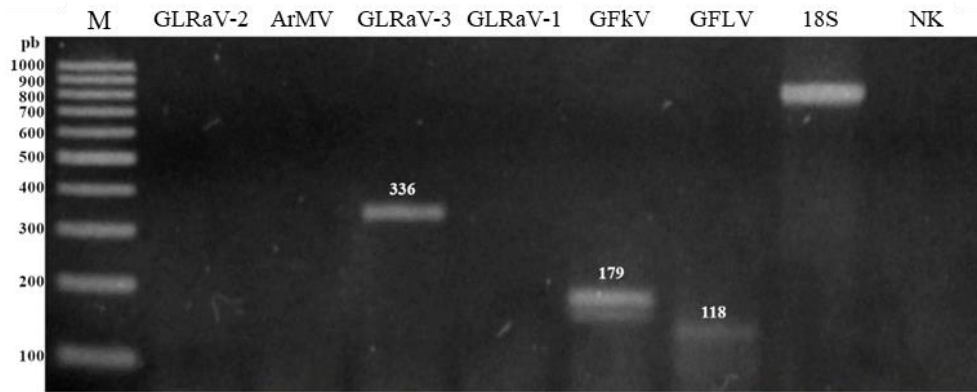


Slika 3. Dva tjedna stari listovi kultivara *V. vinifera* 'Plavac mali sivi' dobiveni iz mladica zimskih pupova iz nasada autohtonih kultivara „Jazbina“. Na listovima se vide znakovi virusnih infekcija u obliku zatamnjenja područja oko lisnih žila (strelice) i uvijenosti na rubovima (zaokruženo).

4.2. Analiza prisutnosti virusa metodom RT-PCR kod neozdravljenih jedinki

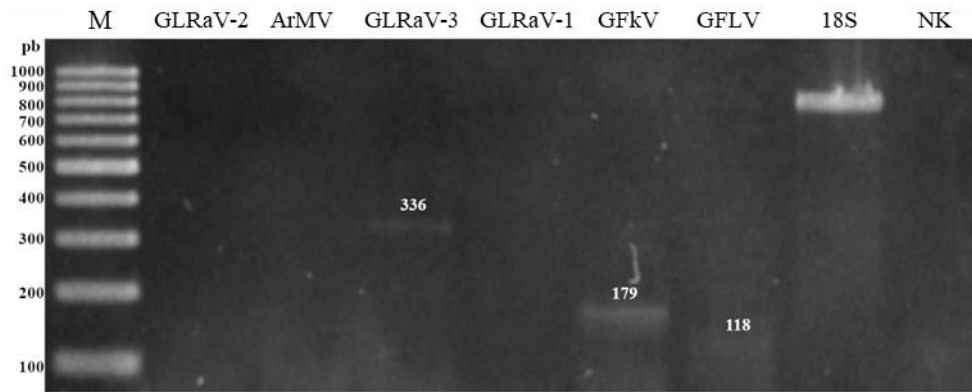
Reverznom transkripcijom uzoraka izolirane RNA istraživanih listova i umnažanjem dobivenih virusnih cDNA, kod svakog su kultivara detektirani virusi na temelju očekivanih fragmenata dobivenih specifičnim reakcijama umnažanja. Niti kod jednog kultivara nije dobiveno umnažanje u negativnoj kontroli (Slike 4, 5 i 6, linija NK). Nasuprot tome, kod svih kultivara se umnožila pozitivna kontrola očekivane veličine (Slike 4, 5 i 6, linija 18S). Na dnu svakog gela bile se vidljive početnice koje se nisu utrošile u reakciji što ukazuje na njihovu dostatnu količinu. Slike 4, 5 i 6 prikazuju reprezentativne rezultate.

U kultivara 'Babica' bila su vidljiva tri fragmenta DNA umnožena virusnim početnicama (Slika 4). Fragment umnožen početnicama specifičnim za GLRaV-3 ima očekivanu duljinu od 336 pb. Početnicama specifičnim za GFkV umnožio se slijed veličine 179 pb. Također se može vidjeti fragment umnožen početnicama specifičnim za GFLV duljine 118 pb. Prisutnost ostalih virusa nije bila utvrđena u kultivaru 'Babica'.



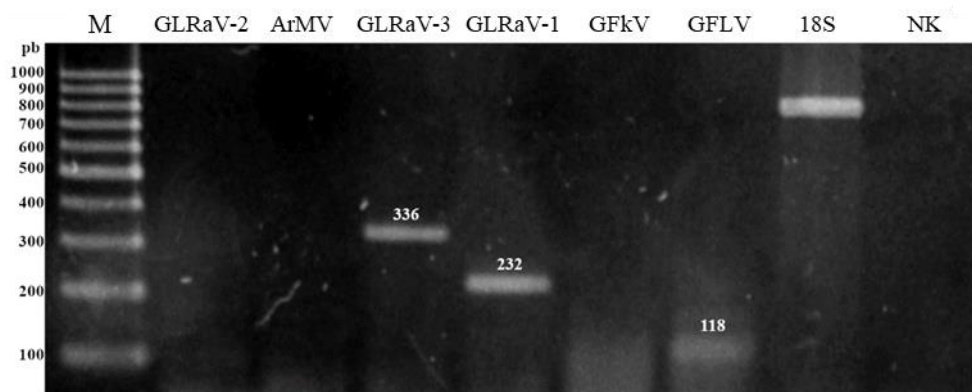
Slika 4. Rezultati gel elektroforeze DNA umnožene nakon reverzne transkripcije na RNA izoliranoj iz listova mladica zimskih pupova *V. vinifera* 'Babica' prikupljenih iz nasada autohtonih kultivara „Jazbina“. **M** označava marker na kojem su označene duljine fragmenata u parovima baza (pb). Svaki istraživani virus je označen svojom pripadnom oznakom, **18S** je pozitivna kontrola, a **NK** je negativna kontrola. Prisutni virusni fragmenti DNA su označeni svojim duljinama. Jasno je vidljiva prisutnost virusa GLRaV-3, GFkV i GFLV kod kultivara *V. vinifera* 'Babica'.

Rezultati detekcije virusa kod kultivara 'Malvazija istarska' (Slika 5) su vrlo slični onima u 'Babice'. Dobiveni rezultati ukazuju prisutnost triju virusa. Jedan od njih je GLRaV-3 čiju prisutnost pokazuje umnoženi slijed duljine 336 pb. Drugi je GFkV dokazan slijedom duljine 179 pb dobivenim korištenjem specifičnih početnica. Treći vidljivi fragment se umnožio početnicama specifičnim za GFLV i najmanji je te ima očekivanu duljinu od 118 pb. Valja naglasiti da iako su ovi rezultati slični onima od kultivara 'Babice', umnažanje virusnih fragmenata DNA slabijeg je intenziteta u usporedbi s slijedom dobivenim u pozitivnoj kontroli.



Slika 5. Rezultati gel elektroforeze DNA umnožene nakon reverzne transkripcije na RNA izoliranoj iz listova mladica zimskih pupova *V. vinifera* 'Malvazija istarska' prikupljenih iz nasada autohtonih kultivara „Jazbina“. **M** označava marker na kojem su označene duljine fragmenata u parovima baza (pb). Svaki istraživani virus je označen svojom pripadnom oznakom, **18S** je pozitivna kontrola, a **NK** je negativna kontrola. Prisutni virusni fragmenti DNA su označeni svojim duljinama. U uzorku *V. vinifera* 'Malvazija istarska' su prisutni virusi GLRaV-3, GFkV i GFLV.

U kultivara 'Plavac mali sivi' dokazane su bile infekcije virusima GLRaV-1, GLRaV-3 i GFLV (Slika 6). Naime, vidljivo je da se početnicama za GLRaV-3 umnožio fragment duljine 336 pb kao i kod *V. vinifera* 'Babice' i *V. vinifera* 'Malvazije istarske'. Također, uz njega se mogu vidjeti sljedovi DNA duljine 232 pb umnoženi početnicama za GLRaV-1 te oni umnoženi početnicama za GFLV duljine 118 pb.

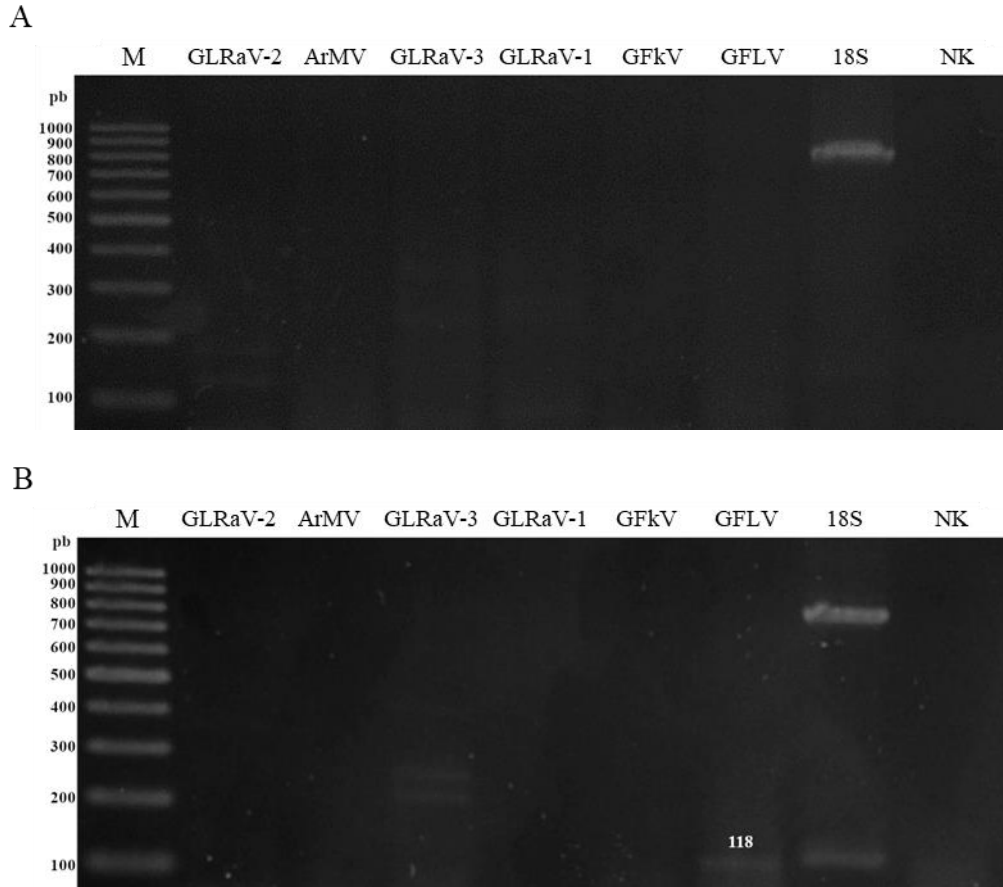


Slika 6. Rezultati gel elektroforeze DNA umnožene nakon reverzne transkripcije na RNA izoliranoj iz listova mladica zimskih pupova *V. vinifera* 'Plavac mali sivi' prikupljenih iz nasada autohtonih kultivara „Jazbina“. **M** označava marker na kojem su označene duljine fragmenata u parovima baza (pb). Svaki istraživani virus je označen svojom pripadnom oznakom, **18S** je pozitivna kontrola, a **NK** je negativna kontrola. Prisutni virusni fragmenti DNA su označeni svojim duljinama. Ovime je dokazana prisutnost virusa GLRaV-3, GLRaV-1 i GFLV kod istraživanog kultivara *V. vinifera* 'Plavac mali sivi'.

4.3. Analiza prisutnosti virusa metodom RT-PCR nakon postupka ozdravljanja

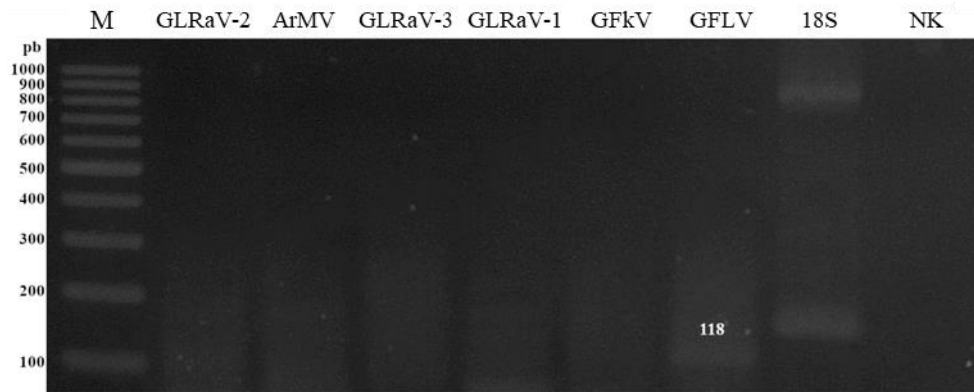
Nakon reverzne transkripcije i umnažanja ciljnih cDNA PCR-om, vidljivo je da je provedbom postupka ozdravljanja i regeneracije potencijalno ozdravljenih biljaka, većina virusa bila uspješno eliminarna iz tkiva (Slike 7, 8 i 9). Kod svih je kultivara prisutno umnažanje pozitivne kontrole dok kod negativne kontrole nije prisutno nikakvo umnažanje (Slike 7, 8 i 9, 18S i NK) što ukazuje na uspješnu provedbu eksperimenta. Slabo vidljive vrpce neočekivanih veličina prisutne na gelovima rezultat su nespecifičnog vezanja početnica te ne ukazuju na prisutnost virusnih gena.

U kultivara *V. vinifera* 'Babica' analizirane su tri potencijalno ozdravljene biljke, od kojih su rezultati za dvije prikazani na slici 7A, B. Dvije od tri biljke bile su potpuno zdrave, odnosno ozdravljene od sva tri virusa koja su bila identificirana u ishodišnom materijalu za ozdravljanje prikupljenom u pokusnom nasadu "Jazbina". Rezultati za obje biljke pokazuju potpuni izostanak specifičnog umnažanja virusnih gena za sve analizirane viruse (Slika 7A). Treća potencijalno ozdravljena biljka i dalje je ostala inficirana virusom GFLV, na što ukazuje slijed veličine 118pb umnožen početnicama specifičnim za GFLV (Slika 7B). Iako se radi o malom uzorku, efikasnost ozdravljanja kultivara 'Babica' je zadovoljavajuća jer su 2/3 biljaka generiranih tehnikama kulture tkiva u potpunosti ozdravljene.



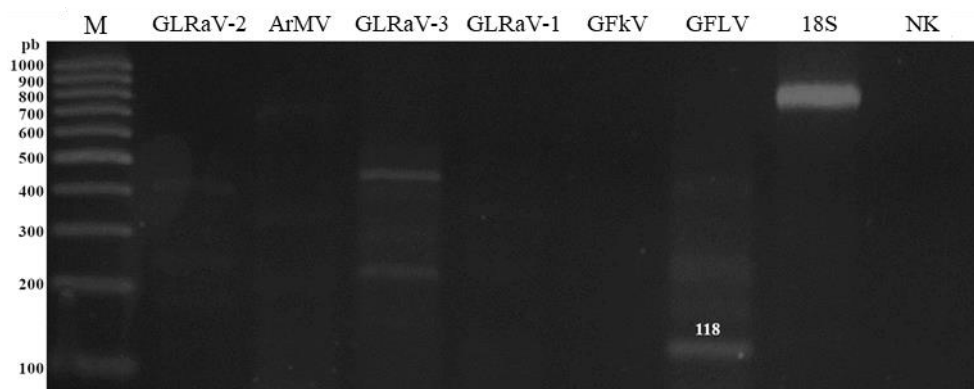
Slika 7. Rezultati gel elektroforeze DNA umnožene nakon reverzne transkripcije na RNA izoliranoj iz listova potencijalno ozdravljenih biljaka *V. vinifera* 'Babice'. (A) Primjer potpuno ozdravljene biljke. (B) Primjer biljke koja nije u potpunosti ozdravljena. **M** označava marker na kojem su označene duljine fragmenata u parovima baza (pb). Svaki istraživani virus je označen svojom pripadnom oznakom, **18S** je pozitivna kontrola, a **NK** je negativna kontrola. Prikazani su rezultati dvije različite mladice iz zimskih pupova. Vidljivo je da su iz jedne od biljaka čiji su rezultati prikazani *V. vinifera* 'Babice' eliminirani svi virusi.

Rezultati dobiveni u kultivara *V. vinifera* 'Malvazija istarska' (Slika 8) ukazuju da je u obje analizirane biljke primijenjeni postupak ozdravljivanja bio uspješan u slučaju eliminacije dva od tri dokazano prisutna virusa. Naime, u dvije testirane, potencijalno ozdravljene biljke, od kojih su rezultati dobiveni na jednoj prikazani na slici 8, obje ostaju inficirane virusom GFLV (118pb), dok su ostala dva tipa virusa, GLRaV-1 i GFkV, uspješno uklonjena primijenjenom i do sada neobjavljenom tehnikom ozdravljivanja.



Slika 8. Rezultati gel elektroforeze DNA umnožene nakon reverzne transkripcije na RNA izoliranoj iz listova potencijalno ozdravljenih biljaka *V. vinifera* 'Malvazija istarska'. **M** označava marker na kojem su označene duljine fragmenata u parovima baza (pb). Svaki istraživani virus je označen svojom pripadnom oznakom, **18S** je pozitivna kontrola, a **NK** je negativna kontrola. Na gelu je vidljiv umnožen fragment specifičan za GFLV.

Slično kao u *V. vinifera* 'Malvazije istarske', u kultivara *V. vinifera* 'Plavac mali sivi' jasno se može vidjeti samo jedan fragment DNA umnožen virusnim početnicama (Slika 9). Taj fragment ima duljinu 118 pb i odgovara virusu GFLV što znači da taj virus ostaje prisutan u obje biljke ovog kultivara nakon postupka ozdravljanja. Ostali vidljivi fragmenti posljedica su nespecifičnih umnažanja.



Slika 9. Rezultati gel elektroforeze DNA umnožene nakon reverzne transkripcije na RNA izoliranoj iz listova potencijalno ozdravljenih biljaka *V. vinifera* 'Plavac mali sivi'. **M** označava marker na kojem su označene duljine fragmenata u parovima baza (pb). Svaki istraživani virus je označen svojom pripadnom oznakom, **18S** je pozitivna kontrola, a **NK** je negativna kontrola. Na gelu je vidljivo umnažanje fragmenta specifičnog za GFLV.

5. Rasprava

Glavni cilj ovog rada bio je testirati efikasnost ozdravljanja ranije primijenjenom kombinacijom tehnika kulture tkiva (Leljak-Levanić i Malenica, neobjavljeno) triju hrvatskih kultivara vinove loze: *V. vinifera* 'Plavac mali sivi', 'Babica' i 'Malvazija istarska'. To je učinjeno detekcijom virusa u listovima jedinki spomenutih kultivara, prije provedbe postupka i nakon provedbe postupka ozdravljanja. Standardna tehnika detekcije virusnih proteina u biljnom tkivu je ELISA no ona u mnogim slučajevima ne pokazuje dovoljnu osjetljivost (Monis i Bestwick, 1996; Ling i sur., 2001). Tako u literaturi pronalazimo podatke da je detekcija virusnih infekcija u šljivi, trešnji, bademu i breskvi uspješna u prosječno samo 40% detekcija u odnosu na RT-PCR (Matic i sur., 2009). Na temelju toga jasno je da se ozdravljenim jedinkama mogu smatrati tek one u kojima virusi nisu detektirani ni najosjetljivijim postojećim tehnikama poput kombinirane metode reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR). Detekcija virusnih gena u biljnim stanicama pomoću RT-PCR-a se zbog svoje velike osjetljivosti danas sve češće koristi, ali ona također pokazuje neke nedostatke. Jedan nedostatak je razlika u protokolima kod različitih biljaka te ovisnost osjetljivosti metode o prisutnosti inhibitora reverzne transkriptaze ili DNA polimeraze u uzorku (Gambino i Gribaudo, 2006). Zato se za svaku vrstu prilagođavaju protokoli kako bi se maksimizirala osjetljivost. Nadalje, zbog činjenice da je najčešće potrebno detektirati više virusa, metoda postaje kompleksnija jer nije prilagođena simultanoj detekciji velikog broja različitih virusa. Do sad je razvijen protokol za simultanu detekciju maksimalno devet različitih virusa (Gambino i Gribaudo, 2006). Stoga je jedan od ciljeva ovog rada bilo uspostaviti metodu RT-PCR-a koja bi bila značajno osjetljivija nego uobičajeno korištena ELISA te omogućila paralelnu detekciju što većeg broja virusa.

Do sada je poznato ukupno 65 uzročnika virusnih bolesti na vinovoj lozi i broj im je u porastu (Martelli, 2014). Zbog porasta broja virusa koji inficiraju vinovu lozu, potrebno je stalno dolaziti do novih, sve osjetljivijih i djelotvornijih metoda ozdravljanja vinove loze od virusa. Simultana infekcija više virusa iste biljke može dovesti do izražajnijih simptoma ili se oni međusobno mogu maskirati zbog čega je važno razvijati metode kojima se može istovremeno detektirati što više virusa. Različite vrste virusa uzrokuju različite simptome, pa time i različitu razinu štete u gospodarstvu (Šutić i sur., 1999) tako da je također dobro fokusirati razvoj metoda za eliminaciju ekonomski najštetnijih virusa. Zbog toga je ovo

istraživanje bilo ograničeno na analizu najraširenijih i najštetnijih virusa: GFLV, ArMV, GFkV te GLRaV-1, 2 i 3, a postignuta je simultana detekcija 4 različita virusa: GLRaV-1, GLRaV-2, GFkV i GFLV.

Zavijenost na rubovima i zatamnjeno područje utvrđeno oko lisnih žila listova kultivara *V. vinifera* 'Babica' su simptomi karakteristični za virusima zaražene crne kultivare, posebice pri zarazi virusima GLRaV-1, 2 i 3 (Martelli, 1993; Ivić i Fazinić, 2011; Meng i sur., 2017). Ovo fenotipsko obilježje ukazivalo je na infekciju kultivara 'Babica', a metodom RT-PCR potvrđena je prisutnost virusa GLRaV-3. Deformiranost, naboranost i žutilo listova je simptom uzrokovan virusom GFLV, ali i ArMV (Dunez i sur., 1988; Martelli, 1993; Ivić i Fazinić, 2011). Analizom je dokazano da je kod istraživanih jedinki *V. vinifera* 'Babica' mogući uzrok ovog fenotipa GFLV. Velika varijabilnost u simptomima među listovima je vjerojatno posljedica nepravilnog širenja virusa kroz biljku. Listovi u kojima se virus snažnije umnožio pokazuju snažnije izražene simptome.

Na listovima kultivara *V. vinifera* 'Malvazija istarska' vidljivi su simptomi slični onima kod *V. vinifera* 'Babica' samo su simptomi bili slabije izraženi. Takvi su rezultati potvrđeni i analizom RT-PCR-om jer su u 'Malvaziji istarskoj' detektirani isti virusi kao i kod *V. vinifera* 'Babica' samo u manjoj količini. Rezultat je u skladu s činjenicom da ovi virusi slabije izražavaju simptome na bijelim nego na crnim kultivarima (Ivić i Fazinić, 2011). Uz to, na ovom kultivaru najbolje je bio vidljiv simptom lepezastog rasta lista koji uzrokuje GFLV (Mirošević, 2007). Kao i kod *V. vinifera* 'Babica', analiza RT-PCR-om pokazuje da je većina simptoma najvjerojatnije bila uzrokovana virusom GLRaV-3 dok lepezast rast lista i žutilo pokazuju prisutnost GFLV-a (Dunez i sur., 1988; Ivić i Fazinić, 2011).

Listovi kultivara *V. vinifera* 'Plavac mali sivi' pokazali su najsnažnije simptome. Takve rezultate objašnjava detekcija virusa RT-PCR-om. Naime, sva tri virusa detektirana kod *V. vinifera* 'Plavca malog sivog', GLRaV-1 i 3 te GFLV, prema literaturi izazivaju značajne fenotipske simptome zaraze (Dunez i sur., 1988; Martelli, 1993; Ivić i Fazinić, 2011; Meng i sur., 2017). Za razliku od 'Plavca malog sivog', ostali kultivari bili su zaraženi sa samo dva virusa koja izazivaju vidljive simptome, dok treći virus GFkV ne izaziva vidljive simptome na listovima (Mirošević, 2007). Kao što je ranije opisano, snažna uvijenost listova na rubovima i zatamnjeno područje oko lisnih žila su simptomi karakteristični za viruse GLRaV-1, 2 i 3. Analiza RT-PCR-om je pokazala da simptome u kultivaru *V. vinifera* 'Plavac mali sivi' vjerojatno uzrokuju GLRaV-1 i GLRaV-3. Također žute regije na listovima pokazatelj su

zaraze GFLV-om (Dunez i sur., 1988; Ivić i Fazinić, 2011). Izrazita deformiranost listova prisutna kod *V. vinifera* 'Plavca malog sivog' je također simptom zaraze GFLV-om.

Za razliku od ostalih istraživanih virusa, GFkV je teško detektirati na temelju fenotipske analize budući da rijetko pokazuje simptome u vrste *Vitis vinifera* (Mirošević, 2007), ali zato je ovaj virus uspješno detektiran pomoću RT-PCR-a. Iz fenotipske analize je vidljivo da simptomi istog virusa blago variraju u ovisnosti o kultivaru te da neki kultivari poput *V. vinifera* 'Malvazije istarske' bolje podnose infekcije te pokazuju slabije izražene simptome.

U literaturi postoji usporedba različitih metoda izvođenja RT-PCR-a i izolacije RNA (Gambino i Gribaudo, 2006). U navedenom istraživanju detektirano je devet različitih virusa, među kojima su i svi ovdje istraživani. Iz tog rada su preuzete i početnice za ovo istraživanje. Umnažanjem virusno-specifičnih fragmenata DNA pomoću PCR-a, u svakom istraživanom kultivaru je detektirano po tri virusa. U listovima *V. vinifera* 'Babice' i 'Malvazije istarske' GLRaV-3, GFkV i GFLV, a kod *V. vinifera* 'Plavca malog sivog' GLRaV-1, GLRaV-3 i GFLV.

Očekivana duljina fragmenta DNA umnoženog početnicama za GLRaV-3 je 336 pb. To odgovara fragmentima umnoženim početnicama u svakom istraživanom kultivaru što potvrđuje infekciju ovim virusom. Kod svih uzoraka *V. vinifera* 'Babice' i 'Malvazije istarske' umnožio se fragment DNA veličine 179 pb. Iz toga se može zaključiti da su sve jedinke *V. vinifera* 'Babice' i 'Malvazije istarske' bile zaražene GFkV-om iako je ovaj virus nemoguće detektirati na temelju fenotipa. Taj fragment se nije umnožio ni kod jednog uzorka *V. vinifera* 'Plavca malog sivog' što potvrđuje da istraživane jedinke ovog kultivara nisu njime inficirane. Fragment DNA duljine 118 pb se također umnožio u svim istraživanim kultivarima što predstavlja fragment specifičan za GFLV i time dokazuje njegovu prisutnost. S druge strane, sve su testirane jedinke ozdravljene barem od nekih virusa, dok je potpuno ozdravljenje testiranom metodom ozdravljivanja uspješno potaknuto u kultivaru 'Babice'. Kod ozdravljenih jedinki *V. vinifera* 'Babice', unatoč tome što postoje nespecifična umnažanja, ne vidi se niti jedan fragment specifičan za bilo koji virus. Uz prikazane rezultate, bio je odrađen još jedan RT-PCR na ozdravljenim jedinkama ovog kultivara te je utvrđena samo prisutnost GFLV-a. Unatoč tome, činjenica je da su 2/3 jedinke u potpunosti ozdravljene od virusa što je iznimno obećavajući rezultat.

Kod *V. vinifera* 'Malvazije istarske', vidljiv je bio fragment specifičan za virus GFLV duljine 118 pb. To ukazuje da biljke generirane u kulturi tkiva nisu u potpunosti ozdravljene, iako su preostala dva virusa prisutna u ishodišnom materijalu uspješno uklonjena. Ovi rezultati

potvrđuju da je metodama kulture tkiva moguće ozdraviti vinovu lozu od većine ovdje istraživanih virusa.

Kod *V. vinifera* 'Plavca malog sivog', slabo su bila vidljiva dva fragmenta DNA umnožena u reakciji s početnicama specifičnim za GLRaV-3. Jedan je duljine oko 230 pb, a drugi oko 450 pb. Niti jedan od njih nije na očekivanom mjestu za fragment DNA od GLRaV-3 (336 pb) što ukazuje da se radi o nespecifičnim umnažanjima te taj virus nije prisutan u uzorku. S druge strane, jasno je vidljiv fragment DNA umnožen u reakciji specifičnim za GFLV i to na očekivanom mjestu (118 pb). Zato je valjano zaključiti da iako su biljke ozdravljene od većine virusa, ipak nisu od GFLV-a.

Potrebno je napomenuti da su u nekim reakcijama umnoženi fragmenti DNA na neočekivanim mjestima kao posljedica nespecifičnih umnažanjima. Valja naglasiti da je ova metoda izrazito osjetljiva te je zbog toga podložna nespecifičnim umnažanjima (Ruiz-Villalba i sur., 2017).

Rezultati detekcije virusa PCR-om pokazuju da su svi kultivari uspješno ozdravljeni barem od 2 od 3 virusa kojima su bila zaražena ishodišna tkiva uvedena u postupak ozdravljivanja. U korist ozdravljivanju vinove loze metodama kulture tkiva posebice doprinosi rezultat ozdravljivanja kultivara *V. vinifera* 'Babica' kod kojeg su dobivene čak 2/3 potpuno ozdravljene jedinke. Na temelju potpunog ozdravljivanja ovog kultivara možemo pretpostaviti da je potpuno ozdravljivanje moguće i u drugim kultivarima ali da je potrebno provesti testiranje na većem broju regeneriranih biljaka.

Primjenom kulture nodalnih odsječaka od jedinki kod kojih su eliminirani svi virusi, u kratkom vremenu moguće je dobiti velik odnosno neograničen broj potomaka u potpunosti oslobođenih od virusa. Ta metoda generira izrazito stabilne klonove uz minimalno korištenje regulatora rasta (Jelaska, 1994). Zato je teoretski dovoljno naći jednu potpuno ozdravljenu biljku u uzorku za dobivanje neograničene količine zdravih matičnih biljaka u svrhu započinjanja zdravih vinograda i ograničavanja širenja viroza vinove loze. S druge strane, ozdravljena biljka prije šire primjene mora nužno biti podvrgnuta testiranju sortnog identiteta obzirom na problem somaklonske varijabilnosti koji se pojavljuje pri provedbi kulture meristema i srodnih tehnika (Jelaska, 1994).

Ukratko, ovdje opisana metoda detekcije virusa kombinacijom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom omogućuje pouzdanu detekciju virusa GLRaV-1, GLRaV-2, GFKV i GFLV u vremenu kraćem od jednog dana po reakciji iz listova mladica vinove loze.

Ova metoda je mnogo osjetljivija, jeftinija i brža od standardno korištene ELISE tako da je izvjesno da će ju zamijeniti pri detekciji infekcija vinove loze kao najpouzdanija i najrelevantnija trenutno dostupna tehnika. Nadalje, ovim je istraživanjem pokazano je da postoji potencijalna standardizirana metode kulture tkiva koja omogućuje ozdravljanje hrvatskih autohtonih kultivara vinove loze.

6. Zaključak

Jedinke vinove loze zaražene virusima GLRaV-1, GLRaV-3 i GFLV pokazuju kompleks simptoma jasno vidljivih na listovima. Primjenom metode RT-PCR uspješno su detektirani virusi GLRaV-1, GLRaV-3 i GFLV te virus GFkV čija je infekcija vinove loze latentna.

Nakon provedbe potencijalne tehnike ozdravljanja, korištenjem zaraženog materijala kao ishodišnog, svaki od tri istraživana kultivara ozdravljen je od barem dva od tri virusa, a jedan kultivar je u potpunosti ozdravljen.

Budući da u listovima potencijalno ozdravljenih biljaka većina istraživanih virusa nije detektirana, tehnike kulture biljnog tkiva koje su korištene s ciljem eliminacije virusa i ozdravljanja vinove loze imaju potencijal šire primjene u postupcima ozdravljanja hrvatskih autohtonih kultivara, te njihov potencijal treba istražiti na većem uzorku kultivara i jedinki.

7. Zahvale

Velika zahvala izv. prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić na mentorstvu, sugeriranoj metodologiji istraživanja, preporučenoj literaturi te pomoći pri izradi ovog rada. Zahvaljujem mag. biol. mol. Mateji Jagić za stalnu i neposrednu pomoć pri provedbi laboratorijskih tehnika i metoda. Izv. prof. dr. sc. Dunji Leljak-Levanić i doc. dr. sc. Nenadu Malenici zahvaljujem na biljnom materijalu korištenom u ovom radu. Bez njih ovo istraživanje ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem izv. prof. Nataši Bauer i ostalim kolegama iz Laboratorija za razvojnu biologiju biljaka Biološkog odsjeka PMF-a na svim sugestijama i pomoći tijekom mog rada.

Sveučilištu u Zagrebu zahvaljujem na financijskim sredstvima koja su omogućila ovo istraživanje.

8. Literatura

Alliaume A., Reinbold C., Erhardt M., Beuve M., Hily J.M., Lemaire O., Herrbach E. (2018) Virus preparations from the mixed-infected P70 Pinot Noir accession exhibit GLRaV-1/GVA 'end-to-end' particles. *Archives of Virology* **163** (11), 3149-3154.

Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G. i sur. (2004) Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology* **86** (3), 183-195.

Bertazzon N., Borgo M., Vanin S., Angelini E. (2010) Genetic variability and pathological properties of Grapevine leafroll-associated virus 2 isolates. *European Journal of Plant Pathology* **127**, 185–197.

Bonnefond L., Schellenberger P., Basquin J., Demangeat G., Ritzenthaler C., Chenevert R., Balg C., Frugier M., Rudinger-Thirion J., Giege R., Lorber B., Sauter C. (2011) Exploiting Protein Engineering and Crystal Polymorphism for Successful X-Ray Structure Determination. *Crystal Growth and Design* **11**, 4334.

Burger J.T., Maree H.J., Gouveia P., Naidu R.A. (2017) Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. In: Meng, B.; Martelli, G.P.; Golino, D.A.; Fuchs, M. (Eds.) Springer, Heidelberg, Germany.

Byzova N.A., Vinogradova S.V., Porotikova E.V., Terekhova U.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. (2018) Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus. *Biosensors* **8** (4), pii: E111.

Diklić K. (2014) Zaraženost sorte Muškati momjanski (*Vitis vinifera* L.) virusima. *Diplomski rad* Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Dhekney S.A., Li Z.J.T., Compton M.E., Gray D.J. (2009) Optimizing Initiation and Maintenance of *Vitis* Embryogenic Cultures. *Hortscience* **44** (5), 1400-1406.

Dunez J., Phillips D.H., Lelliott R.A., Archer S.A. (1988) European handbook of plant diseases. In: Smith, I.N.; Dunez, J.; Phillips, D.H.; Lelliott, R.A.; Archer, S.A. (Eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.

- Engelbrecht D.J., Kasdorf G.G.F. (1990) Field spread of corky bark, fleck, leafroll and Shiraz decline disease and associated viruses in South African grapevines. *Phytophylactica* **22**, 347-354.
- Fortusini A., Scattini G., Cinquanta S., Prati S. (1996) Natural spread of grapevine leafroll virus 1 (GLRV-1), grapevine leafroll virus 3 (GLRV-3) and Grapevine fleck virus (GFkV). *Informatore Fitopatologico* **46**, 39-43.
- Francki R.I.B., Milne R.G., Hatta T. (1985) Atlas of plant viruses. Volume II. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida USA.
- Gale G. (2003) Wine: A scientific exploration. In: Sandler, M.; Pinder, R. (Eds.) Taylor and Francis, London, UK.
- Gambino G., Bondaz J., Gribaudo I. (2006) Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology* **114**, 397-404.
- Gambino G., Gribaudo I. (2006) Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Phytopathology* **96** (11), 1223-1229.
- Goussard P.G., Wiid J., Kasdorf G.G.F. (1991) The effect of *in vitro* somatic embryogenesis in eliminating fanleaf virus and leafroll associated viruses from grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture* **12**, 77-81.
- Gribaudo I., Gambino G., Cuzzo C., Mannini F. (2006) Attempts to eliminate Grapevine rupestris stem pitting-associated virus from grapevine clones. *Journal of Plant Pathology* **88**, 293-298.
- Hewitt W.B., Raski D.J., Goheen A.C. (1958) Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology* **48**, 586-595.
- Huss B., Walter B., Fuchs M. (1989) Cross-protection between arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates in *Chenopodium quinoa*. *Annals of Applied Biology* **114**, 45-60.
- Ivandija T. (2008) Autohtone vinske sorte. *Glasnik zaštite bilja* **6**, 117-125.

Ivić D., Fazinić T. (2011) Economically important viruses of grapevine. In: Masten Milek, T (Eds.) Croatian center for agriculture food and rural affairs, Zagreb, Croatia.

Jelaska S. (1994) Plant Cell and Tissue Culture. In: Sambolek-Hrbić, E. (Eds.) Školska knjiga, Zagreb, Croatia.

Ling K.S., Zhu H.Y., Petrovic N., Gonsalves D. (2001) Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting grapevine leafroll-associated closterovirus-3 in field samples. *American Journal of Enology and Viticulture* **52**, 21-27.

Malenica N., Šimon S., Besendorfer V., Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2011) Whole genome amplification and microsatellite genotyping of herbarium DNA revealed the identity of an ancient grapevine cultivar. *Naturwissenschaften* **98** (9), 763-772.

Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I., Preiner D., Zdunić G., Bubola M., Stupić D., Andabaka Ž., Marković Z., Šimon S., Žulj Mihaljević M., Ilijaš I., Marković D. (2015) Green Book: Indigenous Grapevine Varieties of Croatia. In: Maletić, E.; Karoglan Kontić, J.; Ilijaš, I (Eds.) State Institute for Nature Protection, Zagreb, Croatia

Maree H.J., Almeida R.P., Bester R., i sur. (2013) Grapevine leafroll-associated virus 3. *Frontiers in Microbiology* **4**, 82.

Martelli G.P. (1993) Graft-transmissible Diseases of Grapevines, Handbook for Detection and Diagnosis In: Martelli G.P. (Eds.) FAO, Rome, Italy.

Martelli G.P. (2014) Grapevine-infecting viruses. *European Journal of Plant Pathology* **96**, 7–8.

Matic S., Minafra A., Bosica D., da Cunha A.T.P., Martelli G.P. (2009) Production of antibodies to Little cherry virus 1 coat protein by DNA prime and protein boost immunization. *Journal of Virological Methods* **155**, 72–76.

Mekuria G., Ramesh S.A., Alberts E., Bertozzi T., Wirthensohn M., Collins G., Sedgley M. (2003) Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of Prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods* **114** (1), 65-69.

Meng B., Martelli P.G., Golino D.A., Fuchs M. (2017) Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management **978**, 167-197; 229-257.

Mirošević N. (2007) Vine Propagation and Nursery Production. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, Croatia.

Monis J., Bestwick R.K. (1996) Detection and Localization of Grapevine Leafroll Associated Closteroviruses in Greenhouse and Tissue Culture Grown Plants *American Journal of Enology and Viticulture* **47** (2), 199-205.

Panattoni A., D'Anna F., Cristani C., Triolo E. (2007) Grapevine vitivirus A eradication in *Vitis vinifera* explants by antiviral drugs and thermotherapy. *Journal of Virological Methods* **146** (1-2): 129-135.

Perrone I., Chitarra W., Boccacci P., Gambio G. (2017) Grapevine-virus-environment interactions: An intriguing puzzle to solve. *New Phytologist* **213**, 983–987.

Poojari S., Boulé J., DeLury N., Lowery D.T., Rott M., Schmidt A.M., Úrbez-Torres J.R. (2017) Epidemiology and Genetic Diversity of Grapevine Leafroll-Associated Viruses in British Columbia. *Plant Disease* **101** (12), 2088-2097.

Popescu C.F., Buciumeanu E.C., Visoiu E. (2003) Somatic embryogenesis, a reliable method for Grapevine fleck virus free grapevine regeneration. *Extended Abstracts 14th Meeting of ICVG, Locorotondo 2003*, 243.

Quacquarelli A., Gallitelli D., Savino V., Martelli G.P. (1976) Properties of Grapevine Fanleaf Virus. *Journal of General Virology* **32**, 349-360.

Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., Meredith C.P. (1983) Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease* **67** (3), 335-338.

Ruiz-Villalba A., van Pelt-Verkuil E., Gunst Q. D., Ruijter J. M., van den Hoff M. J. (2017) Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). *Biomolecular detection and quantification* **14**, 7–18.

Sabella E., Pierro R., Luvisi A., i sur. (2018) Phylogenetic analysis of viruses in Tuscan *Vitis vinifera sylvestris* (Gmel) Hegi. *PLoS One* **13** (7), e0200875.

Sanfaçon H., Wellink J., Le Gall O., Karasev A., Van Der Vlugt R., Wetzel T. (2009) Secoviridae: A proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Archives of Virology* **154** (5), 899-907.

- Sharma A.M., Baraff B., Hutchins J.T., i sur. (2015) Relative Prevalence of Grapevine Leafroll-Associated Virus Species in Wine Grape-Growing Regions of California. *PLoS One* **10**(11), e0142120.
- Sim S.T. (2006) Virus Elimination from Grape Selections Using Tissue Culture. *FPS Grape Program Newsletter November 2006*: 30-31.
- Sim S.T. (2010) Micro- vs. Macroshoot Tip Tissue Culture Therapy for Disease Elimination in Grapevines. *FPS Grape Program Newsletter October 2010*: 12-15.
- Simpkins I., Walkey D.G.A., Neely H.A. (1981) Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Annual Applied Biology* **99**,161–169.
- Škračić Ž., Banović M. (2017) Usporedba karakteristika sorata vinove loze Babica i Tribidrag. *Glasnik zaštite bilja* **5**, 68-75.
- Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. (1999) Virus diseases of fruit trees. In: Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. (Eds.) *Handbook of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Thierry W., Chisholm J., Dupuis-Maguiraga L., Bassler A., Sanfaçon H. (2013) In vitro and in vivo evidence for differences in the protease activity of two arabis mosaic nepovirus isolates and their impact on the infectivity of chimeric cDNA clones. *Virology* **446** (1-2), 102-111.
- Vigne E., Komar V., Fuchs M. (2004) Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research* **13**, 165-179.
- Vončina D.,Rwahnih A.M., Rowhani A., Gouran M., Almeida R.P.P. (2017) Viral Diversity in Autochthonous Croatian Grapevine Cultivars. *Plant Disease* **101** (7), 1230-1235.
- Wang M.R., Cui Z.H., Li J.W., Hao X.Y., Zhao L., Wang Q.C. (2018) In vitro thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods* **14**, 87.
- Xiao H., Shabanian M., Moore C., Li C., Meng B. (2018) Survey for major viruses in commercial *Vitis vinifera* wine grapes in Ontario. *Virology Journal* **15** (1), 127.
- Žulj Mihaljević M. (2017) Analiza genetske strukture i srodstva hrvatskih autohtonih sorti vinove loze. *Doktorska disertacija*. Agronomski fakultet. Sveučilište u Zagrebu.

9. Sažetak

Bruno Pavletić

Detekcija virusa u hrvatskim autohtonim kultivarima vinove loze metodom RT-PCR prije i nakon ozdravljivanja

Vinova loza (*Vitis vinifera*) je biljna vrsta velike agronomske važnosti. Virusne infekcije vinove loze izazvane velikim brojem različitih virusa kontinuirano uzrokuju velike ekonomske štete u vinogradarskoj proizvodnji u cijelom svijetu. U ovom istraživanju, opisana je metoda za detekciju šest najčešćih virusa vinove loze (GLRaV-1, 2 i 3, ArMV, GFkV i GFLV) u listovima potaknutim iz mladica zimskih pupova, koristeći visoko osjetljivu tehniku RT-PCR. Ovo je prvo istraživanje u kojem je metoda RT-PCR korištena za detekciju virusa na hrvatskim autohtonim kultivarima vinove loze 'Babica', 'Plavac mali sivi' i 'Malvazija istarska'. Analizom prisutnosti virusa u potencijalno ozdravljenim biljkama te onima s kojih je uziman ishodišni materijal za ozdravljivanje pokazano je da novo-razvijena, do sada neobjavljena metoda za eliminaciju virusa iz vinove loze, ima potencijal eliminacije virusa i ozdravljivanja. Dokaz tome je utvrđeno potpuno ozdravljivanje dvije od tri testirane jedinice kultivara 'Babica' od svih šest analiziranih virusa dok je u kultivarima 'Plavac mali sivi' i 'Malvazija istarska' uklonjena većina virusa.

Ključne riječi: Vinova loza, virusi, ozdravljivanje, RT-PCR

10. Summary

Bruno Pavletić

Virus detection in Croatian autochthonous cultivars of grapevine by RT-PCR before and after curing

Grapevine (*Vitis vinifera*) is a species of great agricultural importance. Viral infections of grapevine caused by many different viruses make major economic damage to vine industry worldwide. In this study, a method for detection of six most common grapevine viruses (GLRaV-1, 2 i 3, ArMV, GFkV i GFLV) in leaves induced from shoots of winter buds, using highly sensitive RT-PCR is described. This is the first study in which RT-PCR is used for detection of viruses on Croatian autochthonous grapevine cultivars 'Babica', 'Plavac mali sivi' and 'Malvazija istarska'. Analysis of viral presence in potentially cured plants as well as those of which material was used for curing, showed that newly developed, so far unpublished method for virus elimination from grapevine, has a potential for curing. The proof for that is the fact that two out of three plants of 'Babica' cultivars are fully cured of all analysed viruses while 'Plavac mali sivi' and 'Malvazija istarska' are cured from most of them.

Keywords: Grapevine, viruses, curing, RT-PCR

11. Životopis autora

Bruno Pavletić redoviti je student 1. godine diplomskog studija Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Rođen je 13. ožujka 1997. godine u Zagrebu. Nakon završenog gimnazijskog smjera Prirodoslovne škole Vladimira Preloga u Zagrebu 2015. godine upisao je studij Molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od prve godine studija redovito volontira u Laboratoriju za evolucijsku genetiku na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. rer. nat. Tomislava Domazeta-Loše gdje aktivno sudjeluje u istraživanjima i provedbi nekoliko projekata. Od kraja 2017. godine odrađuje stručnu praksu u Laboratoriju za kulturu biljnog tkiva PMF-a pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Dunje Leljak-Levanić. Od 2018. član je Europskog društva za istraživanje raka (EACR) i Hrvatskog društva za istraživanje raka (HDIR). Aktivno sudjeluje u organizaciji i provedbi manifestacije „Noć biologije“ Biološkog odsjeka PMF-a. Bio je članom BIUS Sekcije za kornjaše na PMF-u 2017. i 2018. godine, a početkom 2019. godine sa kolegicama na PMF-u osniva Grupu za astrobiologiju s ciljem širenja te grane istraživanja u Hrvatskoj. Od siječnja 2019. aktivno radi na projektu Fakulteta elektrotehnike i računarstva Sveučilišta u Zagrebu za lansiranje prvog hrvatskog satelita u Zemljinu orbitu - FERSAT. Kao gimnazijalac, 2013. godine osvojio je 2. nagradu na natjecanju „Ljepota kristalnih ploha“.