

Detekcija i djelomična molekularna karakterizacija H-virusa vinove loze iz autohtonih sorata vinove loze

Nikolić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:832319>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



DETEKCIJA I DJELOMIČNA MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA H-VIRUSA VINOVE LOZE IZ AUTOHTONIH SORATA VINOVE LOZE

DIPLOMSKI RAD

Kristina Nikolić

Zagreb, srpanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Fitomedicina

DETEKCIJA I DJELOMIČNA MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA H-VIRUSA VINOVE LOZE IZ AUTOHTONIH SORATA VINOVE LOZE

DIPLOMSKI RAD

Kristina Nikolić

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, srpanj, 2021.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Kristina Nikolić**, JMBAG 0178109180, rođena 12.01.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

DETEKCIJA I DJELOMIČNA MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA H-VIRUSA VINOVE LOZE IZ AUTOHTONIH SORATA VINOVE LOZE

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Kristine Nikolić**, JMBAG 0178109180, naslova

DETEKCIJA I DJELOMIČNA MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA H-VIRUSA VINOVE LOZE IZ AUTOHTONIH SORATA VINOVE LOZE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Darko Vončina mentor

2. prof. dr. sc. Edyta Đermić član

3. doc. dr. sc. Domagoj Stupić član

Neposredni voditelj: Martin Jagunić, mag. ing. agr.

Zahvala

Želim zahvaliti izv. prof. dr. sc. Darku Vončini na danoj prilici da svoje školovanje na Agronomskom fakultetu privedem kraju radom na ovom istraživanju i da kroz izradu rada steknem brojna korisna znanja kao i na pomoći u pisanju rada. Također se zahvaljujem Martinu Jaguniću, mag. ing. agr. bez čije pomoći i savjeta eksperimentalni dio rada i samo pisanje rada nikako ne bi bilo moguće. Zahvaljujem se i svim djelatnicima Zavoda za fitopatologiju na ljubaznosti i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada. Mojoj obitelji velika hvala na bezuvjetnoj podršci i ljubavi na svakom koraku u mom dosadašnjem školovanju, ali i u ostalim aspektima života. Hvala!

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. CILJ ISTRAŽIVANJA	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. ROD <i>VITIVIRUS</i>	2
2.1.1. Morfologija i organizacija genoma	3
2.1.2. Način prijenosa.....	4
2.1.3. Štetnost	5
2.1.4. Detekcija.....	6
2.1.5. H-virus vinove loze	7
2.2. NOVE TEHNIKE U OTKRIVANJU BILJNIH VIRUSA	8
3. MATERIJALI I METODE	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.2. METODE	11
3.2.1. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina	11
3.2.2. Detekcija korištenjem metode PCR u stvarnom vremenu (qPCR)	12
3.2.3. Detekcija korištenjem konvencionalne RT-PCR metode.....	13
3.2.4. Elektroforeza umnoženih fragmenata u agaroznom gelu.....	14
3.2.5. Sekvenciranje	14
3.2.6. Filogenija.....	16
4. REZULTATI	17
4.1. IZOLACIJA UKUPNIH NUKLEINSKIH KISELINA	17
4.2. DETEKCIJA KORIŠTENJEM METODE PCR U STVARNOM VREMENU (qPCR)	18
4.3. DETEKCIJA KORIŠTENJEM KONVENCIONALNE RT-PCR METODE	22
4.4. SEKVENCIRANJE	23
4.5. FILOGENIJA.....	29
5. RASPRAVA.....	32
6. ZAKLJUČAK.....	35
7. POPIS LITERATURE.....	36
ŽIVOTOPIS.....	41

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Kristine Nikolić**, naslova

DETEKCIJA I DJELOMIČNA MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA H-VIRUSA VINOVE LOZE IZ AUTOHTONIH SORATA VINOVE LOZE

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) poznata je kao kultura s najvećim brojem poznatih viroza, a samo manji broj virusa ima ekonomsku važnost te se oni povezuju s najvažnijim skupinama bolesti vinove loze, a jedna od njih je i naboranost drveta vinove loze. Kompleks naboranosti drveta vinove loze povezan je s vrstama roda *Vitivirus* u koje se ubraja i H-virus vinove loze (grapevine virus H, GVH). Istraživanje u kojem je testirano 113 trsova vinove loze, provedeno je na autohtonim sortama iz kolekcijskog nasada smještenog na vinogradarsko-vinarskom pokušalištu Jazbina. Detekcija virusa provedena je uporabom PCR metode u stvarnom vremenu te je potvrđena konvencionalnom RT-PCR metodom čiji su produkti vizualizirani nakon provedbe horizontalne gel elektroforeze. U ovom radu eksperimentalno je po prvi puta u Hrvatskoj dokazana prisutnost GVH u postotku zaraze od ~8% na sortama Gustopupica, Malvazija istarska, Muškatel, Babica plosnata, Brajdica bijela, Plavčina, Bljuzgavac, Svrđlovina crna i Kozak. Izolati su sekvencirani u oba smjera i to u dva područja genoma (RNA ovisna RNA polimeraza (RdRp) i protein omotača (CP)) te je njihova međusobna usporedba, kao i usporedba sa stranim izolatima, pokazala razlikovanja na nukleotidnoj i aminokiselinskoj razini. Unutar sekvenci hrvatskih izolata RdRp područja pronađena je sličnost između 95.5 do 99.15% na nukleotidnoj te 95.76 do 100% na aminokiselinskoj razini, dok je unutar CP područja sličnost varirala od 97.47 do 99.43% na nt i od 98.3 do 100% na ak razini. Filogenetskom analizom utvrđeno je grupiranje izolata prema geografskom podrijetlu samo kod sekvenci RdRp područja genoma.

Ključne riječi: vinova loza, H-virus vinove loze, GVH, PCR, sekvenciranje

Summary

Of the master's thesis – student **Kristina Nikolić**, entitled

DETECTION AND PARTIAL MOLECULAR CHARACTERIZATION OF GRAPEVINE VIRUS H FROM AUTOCHTHONOUS VINE VARIETIES

Grapevine (*Vitis* spp.) is known as the cultivated crop with the highest number of known viruses. Only a small number of them are of economic importance and they are associated with the most important groups of grapevine diseases, one of them is rugose wood complex. The rugose wood complex is associated with species of the genus *Vitivirus*, which also includes the grapevine virus H (GVH). The research, in which 113 grapevine plants were tested, was carried out on autochthonous varieties from a collection plantation located on the Jazbina viticultural-winemaking trial ground. Detection of the virus was performed by conducting real-time PCR method and subsequently confirmed by horizontal agarose gel electrophoresis of conventional RT-PCR amplified products. In this paper, the presence of GVH in the percentage of infection of ~8% was experimentally proven for the first time in Croatia in grapevine varieties Gustopupica, Malvazija istarska, Muškatel, Babica plosnata, Brajdica bijela, Plavčina, Bljuzgavac, Svrđlovina crna and Kozak variety. Two regions of the genome (RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and coat protein (CP)) of isolates were sequenced in both directions and by comparing them mutually and with foreign isolates, differences at the nucleotide and amino acid levels were shown. Sequences of 9 Croatian isolates of GVH in RdRp region showed a similarity between 95.5 and 99.15% at the nucleotide level and 95.76 to 100% at the amino acid level, while the sequence identity within the CP region ranged between 97.47 and 99.43% nt and 98.3 to 100% aa. Phylogenetic analysis revealed grouping of isolates by geographical origin only in the sequences of the RdRp region of the genome.

Keywords: grapevine, grapevine virus H, GVH, PCR, sequencing

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.), kao jedna od najuzgajanijih i gospodarski značajnih drvenastih kultura područja umjerene klime, izložena je napadu velikog broja patogena među kojima se virusi izdvajaju kao jedni od važnijih (Martelli 2014a). Jedan od glavnih uzroka široke rasprostranjenosti virusa vinove loze je međunarodna razmjena i prometovanje zaraženim sadnim materijalom pri čemu se virusi prenose iz zaražene podloge u plemku ili obrnuto, a poseban problem predstavlja činjenica da se jednom zaražen trs ne može nikada izliječiti (Šubić i Cvjetković 1996.). Do danas je poznato da vinovu lozu napada 86 vrsta virusa koji su povezani s važnim skupinama bolesti vinove loze poput infektivne degeneracije, uvijenosti lista vinove loze i naboranosti drveta vinove loze, a za neke od tih virusa dokazan je prijenos vektorima iz porodica *Pseudococcidae*, *Coccidae*, *Aphididae*, *Longidoridae* (Fuchs 2020.). Simptomi ekonomski značajnih virusnih oboljenja variraju od diskoloracija listova, pojava pjega, kloroza i nekroza, kovrčanja listova, pa sve do naboranosti i jamičavosti drveta te zadebljanja na mjestu cijepjenja te na ovaj način značajno utječu na razvoj biljke izazivajući kasnije sazrijevanje, povećan sadržaj kiselina u grožđu i smanjenje prinosa (Meng i sur. 2017.). Poznato je da niti jedna druga kultura nema veći broj intracelularnih patogena (Martelli 2014.a), stoga zaštita vinove loze predstavlja vrlo kompleksan zadatak u kojem detekcija virusa igra važnu ulogu. Velik napredak i novu perspektivu u detekciji virusa donjela je metoda sekvenciranja nove generacije (eng. *next generation sequencing*, NGS) ili sekvenciranje visoke propusnosti (eng. *high throughput sequencing*) koja je omogućila identifikaciju novih virusa, ali i uvid u njihovu bioraznolikost, ekologiju i odnos s domaćinom (Saldarelli i sur. 2017.). U posljednjih nekoliko godina, primjenom ranije spomenute tehnike sekvenciranja visoke propusnosti, otkriven je velik broj novih virusa, a neki od njih su virus Pinot-a sivog (grapevine Pinot gris virus, GPGV) (Giampetruzzi i sur. 2012.), virus povezan s promjenom boje lišća sorte Roditis (grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus, GRLDaV) (Maliogka i sur. 2015.), badnavirus vinove loze 1 (grapevine badnavirus 1, GBV-1) (Vončina i Almeida 2018.), G-virus vinove loze (grapevine virus G, GVG) (Blouin i sur. 2018.), a među njima je i H-virus vinove loze (grapevine virus H, GVH) otkriven 2018. godine u Portugalu na vinovoj lozi nepoznate sorte (Candresse i dr 2018.).

1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je istražiti pojavnost H-virusa vinove loze u kolekcijskom nasadu autohtonih sorata vinove loze koji se nalazi u sklopu vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina te napraviti njegovu djelomičnu molekularnu karakterizaciju sekvenciranjem dijela genoma. Ovo istraživanje ima dvije hipoteze:

1. U kolekcijskom nasadu autohtonih sorata vinove loze koji se nalazi u sklopu vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina prisutan je H-virus vinove loze.
2. Hrvatski izolati H-virusa vinove loze razlikuju se međusobno te u odnosu na druge (strane) izolate navedenog virusa na molekularnoj (nukleotidnoj i aminokiselinskoj) razini.

2. Pregled literature

2.1. Rod *Vitivirus*

Povijest virusa kao patogenih uzročnika bolesti na vinovoj lozi proteže se daleko u prošlost kroz koju su se prilagođavali promjenama i evoluirali zajedno s vinovom lozom kao domaćinom (Gibbs i sur. 2010, preme Minafra i sur., 2017.). Vinova loza jedna je od najstarijih uzgajanih kultura u svijetu te je izložena napadu velikog broja štetnika i uzročnika raznih bolesti (Diaz-Lara i sur. 2018.). S preko 80 vrsta virusa za koje je dosadašnjim istraživanjima utvrđeno da inficiraju vinovu lozu, od kojih manji broj ima ekonomsku važnost, smatra se da je vinova loza drvenasta kultura s najvećim brojem poznatih viroza (Mannini i Digiaro 2017.).

Nakon što je Hewitt 1954. u Kaliforniji opisao bolest koja je uzrokovala otvrdnjavanje kore drveta, što je nalikovalo virusnoj bolesti, 1961. godine Graniti i Ciccarone su po prvi puta zabilježili simptome naboranosti drveta vinove loze (*grapevine rugose wood*, RW) u južnoj Italiji (Martelli i Boudon-Padieu 2006.). Naboranost drveta vinove loze se nakon nalaza u Mađarskoj 1967. prestala smatrati samo lokalnim problemom te je danas poznato da se pojavljuje u cijelom svijetu (Martelli 2014a). Nakon tih otkrića, sve više dokaza je povezivalo kompleks naboranosti drveta s virusima koji su danas poznati kao pripadnici roda *Vitivirus* (Meng i sur. 2017.).

Rod *Vitivirus* pripada porodici *Betaflexiviridae* (potporodica *Trivirinae*) koja je svrstana u red *Tymovirales*, a nazvan je prema rodu *Vitis*, domaćinu svog glavnog predstavnika - A-virusa vinove loze (*Grapevine virus A*, GVA) (Blouin i sur. 2018.). Nakon što je u Italiji 1980. prvi puta zabilježen GVA te 1993. B-virus vinove loze (*Grapevine virus B*, GVB), u sljedećih nekoliko godina pronađen je veći broj današnjih predstavnika roda *Vitivirus*, a 2018. godine su zabilježena čak četiri nova virusa iz istog roda (Maree i sur. 2020.). Radi genetskih i morfoloških sličnosti viriona kao i nekih drugih karakteristika, rod *Vitivirus* je nekoć pripadao porodici *Flexiviridae* (du Preez i sur. 2011.). Porodica *Flexiviridae* kasnije je podijeljena na dvije nove porodice, *Alphaflexiviridae* i *Betaflexiviridae* (King i sur. 2012., preme Meng i Rowhani, 2017.). Prema zadnjem izvješću Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV, 2020.), osim roda *Vitivirus*, u porodicu *Betaflexiviridae* svrstano je još 9 drugih rodova, uključujući i rod *Trichovirus*. GVA, GVB i D-virus vinove loze (*Grapevine virus D*, GVD) najprije su okarakterizirani kao čestice slične virusima roda *Closterovirus* i pripadali su rodu *Trichovirus*, no kasnije je sekvenciranje njihovog čitavog genoma pokazalo različitosti s ostalim pripadnicima roda, te su 1997. godine svrstani u novi rod, *Vitivirus* (Maree i sur. 2020.). Trenutno rod *Vitivirus* službeno obuhvaća 15 vrsta, a njih 9 su virusi vinove loze. Osim GVA, GVB i GVD-a, vinova loza domaćin je i E-virusu vinove loze (*Grapevine virus E*, GVE), F-virusu vinove loze (*Grapevine virus F*, GVF), G-virusu vinove loze (*Grapevine virus G*, GVG), H-virusu vinove loze (*Grapevine virus H*, GVH), I-virusu vinove loze (*Grapevine virus I*, GVI) te J-virusu vinove loze (*Grapevine virus J*, GVJ) (ICTV, 2020; MSL #36). Od 2019. predloženi su i novootkriveni L-virus vinove loze (*Grapevine virus L*, GVL) i M-virus vinove loze (*Grapevine virus M*, GVM) kao pripadnici roda *Vitivirus* (Diaz-Lara i sur. 2020.).

Du Preez i sur. (2011.) navode kako etiološka uloga *Vitivirus* vrsta nije sasvim jasna, premda je poznato da su povezani s nekoliko važnih bolesti vinove loze. Sve učestalija uporaba novih metoda detekcije patogenih organizama rezultira čestim izvještajima o novim oboljenjima vinove loze koja su tek otkrivena ili tek prvi puta zabilježena na određenom području. Neka od tih oboljenja izazivaju od prije poznati virusi, dok su neki tek otkriveni, što je sve češći slučaj zadnjih godina (Golino 2003.).

2.1.1. Morfologija i organizacija genoma

Za viruse roda *Vitivirus* karakteristična je fleksibilna i nitasta građa čestica dimenzija od 725-785 nm x 12 nm (Slika 2.1.1.1.). Virusna čestica nije omotana lipidnim dvoslojem, a kapsida virusa je poprečno prugasta, nalik užetu (du Preez i sur. 2011.). Genom virusa građen je od jednolančane, pozitivno orijentirane molekule RNA čija relativna molekulska masa iznosi od $2.6-3.05 \times 10^6$ i time čini 5% ukupne težine čestice virusa (King i sur. 2012.). Veličina podjedinica proteina omotača je jednaka i relativne molekulske mase od 22-28 kDa (Martelli 2014a). Pošto je čestica virusa „gola“, odnosno ne posjeduje lipidni omotač, svi predstavnici roda *Vitivirus* imaju umjerenu otpornost na visoke temperature tako da do inaktivacije dolazi kod 60 °C, a posjeduju i umjerenu otpornost na organska otapala (King i sur. 2012.). Genom svih virusa sastoji se od 7400 do 7600 nukleotida (Blouin i sur. 2018.), a za razliku od predstavnika roda *Trichovirus*, ima karakterističnih pet otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frame*, ORF). ORF 1 (194 kDa) kodira za poliprotein potreban za replikaciju, ORF 3 (31 kDa) kodira za protein odgovoran za kretanje virusa, dok za protein omotača kodira ORF 4 (21.5 kDa) (Hull 2002.). Za produkt od 10 kDa za koji kodira ORF 5, smatra se da ima ulogu RNA-vezivnog proteina, dok za sada još nije poznata funkcija produkta za koji kodira ORF 2 (19 kDa) (Galiakparov i sur. 2002.).



Slika 2.1.1.1. Prikaz građe virusa iz roda *Vitivirus*

Izvor: ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics
<https://viralzone.expasy.org/270> - pristup 24.07.2021.

2.1.2. Način prijenosa

Za *Vitivirus* vrste je poznato da se prenose mehanički, a u zaraženim biljkama vinove loze nalaze se u floemu (Martelli 2014a). Pretpostavlja se da je bolest naboranosti drveta vinove loze koju se povezuje s *Vitivirus* vrstama, potekla iz područja "Starog svijeta", odnosno kontinenata poznatih prije otkrića Amerike te da se proširila po cijelom svijetu trgovinom i sadnjom zaraženog materijala. Tako se trgovina i transport zaraženog materijala smatra najvažnijim načinom širenja virusa ovog roda, a time i kompleksa naboranosti drveta (Martelli i Boudin-Padieu 2006.). Osim prijenosa zaraženim sadnim materijalom, prenose se i kukcima. Nekoliko rodova kukaca prenose GVA, GVB i GVE na semiperzistentan način, to su rodovi: *Pseudococcus*, *Planococcus*, *Heliococcus*, *Neopulvinaria*, *Parthenolecanium*, a heracleum latent virus (HLV) i mint virus 2 (MV-2) kao druge predstavnike roda *Vitivirus* prenose lisne uši roda *Cavariella* i vrsta *Ovatus crataegarius* (du Preez i sur. 2011.; Maree i sur. 2020.). Vrijeme akvizicije i prijenosa GVA pomoću vrste *Pseudococcus longispinus* eksperimentalno su istraživali La Notte i sur. (1997.). Utvrdili su da je nakon hranjenja na test biljci *Nicotiana clevelandii*, period akvizicije trajao od 15 do 180 minuta, dok je period retencije trajao od 15 do 48 sati nakon čega je virus uspješno prenešen na zdrave biljke bez perioda latencije (Koch i sur. 2020). Moguću povezanost GVA i virusa uvijenosti lista vinove loze (*Grapevine leafroll-associated virus-1*, GLRaV-1) prilikom prijenosa vrstom *Parthenolecanium corni*, zabilježili su Hommay i sur. 2007. nakon uspješnog prijenosa na vinovu lozu (Vončina 2011.). Za sada je poznato da GVA prenose vrste *H. bohemicus*, *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus comstocki*, *P. longispinus*, *P. affinis*, *Parthenolecanium corni*, *Neopulvinaria innumerabilis* i *Phenacoccus aceris* (Engelbrecht i Kasdorf 1990; Garau i sur. 1995; Fortusini i sur. 1997; Goszczynski i Jooste 2003; Nakano i sur. 2003; Zorloni i sur. 2006; Hommay i sur. 2008; Le Maguet i sur. 2012., preme Meng i sur., 2017.). GVB ima manji broj vektora, odnosno pet vrsta: *Pl. ficus*, *Ps. longispinus*, *Ps. affinis*, *Phenacoccus aceris* te *Planococcus citri* (Martelli 2010; Velasco i sur. 2006.). Nakune i sur. su 2008. eksperimentalno dokazali prijenos GVE pomoću *P. comstocki*, koji je za sad jedini poznati vektor (Nakune i sur. 2008.), dok za GVD i GVF još uvijek nema poznatih vektora (Herrbach i sur. 2017.).

Uz vinovu lozu, do sada je poznato još njih šest, većinom drvenastih biljaka domaćina na kojima vrste roda *Vitivirus* vrše zarazu. Većinu domaćina i vektora dijele s virusima iz porodice *Closteroviridae*, koji se često pronalaze u zaraženim biljkama zajedno s *Vitivirus* vrstama (Maree 2020.). Postoji i nekoliko zeljastih biljaka koje se koriste za propagaciju i kao test biljke u eksperimentima: *Nicotiana benthamiana*, *N. occidentalis* te *Chenopodium* spp. (du Preez i sur. 2011.).

2.1.3. Štetnost

Dosad je velik broj istraživanja utvrdio postojanje povezanosti predstavnika roda *Vitivirus* s kompleksom naboranosti drveta vinove loze (*Rugose wood complex*, RW). Kompleks naboranosti drveta, koji podrazumijeva više bolesti/uzročnika, jedna je od najrasprostranjenijih skupina virusnih oboljenja vinove loze prenosivih cijepljenjem (Nakune 2008.). U skladu s tim, simptomi bolesti se očituju na europskoj vinovoj lozi koja je cijepljena na podlogu dok su na europskoj lozi uzgajanoj na vlastitom korijenu, američkim *Vitis* vrstama i na hibridnima simptomi latentni, odnosno nisu vidljivi (Martelli i Boudon-Padieu 2006.). Klimatske prilike te kombinacija podloge i plemke imaju utjecaj na jačinu simptoma (Martelli 2014a), a istovremena infekcija s više virusa izaziva veće štete (Rosa i sur. 2011.). Kod zaraženih biljaka vegetacija je odgođena odnosno kasni, dolazi do smanjenja vigora i pojave spužvastih zadebljanja na mjestu srastanja cijepova, a na centralnom cilindru drveta vidljive su jamice i brazde te biljka često ugiba nekoliko godina nakon sadnje (Vončina 2021.). Prema Martelliju (2014b), kompleks naboranosti drveta dijeli se na četiri bolesti koje se prepoznaju na indikatorima (*Vitis rupestris*, LN 33 i Kober 5BB). Plutavost kore (*Corky bark*) stvara udubine i brazde na drvetu *V. rupestris* i LN33 na kojoj se još pojavljuje uvijanje i crvenilo lišća te zadebljanje mladica na internodijima, dok u slučaju Kober 5BB nema simptoma. Izljebljenost drveta Kobera (Kober stem grooving) nazvana prema glavnom simptomu na drvetu podloge Kober 5BB, prepoznaje se po žljebovima, a dva spomenuta indikatora (*V. rupestris* i LN33) ne razvijaju simptome. Izljebljenost drveta hibrida LN33 (LN33 stem grooving) nema simptoma na *V. rupestris* i Kober 5BB, ali izaziva pojavu brazda na stabljici hibrida LN33 koje su nalik brazdama nastalim zarazom plutavosti kore na istom hibridu. Martelli (2014b) još navodi i naboranost drveta (*Rupestris stem pitting*), međutim ova bolest se ne povezuje s *Vitivirus* vrstama, već se uzročnikom smatra *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), a simptome razvija jedino *V. rupestris* u vidu nabora i udubina. Nakon detekcije GVE u vinogradima u Japanu koji su pokazivali simptome zaraze, ovaj predstavnik roda *Vitivirus* se također dovodi u vezu s kompleksom naboranosti drveta vinove loze (Nakaune i sur. 2008). Kod GVD je zapažen utjecaj na smanjen rast kod podloge Freedom nakon cijepljenja plemkama zaraženim s GVA i GVD (Rosa i sur. 2011.). GVA se također smatra uzročnikom bolesti Shiraza (*Shiraz disease*, SD) koja u Južnoj Africi izaziva velike probleme na sortama Shiraz i Merlot zbog slabog odrvenjavanja (Goszczynski i Habili 2011.). Kompleks naboranosti drveta u vinogradima može utjecati na smanjenje prinosa za 20 do 30%, dok je kod stolnih sorata poput Thompson seedless moguć gubitak do čak 93% (Mannini i Digiario 2017.). U Južnoj Africi i Italiji zabilježen je pad prinosa od 14 do 35% (Engelbrecht 1973; Garau i sur. 1984., preme Krake i sur., 1999.).

2.1.4. Detekcija

Indikatorske biljke poput vrste *V. rupestris* i hibrida Kober 5BB i LN33 koriste se u dokazivanju prisutnosti vitivirusa indeksiranjem, odnosno nacijepeljivanjem plemke kod koje se provjerava prisutnost virusa, na zdravu podlogu ili obrnuto (Garau i sur. 1989; Savino i sur. 1989; Castillo 1975.). Boscia i sur. (1993.) su koristili *Nicotiana occidentalis* i *N. cavicola* koje su mehanički inokulirane izolatima GVB iz više vinograda s područja južne Italije. Posljedično je ustvrđena pojava simptoma u vidu klorotičnih i nekrotičnih lezija te prosvijetljavanja žila i blažeg kovrčanja listova. Praćenje pojave simptoma najčešće nije najpouzdanija metoda detekcije virusa (Agrios 2005; Jones i sur. 2015., preme Jones, 2016.), s obzirom na već ranije spomenute primjere poput zaraze hibrida Kober 5BB s GVA pri čemu se simptomi vide u obliku pojave žljebova na drvetu podloge, a na LN33 i *Vitis rupestris* se ne primjećuju (Savino i sur. 1989.). Za detekciju GVA i GVB koristi se i imunosorbentna elektoronska mikroskopija (*Immunosorbent electron microscopy*, ISEM) (Credi i Giunchedi 1996; Buzkan i sur. 2001.), a metoda detekcije ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) uz korištenje poliklonskih i monoklonskih protutijela se uspješno koristi u detekciji GVA već duže vrijeme (Monette i James 1990.). Ranije spomenute zeljaste domaćine GVB (*N. cavicola* i *N. occidentalis*) potvrdili su i Vončina i sur. (2013.) uporabom dvostruke protutijelne sendvič indirektna ELISA uz direktno vezanje antigena, a također su i zapaženi novi simptomi u vidu uvijanja listova prema licu ili naličju, mjehuravosti lista i rozetastog rasta. Za bržu i osjetljiviju detekciju koristi se lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (eng. *reverse transcription PCR*, RT-PCR) pri čemu se koriste specifične početnice za virus koji se testira (Minafra i sur. 1992., preme Minafra i sur., 2017.), a postoje i drugačiji oblici iste metode poput IC-RT-PCR (eng. *immunocapture-reverse transcription-PCR*) koja se smatra 1000x osjetljivijom metodom u usporedbi s metodom ELISA (Martelli 2014a). Detekcija većine novijih *Vitivirus* vrsta većinom se oslanja na molekularne metode budući da su ELISA pribori trenutno komercijalno dostupni samo za GVA i GVB. Za novije viruse spomenutog roda poput GVE i GVF, trenutno je manjak načina detekcije i općenito podataka o tim virusima pa su Elbeaino i sur. (2019.) po prvi put uporabili novosintetizirane degenerirane početnice u RT-PCR analizi izolata GVB, GVD, GVE i GVF iz više zemalja Mediteranske regije. Diaz-Lara i sur. (2020.) su nedavno razvili univerzalni RT-PCR esej koji se može koristiti za detekciju svih do sad poznatih vrsta roda *Vitivirus* koje vrše infekciju vinove loze (A, B, D, E, F, G, H, I, J, L i M-virus vinove loze), a tako i potencijalnih novih vrsta istog roda. Nadalje, Osman i sur. (2008.) su eksperimentalno dokazali veću pouzdanost i osjetljivost TaqMan® RT-PCR metode u stvarnom vremenu i njene modificirane verzije, TaqMan® *Low-Density Arrays* metode (LDA, *Applied Biosystems*, USA), u usporedbi s prethodno spomenutom konvencionalnom RT-PCR metodom. U zadnjih nekoliko godina koriste se i novije metode detekcije virusa kao što je sekvenciranje visoke propusnosti (eng. *high-throughput sequencing*, HTS) (Diaz-Lara i sur. 2018.). Ova metoda se koristi za otkrivanje novih sekvenci genoma bez prethodnog poznavanja sekvence pri čemu je iznimno korisna i uspješna (Oliveira i sur. 2017.).

2.1.5. H-virus vinove loze

H-virus vinove loze (*Grapevine virus H*, GVH) sedmi je po redu virus otkriven na domaćinu vinovoj lozi, koji pripada rodu *Vitivirus* (ICTV, 2020; MSL #36). Virus je otkriven 2018. godine u Portugalu na nepoznatoj sorti vinove loze korištenjem Illumina tehnologije, odnosno sekvenciranjem visoke propusnosti (*high-throughput sequencing*, HTS) (Candresse i dr 2018.). GVH je ubrzo, već sljedeće godine detektiran i u istraživanju koje su proveli Diaz-Lara i sur. (2019.) kako bi se utvrdila prisutnost više novih vrsta virusa iz roda *Vitivirus* u vinogradima s nekoliko lokacija u Kaliforniji. Istraživanje je provedeno uporabom RT-PCR-a pri čemu su korištena dva različita seta početnica koje ciljaju na dva različita područja genoma (Diaz-Lara i sur. 2019.). Virus je zatim ponovno detektiran u Grčkoj u jesen 2020., u istraživanju prisutnosti virusa u komercijalnom vinogradu u kojem se uzgaja sorta Assyrtiko, uporabom sekvenciranja visoke propusnosti u NovaSeq6000 platformi Illumina inc. (Panailidou i sur. 2021.). Nakon prvog nalaza i sekvenciranja GVH provedenog u Portugalu, analizom kompletnog genoma utvrđena je karakteristična organizacija genoma s pet otvorenih okvira čitanja, prikazana na Slici 2.1.5.1., koju imaju i ostali pripadnici roda *Vitivirus* (Candresse i sur. 2018.). Istraživanje u Kaliforniji je pokazalo da je GVH često prisutan virus i jedini detektiran iz izolata iz NCGR-a (*National Clonal Germplasm Repository*), a zaključeno je i da je za lokalni prijenos virusa najvjerojatnije odgovoran za sada nepoznat vektor (Diaz-Lara i sur. 2019.). U sva tri dosadašnja istraživanja o GVH nije se utvrdila povezanost virusa s oboljenjem vinove loze s obzirom da je u Portugalu virus izoliran iz uzoraka s asimptomatskih trsova te je u kalifornijskom istraživanju donesen isti zaključak, dok je u Grčkoj virus detektiran u koinfekciji s 18 drugih virusa na trsovima koji su pokazivali simptome uvijenosti lista vinove loze (Candresse i sur. 2018; Diaz-Lara i sur. 2019; Panailidou i sur. 2021.).



Slika 2.1.5.1. Prikaz organizacije genoma H-virusa vinove loze

Izvor: Candresse i sur. (2018.)

2.2. Nove tehnike u otkrivanju biljnih virusa

Sekvenciranje visoke propusnosti, još poznato i kao sekvenciranje nove generacije (*high-throughput sequencing*, HTS), odvelo je detekciju patogena na novu razinu. Nakon što je Sanger 1977. razvio prvu generaciju sekvenciranja, kroz sljedećih 30 godina razvila se i druga generacija sekvenciranja koju se danas naziva sekvenciranjem visoke propusnosti, a u zadnjih 10 godina razvija se i treća generacija sekvenciranja (Ambardar i sur. 2016.). Osim što se pomoću ove metode detekcije mogu otkriti novi virusi, moguće je i dubinski analizirati specifične varijante virusa (du Preez i sur. 2011.). Sekvenciranje visoke propusnosti omogućava analizu velikog broja fragmenata nukleinskih kiselina istovremeno te analizu njihove povezanosti (Ambardar i sur. 2016.). Trenutno je sekvenciranje visoke propusnosti najučinkovitija metoda detekcije vitivirusa s obzirom da pri uporabi indikatora simptomi često nisu vidljivi, dok molekularne metode, poput RT-PCR, mogu biti neuspješne u detekciji virusnih varijanti u slučajevima razlikovanja u sekvencama na područjima važnima za vezanje početnica (Diaz-Lara i sur. 2020.). Na vinovoj lozi je prvi put upotrijebljena pri proučavanju etiologije bolesti sorte Shiraz (Al Rwahnih i sur. 2009, preme Zherdev i sur., 2018.), a danas se ovom metodom otkriva sve veći broj virusa te se smatra da je sekvenciranje visoke propusnosti budućnost detekcije virusa (du Preez i sur. 2011.).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

U ovom istraživanju korišten je biljni materijal iz kolekcijskog nasada autohtonih sorata vinove loze koji se nalazi u sklopu vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina. Uzorci rozgve sa trsova različitih autohtonih sorata prikupljeni su 2020. godine u razdoblju mirovanja vegetacije (Slika 3.1.1.). Svaki uzorak je označen analitičkim brojem te zapakiran i skladišten u hladnjaku na 4 °C do provođenja izolacije ukupnih nukleinskih kiselina. U istraživanju je obuhvaćeno 113 uzoraka uzetih s autohtonih sorata vinove loze čiji su nazivi zajedno s pripadajućim analitičkim brojevima, prikazani u Tablici 3.1.1.. Laboratorijski dio istraživanja proveden je na Zavodu za fitopatologiju (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, AFZ).



Slika 3.1.1. Trsovi autohtonih sorata na vinogradarsko-vinarskom pokušalištu Jazbina

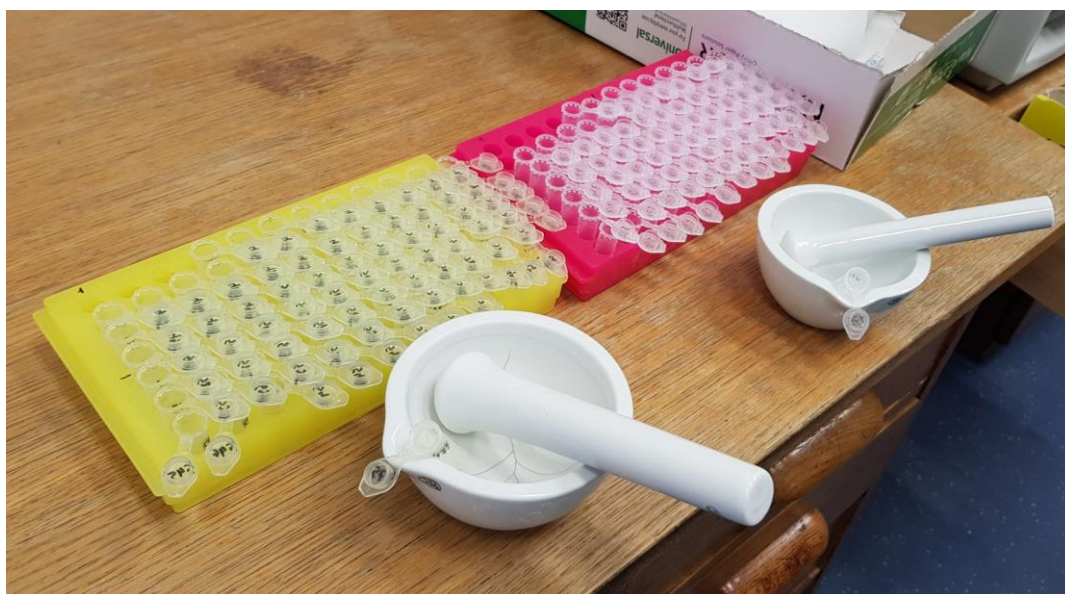
Tablica 3.1.1. Analitički brojevi uzoraka i imena autohtonih sorata (brojka predstavlja sadno mjesto) obuhvaćenih istraživanjem

Ana.br.	Naziv uzorka (sorta)	Ana br.	Naziv uzorka (sorta)	Ana br.	Naziv uzorka (sorta)
3196	Pošip crni 2	3234	Bak 4	3272	Topol 3
3197	Maraština 1	3235	Rudež 3	3273	Pršljivka 1
3198	Dugovrst 3	3236	Plavac mali crni 2	3274	Muškat ruža 2
3199	Babić 3	3237	Zlatarica blatska 3	3275	Frment 3
3200	Vranac 2	3238	Gustopupica 0031 3	3276	Vranac (15. red) 2
3201	Cibib 1	3239	Kujundžuša 2	3277	Teran 1
3202	Zlatarica vrgorska 3	3240	Prč 7	3278	Bijeli debejan 1
3203	Crljenak kaštelanski 130 2	3241	Ninska crvena 5	3279	Plavec žuti 5
3204	Crljenak kaštelanski 079 1	3242	Crljenak viški 1	3280	Pošip 3
3205	Ruža bijela II 4	3243	Malvazija dubrovačka bijela 2	3281	Primitivo 2
3206	Palaruša hvarska 5	3244	Šarica trišnjeвица 1	3282	Glavanjuša 7
3207	Dobričić 1	3245	Trojščina 1	3283	Brajdica bijela 1
3208	Grk 1	3246	Divjaka 1	3284	Petovka 5
3209	Drnekuša mala 5	3247	Malvazija istarska 6	3285	Gegić 2
3210	Zadarka 6	3248	Moslavac 2	3286	Drnekuša mala 2
3211	Ninčuša 3	3249	Siložder 6	3287	Oskorušica 1
3212	Kadarun 6	3250	Muškatel 1	3288	Kuč bijeli 1
3213	Lasina 1	3251	Bogdanuša 5	3289	Razaklija 6
3214	Dišeča ranina	3252	Cipar 1	3290	Crnka 3
3215	Plavac mali sivi II 4	3253	Garganja 4	3291	Lipovina 24 1
3216	Zinfandel 4	3254	Lun 3	3292	Plavčina 1
3217	Vlaški crljenak 4	3255	Krstičevica 1	3293	Rogoznička 4
3218	Medna 1	3256	Krivaja crvena 1	3294	Bratkovina crvena 3
3219	Žilavka 1	3257	Mijajuša 3	3295	Šljiva 4
3220	Žumić 2	3258	Mekuja 1	3296	Tanetova 4
3221	Muškat bijeli omiški 5	3259	Cetinka 2	3297	Bljuzgavac 2
3222	Pavicić 4	3260	Babica plosnata 2	3298	Debejan crni 5
3223	Palaruša viška 4	3261	Plavac mali sivi 6	3299	Kurtelaška 4
3224	Jarbola 1	3262	Ruža bijela I 1	3300	Bratkovina bijela 3
3225	Sušac 1	3263	Štajerka 6	3301	Svrđlovina 6
3226	Malvazija župska 1	3264	Marinkovića grozje 1	3302	Kozak 2
3227	Bilan bijeli 3	3265	Pribidrag 4	3303	Mladenka 4
3228	Beret 2	3266	Kadarka 3	3304	Šipelj 1
3229	Šemperinka 1	3267	Debit 5	3305	Svjetljak 1
3230	Gustopupica 5	3268	Palagružonka 1	3306	Glavinuša 1
3231	Lelekuš 2	3269	Žlahtina 5	3307	Babica 1
3232	Galac 3	3270	Stradunska 3	3308	Ljutun 4
3233	Stara brajda 1	3271	Silbijanac 1		

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina

Za izolaciju ukupne RNA, sa uzoraka rozgvi prikupljenih na pokušalištu Jazbina sastrugano je i odvagano 0.1 g biljnog materijala. Sastrugani biljni materijal svakog uzorka je nakon vaganja premješten u sterilni tarionik gdje je tučkom (Slika 3.2.1.1.) najprije usitnjen te je u njega dodana mjerica tekućeg dušika (ca 5 ml), nakon čega je materijal dodatno usitnjen tučkom do stvaranja finog praha kako bi se biljni materijal što bolje homogenizirao. Suspenzija biljnog praha i tekućeg dušika zatim je premještena u ohlađene Eppendorf mikroeprovete s odgovarajućom oznakom uzorka te je nakon isparavanja dušika u tubice dodano 1.8 ml GGB pufera (0,015 M Na_2CO_3 , 0.035 M NaHCO_3 , 0.0005 M PVP 40, 1 g/500 ml albumina goveđeg seruma, 0.25 g/500 ml Tween 20, podešen pH na 9.6 s octenom kiselinom) za ekstrakciju ukupne RNA. Mikroeprovete su zatim centrifugirane na 13,200 okretaja u minuti kroz 10 minuta, nakon čega je supernatant pipetiranjem premješten u nove mikroeprovete volumena 2 ml. Daljnja priprema uzoraka izvršena je u digestoru gdje je pomoću mikropipete po 8 μl svakog uzorka (supernatanta) dodano u 100 μl GES mastermiksa (0.1 M glicina, 0.05 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.5% Triton X, 1 % β -merkaptoetanol, podešen pH na 9.0 s NaOH) po mikroeproveti. Uslijedila je denaturacija uzoraka u termocycleru na 10 minuta na temperaturi od 95 °C. U slijedećem koraku, čistoća i kvaliteta izolirane RNA izmjerena je spektrofotometrijski (A260/A280 i A260/A230), pri čemu je korišten spektrofotometar NanoPhotometer P330 (Implen, München, Njemačka).



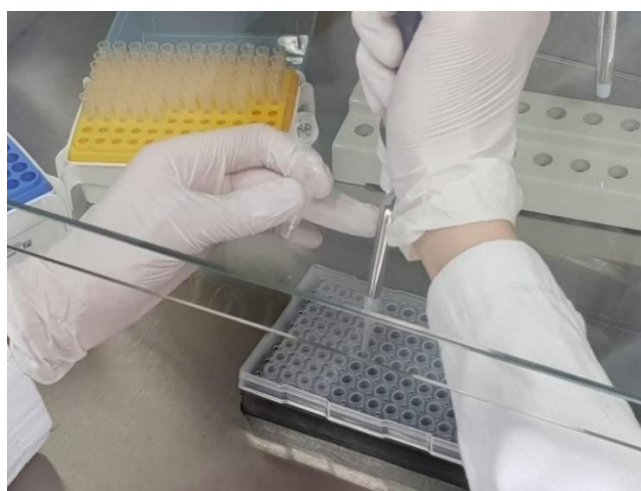
Slika 3.2.1.1. Označene epruvete i sterilno posuđe korišteno pri usitnjavanju biljnog materijala

3.2.2. Detekcija korištenjem metode PCR u stvarnom vremenu (qPCR)

U pripremi qPCR esaja korištene su početnice i probe navedene u tablici 3.2.2.1.. Umnožavano je područje enzima RNA ovisne RNA polimeraze (RdRp), a za internu kontrolu izolirane RNA korištena je 18S rRNA. Reakcijska smjesa za qPCR pripremljena je u volumenu od 20 μ l. Prema preporuci proizvođača, mastermiks je pripremljen dodavanjem i miješanjem 0.4 μ M početnica, 0.150 μ M probe, 5 μ l TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix enzima te 10.6 μ L ultračiste vode (UPW) u mikroepurveti za mastermiks. U mikrotitarsku pločicu za qPCR, pipetiranjem je ispušteno po 18 μ l pripremljene mastermiks smjese u svaku jažicu (Slika 3.2.2.1.) u koje je zatim dodano po 2 μ l uzorka s denaturiranom RNA. U sljedećem koraku, pripremljeni uzorci premješteni su u PCR uređaj Thermo Fisher Scientific 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) gdje su reakcijski uvjeti bili: početna denaturacija na 95 °C na 10 minuta, 40 ciklusa denaturacije na 94 °C po 15 sekundi, te produljivanje lanaca na 60 °C na 1 minutu.

Tablica 3.2.2.1. Početnice i sonde za GVH i 18 S rRNA

Meta	Početnica	Smjer	Ciljani dio genoma	Sekvenca početnice 5'-3'	Veličina produkta	Literatura
GVH	GVH-F1	Uzvodni	RdRp	-	136 pb	Al Rwahnih i Diaz-Lara (usmena komunikacija)
	GVH-R1	Nizvodni		-		
	GVH-F2	Uzvodni		-		
	GVH-R2	Nizvodni		-		
	GVH-P	Proba		-		
18 S rRNA	18S rRNA 449f	Uzvodni	18 S rRNA	GTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	70 pb	Osman i Rowhani (2006.)
	18S rRNA 498r	Nizvodni		CTGCCTTCCTTGGATGTGGTA		
	18S rRNA 475p	Proba		CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG		



Slika 3.2.2.1. Pipetiranje mastermiks smjese u mikrotitarsku pločicu za qPCR reakciju

3.2.3. Detekcija korištenjem konvencionalne RT-PCR metode

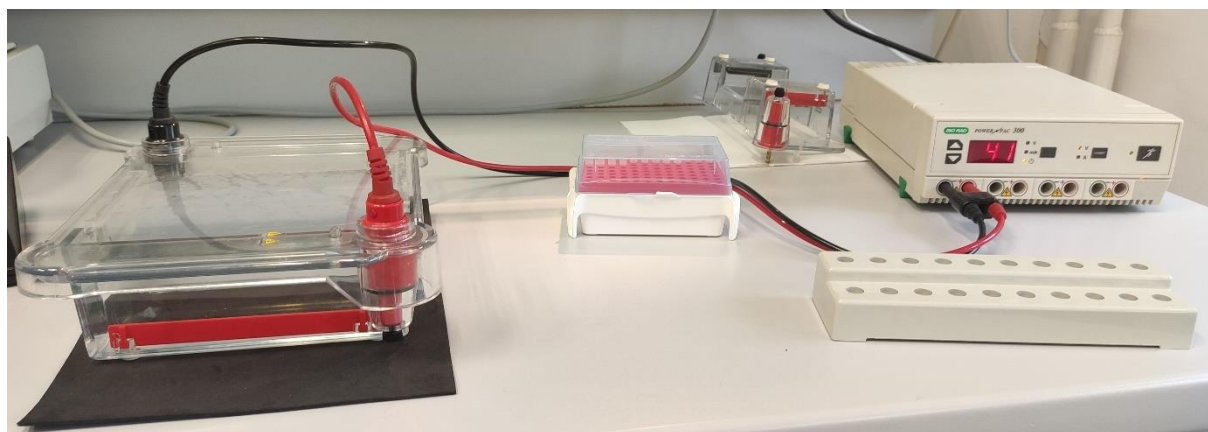
Konvencionalna RT-PCR metoda provedena je u svrhu potvrđivanja rezultata metode PCR u stvarnom vremenu te kao priprema uzoraka za sekvenciranje. Početnice korištene u pripremi RT-PCR esaja su GVH-RDRP-F1 i GVH-RDRP-R1 za umnožavanje gena RdRp enzima (eng. *RNA-dependent RNA polymerase*) te GVH-CP-F1 i GVH-CP-R1 za umnožavanje dijela genoma koji kodira za protein omotača (eng. *coat protein*, CP) (Tablica 3.2.3.1.). Reakcijska smjesa je pripremljena u volumenu od 10 µl te je u pripremi korišten OneStep RT-PCR pribor (Qiagen, Njemačka). Mastermiks je pripremljen od sljedećih sastavnica: 0.5 µM početnica, 2 µl 5X pufera, 0.4 µl smjese enzima, 0.4 µl dNTP smjese i 5.7 µl ultračiste vode. Mastermiks smjesa je pipetiranjem premještena u mikroepruvete i zatim je u svaku dodano po 2 µl denaturirane RNA. Reakcijski uvjeti su bili: reverzna transkripcija na 52 °C u trajanju od 30 min, početna aktivacija na 5 °C na 15 min; 35 ciklusa denaturacije na 94 °C na 30 sec, sparivanje početnica i kalupa na 55 °C u trajanju 45 s te sinteza komplementarnih lanaca na 72 °C u trajanju 1 min; dok je završna sinteza lanaca provedena na 72 °C u trajanju od 7 min (Diaz-Lara i sur. 2019.). Nakon provedene RT-PCR reakcije, rezultati su vizualizirani na 2%-tnom agaroznom gelu pripremljenom u 1 X TBE puferu i analiziranom u horizontalnoj gel elektroforezi s dodatkom GelRed fluorescentne boje za nukleinske kiseline (Olerup, Švedska).

Tablica 3.2.3.1. Početnice korištene u pripremi PCRcon esaja

Virus	Početnica	Sekvenca početnice 5'-3'	Područje genoma	Veličina produkta	Literatura
GVH	GVH-RDRP-F1	ACTTGCGCAATTCCTTCAAGTC	Replikaza (RdRp)	400 pb	Diaz-Lara i sur. (2019.)
	GVH-RDRP-R1	ACCTCAGGTTTGACATGTACCC			
	GVH-CP-F1	ATCTCGAAACCATCTTCGGGTA	Protein omotača (CP)	400 pb	
	GVH-CP-R1	TTCAGACCTTGATCACAGTCG			

3.2.4. Elektroforeza umnoženih fragmenata u agaroznom gelu

Za provjeru prisutnosti i veličine umnoženih RT-PCR produkata, provedena je elektroforeza u 2%-tnom agaroznom gelu. Za pripremu agaroznog gela, najprije je odvagano 2 g agara koji je pomiješan sa 100 ml 1X TBE pufera (40 mM Tris baze, 20 mM natrijeva acetata, 1 mM EDTA (pH 8,0)) te zagrijavanjem otopljen do potpune prozirnosti tekućine. U tako zagrijanu otopinu, dodana je kapljica GelRed boje (Olerup, Švedska) nakon čega je sadržaj premješten u kadicu. Nakon hlađenja agaroznog gela, po 5 μ l svakog RT-PCR produkta izmiješano je mikropipetom sa DNA vezivnom bojom (Takara, Japan) i ispušteno u jažice unutar gela. U prvu i zadnju jažicu agaroznog gela stavljen je DNA marker, odnosno ljestvica (Qiagen, Njemačka). Elektroforeza je provedena pomoću uređaja Power pac 300 (Bio-Rad, SAD) u trajanju od 60 minuta pri naponu od 70 V (Slika 3.2.4.1.), a potom je gel prenesen na UV-transiluminator 2000 (Bio-Rad, SAD) radi vizualizacije rezultata.



Slika 3.2.4.1. Prikaz elektroforeze na 2%-tnom agaroznom gelu u provedbi

3.2.5. Sekvenciranje

Nakon vizualizacije dobivenih RT-PCR produkata, provedena je još jedna RT-PCR reakcija na ranije navedeni način, ali u reakcijskom volumenu od 25 μ l s ciljem pripreme odabranih uzoraka za sekvenciranje. Uzorci su premješteni u mikroepruvete i osigurani parafilmom te poslani u MacroGen Europe B.V. (Amsterdam, Nizozemska) gdje je provedeno sekvenciranje u oba smjera. Rezultati dobiveni sekvenciranjem pregledani su i obrađeni u programu Bioedit 7.2. (Hall 1999.) te u Mega-X programu za obradu sekvenci (Kumar i sur. 2018.). Prilikom obrade sekvenci uklonjene su početnice s ciljem dobivanja sekvenci duljine od 356 nukleotida. Određene sekvence s razlikama u očitanim nukleotidima provjerene su pregledom kromatograma u programu Bioedit 7.2, nakon čega su sve sekvence međusobno poravnate (eng. *multiple alignment*) pomoću ClustalW alata za višestruko sravnjivanje u Mega-X programu. Potom su dobivene sekvence nukleotida uspoređivane međusobno i sa sekvencama drugih (stranih) izolata, dostupnih u GenBank bazi podataka (NCBI), koji su navedeni u Tablicama 3.2.5.1. i 3.2.5.2..

Tablica 3.2.5.1. Strani izolati korišteni za usporedbu sekvenci nukleotida dostupni u GenBank bazi podataka (uspoređivano područje RNA ovisne RNA polimeraze - RdRp)

Izolat	Podrijetlo	Kultivar	GenBank pristupni broj
GT5468	Njemačka	Gamay Toma	MK017760.1
GC5462	Rumunjska	Grassa de Cothari	MK017758.1
BA5076	Pakistan	Bargoon	MK017757.1
CA4881	USA	Canner	MK017753.1
TG4470	Turska	Turkish Grape	MK017752.1
TB6385	Francuska	Terret blanc	MK017750.1
SM5410	Srbija	Smederevka	MK017749.1
ME5390	Austrija	Mezes	MK017746.1
KO5386	Grčka	Kokinostaphylo	MK017744.1
PC4591	Italija	Perla di Csaba	MK017743.1
BH4436	Danska	Black Hamburg	MK017741.1
AV5541	Portugal	Alicante Vermelho	MK017736.1
PM4595	Južna Afrika	Precoce de Malingre	MK017735.1

Tablica 3.2.5.2. Strani izolati korišteni za usporedbu sekvenci nukleotida dostupni u GenBank bazi podataka (uspoređivano područje genoma koji kodira za protein omotača - CP)

Izolat	Podrijetlo	Kultivar	GenBank pristupni broj
TT2016-3	Portugal	-	NC_040545.1
GT5468	Njemačka	Gamay Toma	MK838928.1
GC5462	Rumunjska	Grassa de Cothari	MK838926.1
BA5076	Pakistan	Bargoon	MK838925.1
CA4881	USA	Canner	MK838921.1
TG4470	Turska	Turkish Grape	MK838920.1
TB6385	Francuska	Terret blanc	MK838918.1
SM5410	Srbija	Smederevka	MK838917.1
ME5390	Austrija	Mezes	MK838914.1
KO5386	Grčka	Kokinostaphylo	MK838912.1
PC4591	Italija	Perla di Csaba	MK838911.1
BH4436	Danska	Black Hamburg	MK838909.1
PM4595	Južna Afrika	Precoce de Malingre	MK838903.1

3.2.6. Filogenija

Filogenetska analiza obrađenih sekvenci dobivenih eksperimentalno te sekvenci stranih izolata, provedena je za oba proučavana područja genoma (RdRp i CP). U programu Mega-X najprije je odabran najoptimalniji evolucijski model prema Bayesian informacijskom kriteriju (eng. *Bayesian information criterion*, BIC), pri čemu je od ponuđenih modela odabran model s najnižom BIC ocjenom budući da najbolje opisuje obrazac izmjena u sekvencama nukleotida tijekom evolucijske prošlosti (Tablica 3.2.6.1.). Procjena filogenetskih odnosa je izvršena uporabom statističke metode najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*, ML) prema odabranom Kimura-2 supstitucijskom modelu uz G (gama) distribuciju. Za izračun ocjene pouzdanosti rekonstruiranog stabla korištena je statistička metoda samoučitavanja (eng. *bootstrap*) s 1000 ponavljanja kao podrška grananja unutar stabala izražena u postocima. Filogenetsko stablo odabrano je uporabom *Nearest-Neighbor-Interchange (NNI)* algoritma, a inicijalno stablo dobiveno je metodom susjednog sparivanja (eng. *neighbor joining method*, NJ).

Tablica 3.2.6.1. Korišteni evolucijski modeli s BIC ocjenama

Područje sekvence	BIC ocjena	Evolucijski model	Literatura
RdRp	2130.339	K2+G	Kimura 1980.
CP	1708.389	K2	

4. Rezultati

4.1. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina

Čistoća i kvaliteta RNA provjerena je spektrofotometrijski (A260/A230 i A260/A280) pomoću NanoPhotometra P330 (Implen, Njemačka). Koncentracije izolirane RNA i njihove vrijednosti pri A260/A280 te A260/A230 očitanjima prikazane su u Tablici 4.1.1..

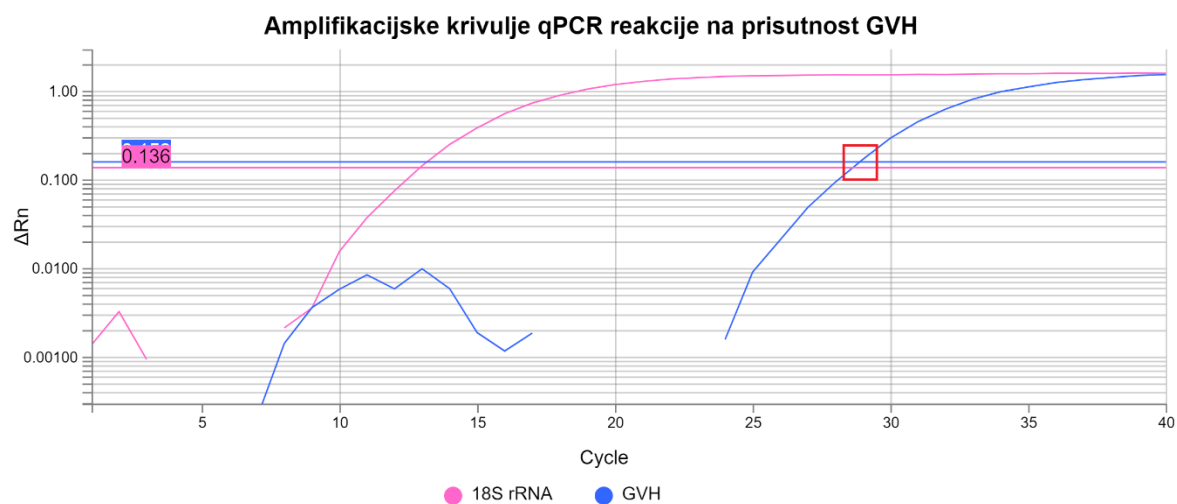
Tablica 4.1.1. Koncentracije izolirane RNA te vrijednosti očitavanja pri A260/280 i A260/A230

Ana. br.	KONC (ng/μl)	A260/ A280	A260/ A230	Ana. br.	KONC (ng/μl)	A260/A280	A260/ A230
3196	19,6	1,256	0,255	3253	7,6	1,727	0,333
3197	8	1,429	0,026	3254	10,8	1,688	0,245
3198	9,6	1,846	0,1	3255	17,2	0,956	0,467
3199	9,2	1,769	0,211	3256	4	1,429	0,132
3200	9,2	1,533	0,063	3257	9,2	1,769	0,112
3201	6,4	1,455	0,057	3258	10,4	1,733	0,114
3202	8,4	1,5	0,176	3259	13,6	1,619	0,442
3203	6,4	1,6	0,246	3260	7,6	1,727	0,244
3204	6,4	1,6	0,092	3261	11,6	1,611	0,199
3205	6,8	1,7	0,152	3262	7,6	1,583	0,302
3206	11,6	1,318	0,264	3263	8,4	1,615	0,149
3207	5,2	1,857	0,056	3264	8,8	1,833	0,173
3208	7,6	1,9	0,014	3265	7,6	1,727	0,339
3209	7,6	1,9	0,061	3266	8,8	1,571	0,333
3210	15,2	1,652	0,339	3267	5,2	1,444	0,228
3211	15,6	1,773	0,101	3268	10,8	1,688	0,213
3212	23,2	1,813	0,063	3269	8	1,818	0,116
3213	4,8	1,2	0,055	3270	8,4	1,5	0,253
3214	10,4	1,368	0,097	3271	8	1,667	0,29
3215	7,6	1,727	0,073	3272	12,4	1,722	0,383
3216	7,2	1,636	0,041	3273	10,4	1,04	0,351
3217	9,2	1,643	0,343	3274	8,4	1,615	0,171
3218	20,4	1,821	0,554	3275	15,2	1,652	0,373
3219	9,2	1,533	0,089	3276	8,4	1,75	0,154
3220	8	1,429	0,168	3277	8	1,818	0,339
3221	11,2	1,556	0,124	3278	17,2	1,87	0,219
3222	10,4	1,3	0,19	3279	10,4	1,733	0,317
3223	9,6	1,714	0,049	3280	18,4	1,586	0,343
3224	8	1,667	0,03	3281	8,4	1,909	0,25
3225	4,8	1,714	0,185	3282	18,8	1,88	0,435
3226	4	2	0,014	3283	16,4	1,864	0,554
3227	6	1,5	0,211	3284	13,2	1,737	0,407
3228	9,2	1,769	0,211	3285	8,4	1,5	0,259
3229	8,4	1,75	0,109	3286	11,2	1,647	0,326
3230	8	1,818	0,217	3287	10,4	1,529	0,248
3231	4,8	1,714	0,222	3288	10,4	1,529	0,342
3232	3,2	1,6	0,19	3289	12	1,667	0,345

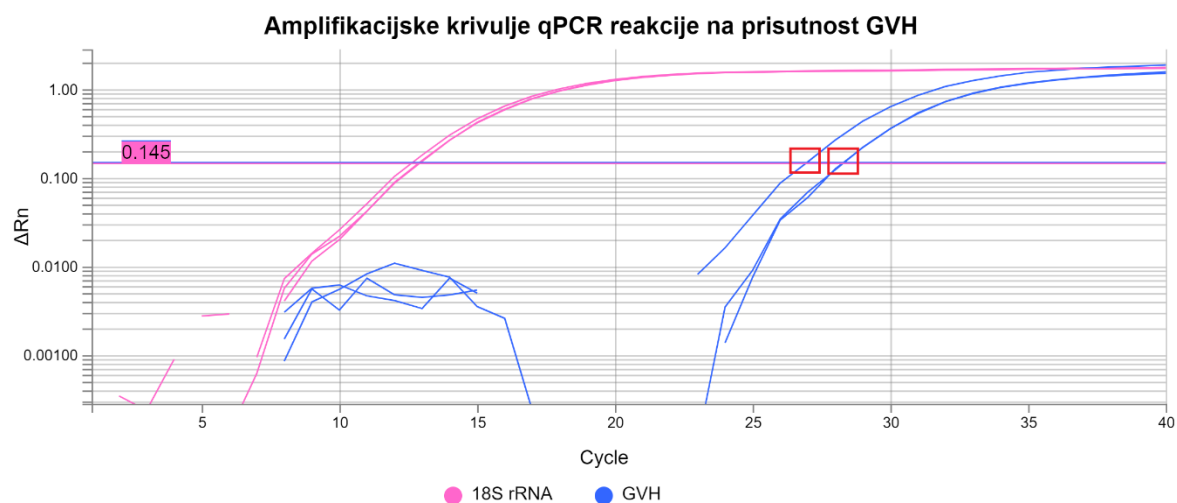
3233	5,2	1,857	0,277	3290	54,4	1,7	0,591
3234	12,4	1,476	0,352	3291	22,4	1,6	0,444
3235	7,2	1,8	0,138	3292	38	1,979	0,848
3236	13,2	1,737	0,303	3293	12,4	1,938	0,124
3237	12	1,579	0,278	3294	216	2,049	1,174
3238	8	1,667	0,263	3295	13,2	1,737	0,306
3239	6,8	1,7	0,093	3296	11,6	1	0,168
3240	5,6	1,556	0,09	3297	9,6	1,6	0,348
3241	4,4	1,833	0,039	3298	16,4	1,783	0,471
3242	10,8	1,688	0,329	3299	10	1,667	0,269
3243	11,6	1,318	0,218	3300	8,4	1,909	0,176
3244	10	1,471	0,266	3301	19,6	1,633	0,348
3245	10,8	1,588	0,321	3302	3,6	1,5	0,25
3246	4	1,667	0,312	3303	2,8	2,333	0,292
3247	7,6	1,9	0,029	3304	3,6	1,5	0,041
3248	6,4	1,6	0,13	3305	13,2	1,737	0,306
3249	6,8	1,417	0,254	3306	11,6	1	0,168
3250	6,4	1,231	0,172	3307	9,6	1,6	0,348
3251	5,2	1,857	0,106	3308	16,4	1,783	0,471
3252	6	1,5	0,211				

4.2. Detekcija korištenjem metode PCR u stvarnom vremenu (qPCR)

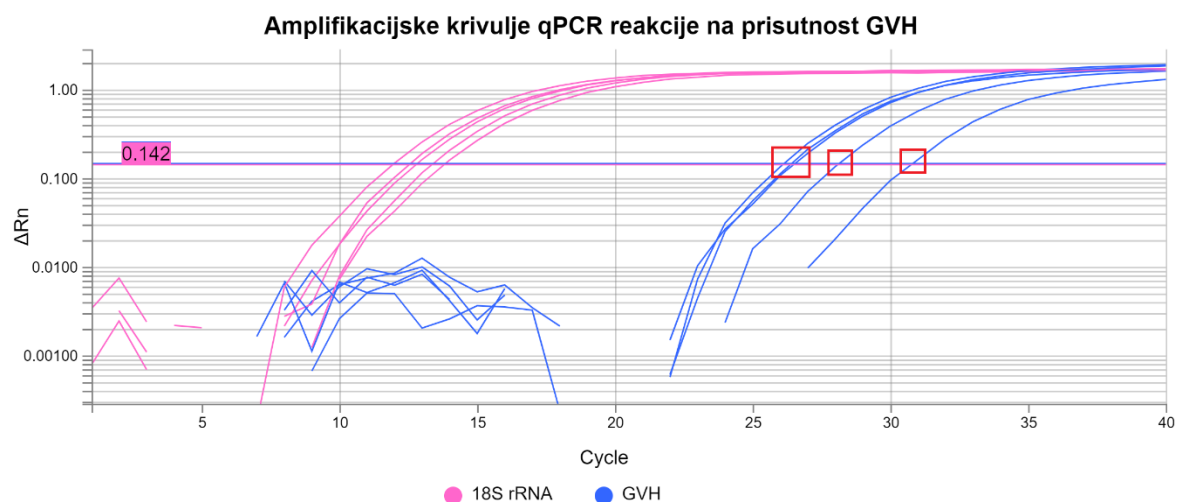
Rezultati testiranja provedenog metodom PCR u stvarnom vremenu na 113 uzoraka uzetih s trsova različitih autohtonih sorata, potvrdili su zarazu kod 9 trsova što predstavlja postotak zaraženosti od 7.96%. Prema redosljedu testiranja pozitivni uzorci su bili; uzorak analitičkog broja (ana. br.) 3238 - sorta Gustopupica, 3247 - sorta Malvazija istarska, 3250 - sorta Muškatel, 3260 - sorta Babica plosnata, 3283 - sorta Brajdica bijela, 3292 - sorta Plavčina, 3297 - sorta Bljuzgavac, 3301 - sorta Svrđlovina crna te uzorak 3302 - sorta Kozak. Na Slikama 4.2.1., 4.2.2. i 4.2.3. prikazane su amplifikacijske krivulje qPCR reakcije svih 9 uzoraka. U Tablici 4.2.1. vidljivi su analitički brojevi svih uzoraka te pripadajući nazivi uzoraka (sorte) i C_q vrijednosti dobivene testiranjem, a na Slici 4.2.4. prikazani su položaji trsova pozitivnih na H-virus vinove loze u vinogradarsko-vinarskom pokušalištu Jazbina.



Slika 4.2.1. Amplifikacijske krivulje qPCR reakcije. Plava krivulja - uzorak ana. br. 3238.; Crveni kvadrat - granični broj ciklusa (Cq vrijednost)



Slika 4.2.2. Amplifikacijske krivulje qPCR reakcije. Plave krivulje - uzorci ana. br. 3247, 3250 i 3260; Crveni kvadrat - granični broj ciklusa (Cq vrijednost)



Slika 4.2.3. Amplifikacijske krivulje qPCR reakcije. Plave krivulje - uzorci uzorci ana. br. 3283, 3292, 3297, 3301 i 3302; Crveni kvadrat - granični broj ciklusa (Cq vrijednost)

Tablica 4.2.1. Analitički brojevi uzoraka i imena sorti s pripadajućim Cq vrijednostima dobivenim metodom qPCR

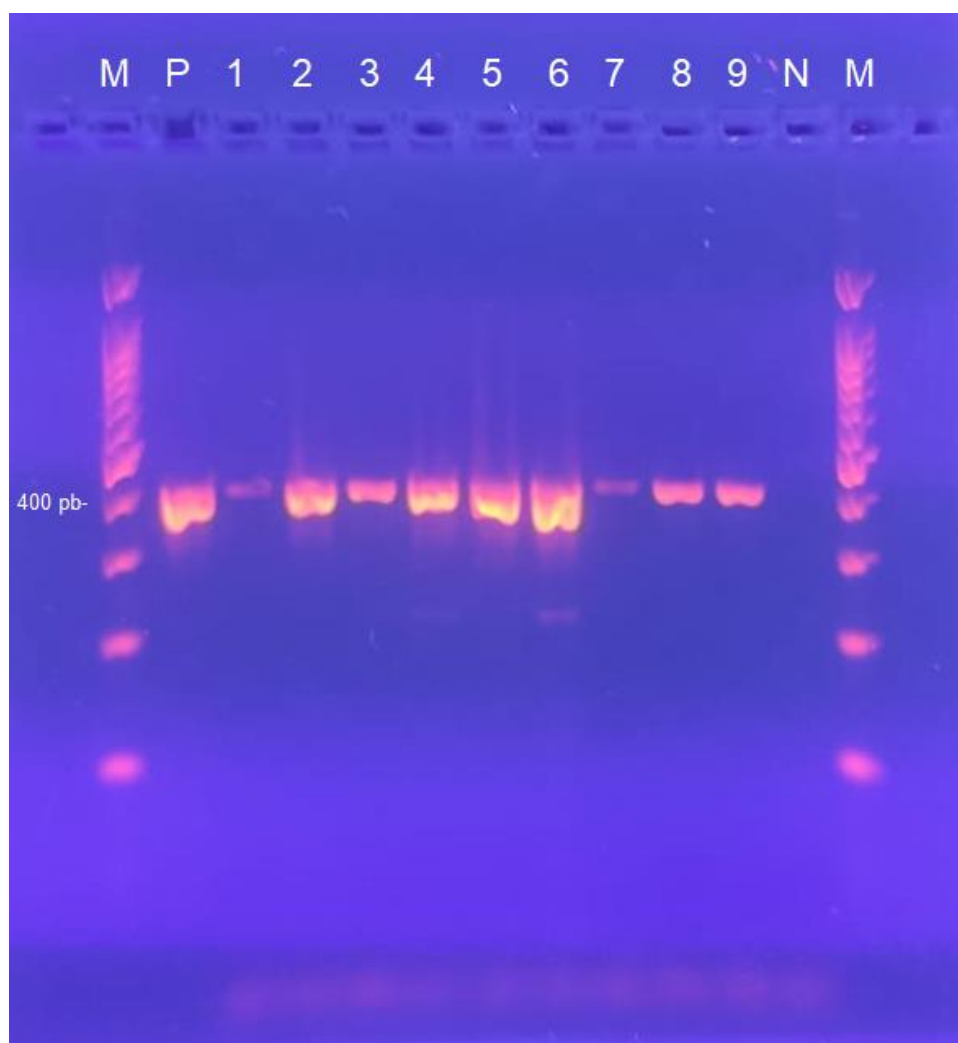
Ana. br.	Sorta	Položaj trsa	Cq
3238	Gustopupica	4-I	28.845
3247	Malvazija istarska	9-D	28.279
3250	Muškatel	3-I	28.247
3260	Babica plosnata	9-L	26.939
3283	Brajdica bijela	2-J	26.382
3292	Plavčina	10-B	26.086
3297	Bljuzgavac	27-B	30.775
3301	Svrdlovina crna	27-A	26.516
3302	Kozak	33-A	28.108



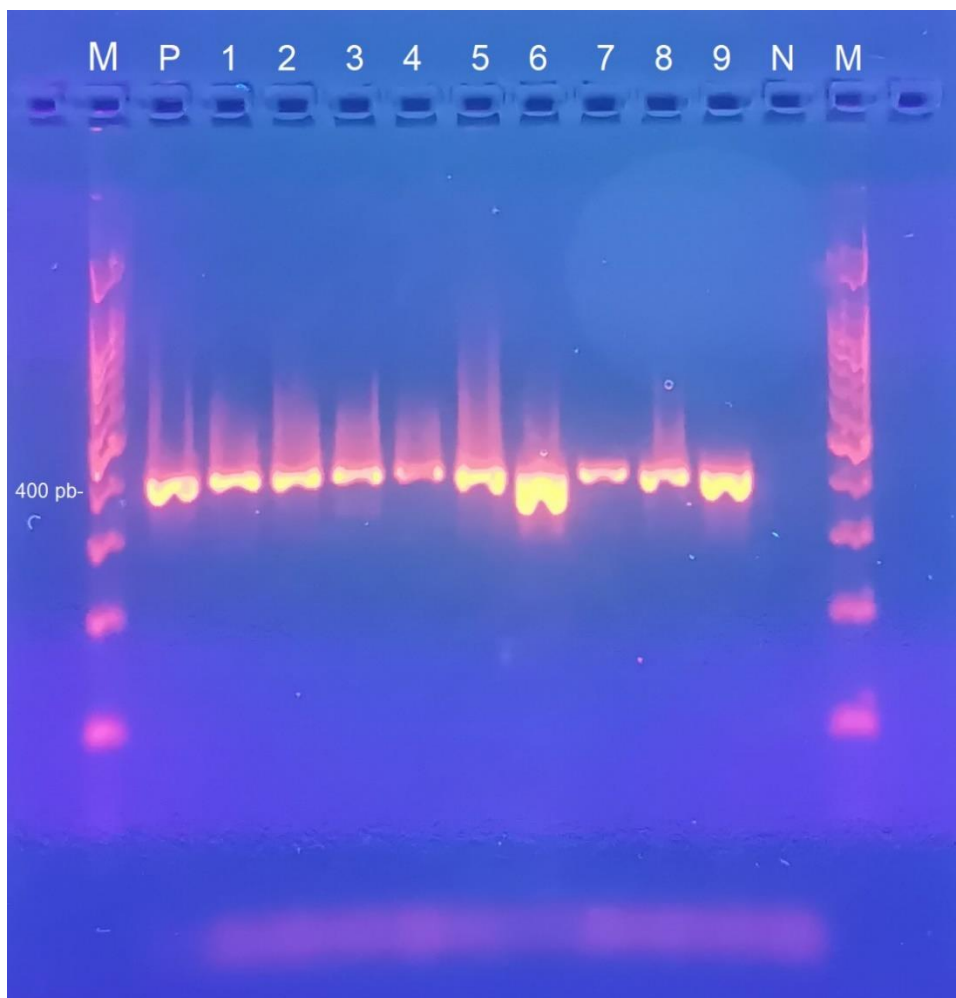
Slika 4.2.4. Položaji trsova pozitivnih na H-virus vinove loze u vinogradarsko-vinarskom pokušalištu Jazbina. Žuta oznaka - trs pozitivan na GVH; Crvena slova i brojevi - oznake položaja.

4.3. Detekcija korištenjem konvencionalne RT-PCR metode

Konvencionalnom RT-PCR metodom testirano je svih 9 pozitivnih uzoraka dobivenih metodom qPCR s ciljem potvrđivanja rezultata metode PCR u stvarnom vremenu te kao priprema uzoraka za sekvenciranje. Umnožavana su dva područja gena (RdRp i CP). Kod svih 9 uzoraka dobiveni su fragmenti očekivanih duljina od 400 parova baza. Prikazi izolata analitičkih brojeva 3238 (sorta Gustopupica), 3247 (Malvazija istarska), 3250 (Muškatel), 3260 (Babica plosnata), 3283 (Brajdica bijela), 3292 (Plavčina), 3297 (Bljuzgavac), 3301 (Svrdlovina crna) i 3302 (Kozak) koji su vizualizirani na UV-transiluminatoru nakon provedbe horizontalne gel elektroforeze na 2%-tnom agaroznom gelu, vidljivi su na Slikama 4.3.1. i 4.3.2..



Slika 4.3.1. Rezultati testiranja metodom RT-PCR na prisutnost H-virusa vinove loze. Produkti su dobiveni korištenjem GVH-RDRP-F1 i GVH-RDRP-R1 početnica i RNA izolirane iz različitih autohtonih sorata vinove loze. Prikazani fragmenti odgovaraju duljini od 400 parova baza. Oznake od 1-9 predstavljaju uzorke ana. br. po redu 3238, 3247, 3250, 3260, 3283, 3292, 3297, 3301 i 3302. Oznaka P – pozitivna kontrola; N – negativna kontrola; M – standard za određivanje molekularne mase (DNA marker).



Slika 4.3.2. Rezultati testiranja metodom RT-PCR na prisutnost H-virusa vinove loze. Korištene su početnice GVH-CP-F1 i GVH-CP-R1 i RNA izolirana iz uzoraka različitih autohtonih sorti vinove loze. Dobiveni fragmenti odgovaraju duljini od 400 parova baza. Oznake od 1-9 predstavljaju uzorke ana. br. po redu 3238, 3247, 3250, 3260, 3283, 3292, 3297, 3301 i 3302. Oznaka P – pozitivna kontrola; N – negativna kontrola; M – standard za određivanje molekularne mase (DNA marker).

4.4. Sekvenciranje

Nakon što su dobivene sekvence međusobno poravnate (eng. *multiple alignment*) pomoću ClustalW alata u MEGA-X programu, utvrđen je broj očuvanih (eng. *conserved sites*), varijabilnih (eng. *variable sites*) te parsimonijski informativnih mjesta (eng. *parsimony informative sites*). Unutar slijeda od 356 nukleotida 9 sekvenci hrvatskih izolata GVH RdRp područja utvrđeno je 331 konzervirano mjesto, 25 varijabilnih mjesta te 9 parsimonijski informativnih mjesta te se utvrđena međusobna sličnost sekvenci kretala između 95.5 i 99.15%. Usporedbom hrvatskih sekvenci sa stranima uz pomoć *on-line* programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sur. 1990.), kod svih sekvenci hrvatskih izolata utvrđena je najveća sličnost od 96.63% do 99.15% sa stranim izolatom BD5154 iz SAD-a (GenBank: MK017733.1). Kod sekvenci CP područja uočena je manja raznolikost nukleotidnog slijeda s obzirom da je nađeno 339 očuvanih, 17 varijabilnih i 5 parsimonijski

informativnih mjesta od 356 nukleotida te je sličnost sekvenci varirala od 97.47 do 99.43%, dok je sa stranim izolatom GT5468 iz Njemačke (GenBank: MK838928.1) pronađena najveća sličnost od 98.88 do 99.72% kod 5/9 sekvenci hrvatskih izolata. Na Slikama 4.4.1. i 4.4.3., prikazan je čitav slijed nukleotidnih sekvenci oba istraživana područja genoma za svih 9 GVH izolata.

Sekvence 9 hrvatskih izolata GVH dobivene ovim istraživanjem, također su višestruko poravnate i sa sekvencama 13 stranih izolata iz GenBank baze podataka te prepisane u aminokiselinske slijedove, nakon čega su utvrđena razlikovanja na aminokiselinskoj razini (Slike 4.4.2. i 4.4.4.). U RdRp regiji hrvatskih i stranih sekvenci utvrđeno je 12 varijabilnih mjesta unutar slijeda od 118 aminokiselina, a 8 područja je parsimonijski informativno. Unutar 9 hrvatskih sekvenci aminokiselina utvrđena sličnost je iznosila između 95.76 i 100%, a najveća sličnost kod 5/9 hrvatskih sekvenci, sa stranim izolatom MM6674 iz SAD-a (GenBank: QBF44475.1), kretala se od 97.46 do 99.15%. Nadalje, kod aminokiselinskog slijeda CP područja hrvatskih i stranih sekvenci pronađeno je 2 varijabilna i samo jedno parsimonijski informativno mjesto te se utvrđena sličnost 9 hrvatskih sekvenci aminokiselina kretala između 98.3 i 100%, pri čemu je najveća sličnost utvrđena kod 6/9 sekvenci hrvatskih izolata sa stranim izolatom BD5154 iz SAD-a (GenBank: QDZ36440.1) u iznosu od 99.15 do 100%.

[illegible]

Slika 4.4.1. Potpuni prikaz višestruko poravnatih slijedova nukleotida RdRp područja genoma 9 hrvatskih GVH izolata (duljina od 356 nukleotida). Iznad područja identičnosti nalazi se oznaka *.

[illegible]

Slika 4.4.2. Potpuni prikaz aminokiselinskih slijedova RdRp područja genoma 9 hrvatskih i 13 stranih GVH izolata (duljina od 118 aminokiselina). Iznad područja identičnosti nalazi se oznaka *.

[illegible]

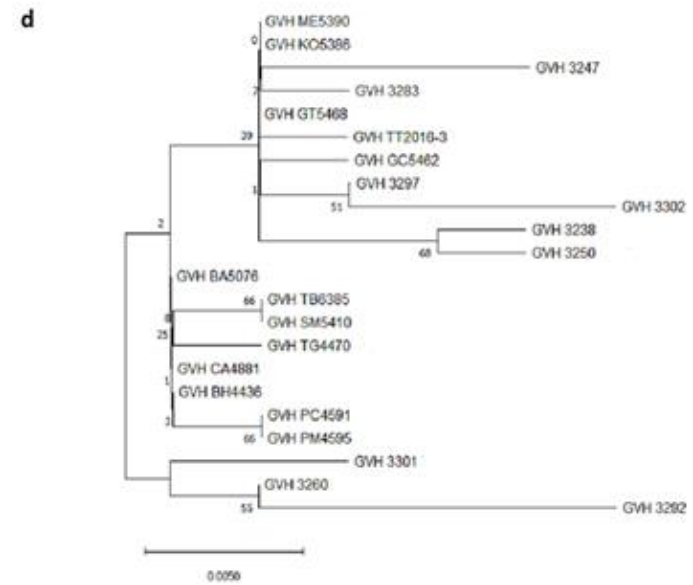
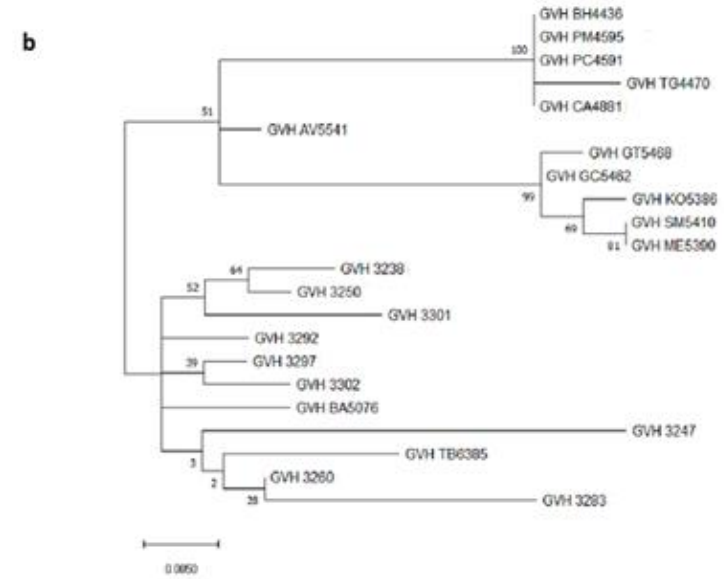
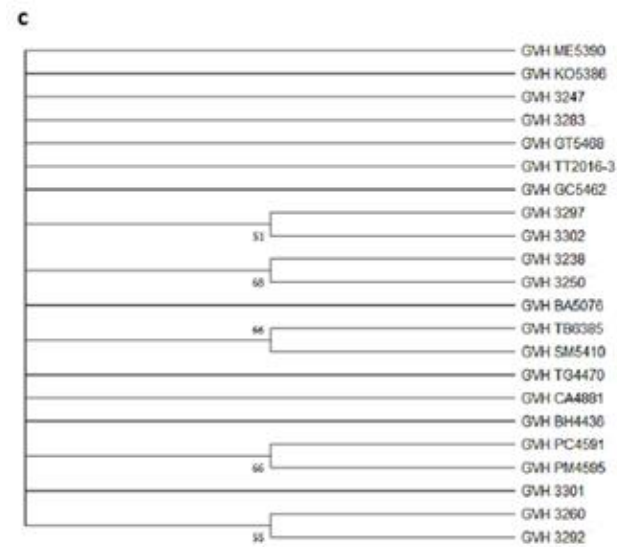
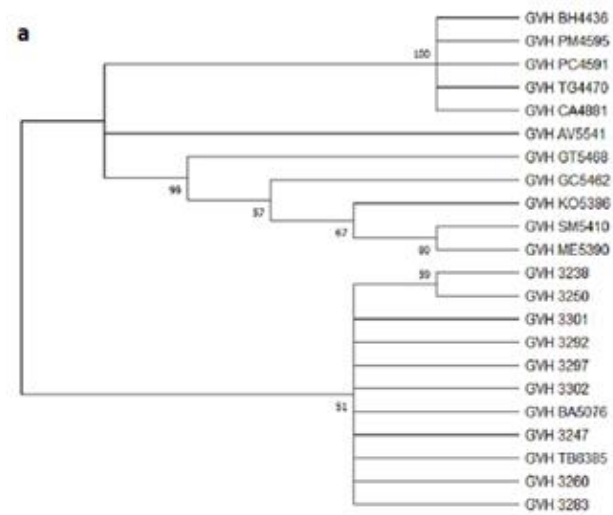
Slika 4.4.3. Potpuni prikaz višestruko poravnatih slijedova nukleotida CP područja genoma 9 hrvatskih GVH izolata (duljina od 356 nukleotida). Iznad područja identičnosti nalazi se oznaka *.

4.5. Filogenija

Filogenetskom analizom pri kojoj je korištena statistička metoda najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*, ML), kojom je istraživana varijabilnost unutar sekvenici 9 GVH izolata i 13 stranih izolata, dobivena su dva neukorijenjena stabla; jedno za područje gena replikaze i drugo za područje gena proteina omotača. Grane stabala s niskom statističkom podrškom (<50%) su uklonjene te su u rezultatima prikazana kondenzirana stabla.

Stablo koje je rekonstruirano iz sekvenci područja gena replikaze, rezultiralo je prikazom dvije glavne grane. Unutar prve grane, 5 stranih izolata grupiralo se u istu skupinu, a čvor koji predstavlja najbližeg hipotetskog zajedničkog pretka, pokazao je vrijednost statističke podrške (eng. *bootstrap*) od 100%, dok je unutar iste grane vidljiva monofiletska grupa s nekoliko ogranaka s različitim vrijednostima podrške. Svih 9 GVH izolata uključujući i dva strana izolata (BA5076 i TB6385), grupirali su se na drugoj grani kod koje je prikazana vrijednost statističke podrške od samo 51%.

Izolati u stablu rekonstruiranom iz sekvenci područja gena proteina omotača nisu se grupirali u skupine sa značajnijim postotkom statističke podrške. Rezultati filogenetskih analiza prikazani su na slici 4.6.1..



Slika 4.6.1. Filogenetska stabla rekonstruirana metodom najveće vjerojatnosti (ML) korištenjem sekvenci 9 GVH izolata dobivenih u ovom istraživanju i sekvenci 13 stranih izolata iz GenBank baze podataka. A) područje gena replikaze (RdRp) – kondenzirano stablo; B) područje gena replikaze (RdRp) – nekondenzirano stablo; C) područje gena proteina omotača (CP) – kondenzirano stablo; D) područje gena proteina omotača (CP) - nekondenzirano stablo; Evolucijska vremenska skala predstavlja dužinu grana - 0.0050

5. Rasprava

Ovim istraživanjem prvi put je potvrđena prisutnost H-virusa vinove loze u autohtonim sortama vinove loze na području Hrvatske. GVH je detektiran metodom PCR u stvarnom vremenu (qPCR) uporabom specifičnog seta početnica kojeg su razvili Al Rwahnih i Diaz-Lara, a dobiveni rezultati potvrđeni su pomoću konvencionalne RT-PCR metode nakon čega su vizualizirani na 2%-tnom agaroznom gelu nakon provođenja horizontalne gel elektroforeze. Zaraza je utvrđena u 9 od 113 testiranih uzoraka dobivenih izolacijom RNA iz rozgve biljaka vinove loze čiji sanitarni status prethodno nije bio poznat. Shodno tome, postotak zaraze testiranih uzoraka iznosi gotovo 8% (7.96%). GVH je prethodno otkriven po prvi puta u Portugalu (Candresse i sur. 2018), a zatim su ga detektirali i Diaz-Lara i sur. u Kaliforniji 2019. godine te u Grčkoj (Panailidou i sur. 2021). Virus je u Portugalu i Grčkoj detektiran uporabom tehnologije sekvenciranja visoke propusnosti, dok je u Kaliforniji korištena metoda konvencionalnog RT-PCR-a. Stope zaraženosti u tri dosadašnja istraživanja su iznosila; Portugal 30% (6 pozitivnih uzoraka od 20 testiranih), Kalifornija ~1.5% (1.47%) (36/2,436 pozitivnih uzoraka) i Grčka 55.5% (5/9 pozitivnih uzoraka). Prema spomenutim podacima, postotak zaraze najveći je bio u Grčkoj, no uzevši u obzir da je testiran manji broj uzoraka, može se zaključiti da je zaraza H-virusom vinove loze poprilično visoka i u Portugalu, dok je u Hrvatskoj ipak nešto manja u usporedbi sa navedenim zemljama. GVH je u Kaliforniji pronađen jedino u uzorcima iz NCGR-a (*National Clonal Germplasm Repository*) pri čemu je svih 36 uzoraka bilo pozitivno pa je stopu zaraženosti moguće promatrati i iz tog gledišta. U usporedbi, pojavnost drugih predstavnika roda *Vitivirus* u Hrvatskoj smatra se sve višom te su tako Vončina i sur. 2019. proveli istraživanje distribucije 9 virusa kod 14 autohtonih sorata u Dalmaciji, među kojima su bili i GVA i GVB. U detekciji virusa pomoću metode ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) testirano je 1,116 trsova te je potvrđena prisutnost GVA (61.4%) i GVB (3.1%). U drugom istraživanju koje su proveli Vončina i sur. (2017.) u priobalnom području Hrvatske, GVA je također detektiran u visokom postotku zaraze od 91.7%, dok je GVB detektiran u znatno manjem postotku (20.8%). U istom istraživanju pronađeni su i GVD (14.6%), GVE (8.3%) i GVF (22.9%) po prvi put u Hrvatskoj, pa se postotak zaraze H-virusom vinove loze od 8%, utvrđen ovim istraživanjem, može smatrati manjim u usporedbi, no ovi nalazi ipak upućuju na sve veću pojavnost vitivirusa u Hrvatskoj kao i na sve lošiji sanitarni status hrvatskih autohtonih sorata vinove loze.

Nadalje, molekularne metode poput konvencionalnog RT-PCR-a i metode PCR u stvarnom vremenu (qPCR) korištene u ovom istraživanju, danas su jedne od najčešće korištenih metoda detekcije virusa. Konvencionalni RT-PCR ima nedostatak u vidu moguće kontaminacije uzoraka te mogućih lažno pozitivnih rezultata (Zherdev i dr 2018.). Ovi problemi se djelomično rješavaju provođenjem PCR metode u stvarnom vremenu (qPCR) koja je i korištena kao primarni način detekcije GVH u ovom istraživanju, dok je RT-PCR metoda služila kao potvrda dobivenih rezultata. Samim time, pouzdanost PCR metode u stvarnom vremenu (qPCR) smatra se poprilično visokom, s obzirom na njezinu veću osjetljivost i specifičnost pri detekciji virusa (Osman i sur. 2008.). Metoda sekvenciranja visoke propusnosti, korištena u portugalskom i grčkom istraživanju, je visoko učinkovita i

pouzdana jer ne samo da omogućava detekciju sasvim novog virusa već daje i uvid u strukturu njegovog genoma te informacije o svim drugim virusima prisutnim u uzorku.

U ovom istraživanju također su sekvencirani fragmenti genoma područja RNA-ovisne RNA polimeraze (RdRp) i proteina omotača (CP) pri čemu su utvrđena razlikovanja na nukleotidnoj i aminokiselinskoj razini usporedbom uzoraka međusobno te sa sekvencama stranih izolata iz GenBank baze podataka. Kod RdRp područja utvrđena je veća varijabilnost u odnosu na CP regiju usporedbom sekvenci 9 hrvatskih GVH izolata međusobno, ali i sa sekvencama 13 stranih izolata. Isti zaključak je donesen nakon prepisivanja nukleotidnih sekvenci u aminokiselinske sekvence te se podudara s otprije dokazanim nalazima da je RdRp područje genoma vrlo varijabilno (Shi i sur. 2004.), dok je za CP područje genoma poznata visoka konzerviranost (Osman i sur. 2008.).

Tako je unutar sekvenci 9 GVH izolata RdRp područja veličine od 356 nukleotida pronađeno 25 varijabilnih mjesta, a nakon višestrukog poravnavanja sa sekvencama 13 stranih izolata i prepisivanja u aminokiselinske slijedove, utvrđeno je ukupno 12 varijabilnih mjesta od 118 aminokiselina. Kao što je ranije spomenuto, unutar CP područja uočena je manja raznolikost s obzirom da je nađeno 17 varijabilnih mjesta kod nukleotidnih slijedova te samo 2 varijabilna mjesta nakon prepisivanja u aminokiseline. Usporedbom nukleotidnih sekvenci s aminokiselinskim, može se zaključiti da je došlo do sinonimne supstitucije nukleotida u CP području budući da je prepisivanjem u aminokiselinski slijed uočen manji broj varijabilnih područja u odnosu na nukleotidni slijed što ukazuje da je supstitucija nukleotida u određenim područjima rezultirala istom aminokiselinom. Shodno tome, razlikovanja u slijedovima aminokiselina u CP području gena uočena su samo kod sekvenci 3 hrvatska GVH izolata, dok u ostalim sekvencama (hrvatskim i stranim) nije opažena izmjena na aminokiselinskoj razini u odnosu na nukleotidnu.

Shodno tome, sekvence 9 hrvatskih izolata GVH RdRp područja pokazale su međusobnu sličnost koja je varirala od 95.5 do 99.15% na nukleotidnoj razini te od 95.76 do 100% na aminokiselinskoj razini. Nakon usporedbe s podacima iz GenBank baze podataka pomoću *on-line* programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul i sur. 1990.), sve sekvence hrvatskih izolata pokazale su najveću sličnost na nukleotidnoj razini sa stranim izolatom BD5154 iz SAD-a (GenBank: MK017733.1) (96.63 do 99.15% nt sličnosti), dok je najveća sličnost na aminokiselinskoj razini kod 5 od 9 hrvatskih sekvenci varirala od 97.46 do 99.15% s izolatom MM6674 iz SAD-a (GenBank: QBF44475.1).

Međusobna sličnost sekvenci CP područja hrvatskih izolata kretala se od 97.47 do 99.43% na nukleotidnoj razini te od 98.3 do 100% na aminokiselinskoj razini. Nadalje, usporedba uz pomoć programa BLAST (Altschul i sur. 1990.) pokazala je najveću sličnost u varijaciji od 98.88 do 99.72% na nukleotidnoj razini s izolatom GT5468 iz Njemačke (GenBank: MK838928.1) kod 5/9 sekvenci hrvatskih izolata, a kod 6/9 sekvenci hrvatskih izolata, na aminokiselinskoj razini je utvrđena najveća sličnost s izolatom BD5154 iz SAD-a (GenBank: QDZ36440.1) u iznosu od 99.15 do 100%. Usporedba sličnosti sekvenci izolata na nukleotidnoj, ali i aminokiselinskoj razini međusobno i sa sekvencama stranih izolata, dodatno je potvrdila podatak o većoj razini konzerviranosti CP područja genoma, a zanimljiva je i činjenica da se strani izolat BD5154, podrijetlom iz SAD-a pokazao kao najbliži hrvatskim izolatima i u RdRp području genoma na nukleotidnoj razini te u CP području genoma na aminokiselinskoj razini.

Rekonstrukcijom filogenetskih stabala iz sekvenci obaju spomenutih područja genoma, zaključeno je da su kod RdRp područja hrvatski GVH izolati izdvojeni u posebnu grupu od izolata stranog podrijetla uz iznimku izolata podrijetlom iz Pakistana i Francuske koji su također prisutni u istoj skupini. Geografska korelacija između izolata u stablu rekonstruiranom iz sekvenci područja gena proteina omotača, čini se vrlo malom budući da vrijednosti statističke podrške (*bootstrap* vrijednost) variraju od 51% do 68% na čvorovima 5 grana, dok ostali izolati nisu grupirani u srodnije skupine. Kod obje grane stabla koje sadržavaju po dva strana izolata, *bootstrap* vrijednost je iznosila 66%. Filogenetska analiza sekvenci CP područja genoma, pokazala je manju povezanost podrijetla izolata s njihovom grupacijom u stablu te se ovdje može povući paralela s topologijom stabla rekonstruiranog u ranije spomenutom kalifornijskom istraživanju iz 2019. godine, gdje se izolati GVH kod nijednog od dva spomenuta područja genoma nisu grupirali prema geografskom podrijetlu.

6. Zaključak

Istraživanjem provedenim u ovom radu, doneseni su sljedeći zaključci:

- 1) H-virus vinove loze prisutan je u kolekcijskom nasadu autohtonih sorata vinove loze koji se nalazi u sklopu vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina te je detektiran uporabom RT-PCR metode u stvarnom vremenu, a potvrđen metodom konvencionalnog RT-PCR-a u postotku zaraze od 7.96%.
- 2) Prisutnost H-virusa vinove loze utvrđena je u uzorcima trsova sljedećih autohtonih sorata: Gustopupica, Malvazija istarska, Muškotel, Babica plosnata, Brajdica bijela, Plavčina, Bljuzgavac, Svrđlovina crna i Kozak.
- 3) Nukleotidni sljedovi hrvatskih GVH izolata u području RNA-ovisne RNA polimeraze (RdRp) pokazali su sličnost u iznosu 95.5% do 99.15% te najveću sličnost sa stranim izolatom BD5154 podrijetlom iz SAD-a (GenBank: MK017733.1) (96.63 do 99.15% nt sličnosti). Na aminokiselinskoj razini, sličnost hrvatskih izolata je varirala od 95.76 do 100% uz najveću sličnost od 97.46 do 99.15% kod 5 od 9 hrvatskih sekvenci s izolatom MM6674 iz SAD-a (GenBank: QBF44475.1).
- 4) Nukleotidni sljedovi područja genoma proteina omotača (CP) hrvatskih GVH izolata pokazali su međusobnu sličnost u rasponu od 97.47 do 99.43%, a najveću sličnost sa stranim izolatom GT5468 iz Njemačke (GenBank: MK838928.1) kod 5/9 sekvenci hrvatskih izolata (98.88 do 99.72% nt sličnosti). Usporedbom na aminokiselinskoj razini, utvrđena je međusobna sličnost sekvenci hrvatskih izolata u rasponu od 98.3 do 100% sličnosti te je najveća sličnost kod 6/9 sekvenci hrvatskih izolata sa stranim izolatom BD5154 iz SAD-a (GenBank: QDZ36440.1), iznosila između 99.15 i 100%.

7. Popis literature

1. Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990). "Basic local alignment search tool.". *Journal of Molecular Biology*. 215(3): 403-410.
2. Ambardar S., Gupta R., Trakroo D., Lal R., Vakhlu J. (2016). High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*. 56(4): 394-404.
3. Boscia D., Savino V., Minafra A., Namba S., Elicio V., Castellano M. A., Gonsalves D., Martelli G. P. (1993). Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology*. 130(1-2): 109-120.
4. Buzkan N., Minafra A., Saldarelli P., Castellano A., Dell'Orco M., Martelli G. P., Gölles R., Laimer da Camara Machado M. (2001). Heterologous encapsidation in non-transgenic and transgenic *Nicotiana* plants infected by grapevine viruses A and B. *Journal of Plant Pathology*. 83(1): 37-43.
5. Blouin A. G., Keenan S., Napier K. R., Barrero R. A., MacDiarmid R. M. (2018). Identification of a novel vitivirus from grapevines in New Zealand. *Archives of Virology*. 163: 281-284.
6. Castillo J., Hevin M., Rives M. (1975). Transmission d'une virose de la vigne (maladie de l'écorce liegeuse ou Corky Bark) per la methode de la greffe en vert. *Comptes Rendus des Seances de l'Academie des Sciences, Paris, Serie D* 281, 147-150.
7. Candresse T., Theil S., Faure C., Marais A. (2018). Determination of the complete genomic sequence of grapevine virus H, a novel vitivirus infecting grapevine. *Archives of Virology*. 163(1): 277-280.
8. Credi R., Giunchedi L. (1996). Grapevine leafroll-associated viruses and grapevine virus A in selected *Vitis vinifera* cultivars in northern Italy. *Plant Pathology*. 45(6): 1110-1116.
9. du Preez J., Stephan D., Mawassi M., Burger J. T. (2011). The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. *Archives of Virology*. 156(9): 1495-1503.
10. Diaz-Lara A., Golino D., Al Rwahnih M. (2018). Genomic characterization of grapevine virus J, a novel virus identified in grapevine. *Archives of Virology*. 163: 1965-1967.
11. Diaz-Lara A., Brisbane R. S., Aram K., Golino D., Al Rwahnih M. (2019). Detection of new vitiviruses infecting grapevine in California. *Archives of Virology*. 164(10): 2573-2580.
12. Diaz-Lara A., Erickson T. M., Golino D., Al Rwahnih M. (2020). Development of a universal RT-PCR assay for grapevine vitiviruses. *PLoS One* .15(9):e0239522
13. Elbeaino T., Chammem H., Alsaheli Z., Ben Slimen A., Digiaro M. (2019). Development of RT-PCR assays for the detection and the resultant phylogenetic analysis of four grapevine vitiviruses based on the coat protein sequences. *Journal of Virological Methods*. 273: 113712.
14. 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.

15. Garau R., Prota U., Cugusi M. (1989). Investigations on rugose wood disorders (stem pitting and/or stem grooving) of grapevine in Sardinia. U: Proceedings 9th Meeting of ICVG, Kyriat Anavim (1987), 135-141.
16. Galiakparov N., Tanne E., Sela I., Gafnya R. (2003). Functional analysis of the grapevine virus A genome. *Virology*. 306(1): 42-50.
17. Goszczynski D. E., Habili N. (2011). Grapevine virus A variants of group II associated with Shiraz disease in South Africa are present in plants affected by Australian Shiraz disease, and have also been detected in the USA. *Plant Pathology*. 61(1): 205-214.
18. Giampetruzzi A., Roumi V., Roberto R., Malossini U., Yoshikawa N., La Notte P., Terlizzi F., Credi R., Saldarelli P. (2012). A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*. 163(1): 262-268.
19. Hull R. (2002). CHAPTER 6 - Genome Organization. U: Matthews' Plant Virology (Fourth Edition) (Hull R.), Academic Press, Cambridge, 171-224.
20. Hall T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
21. Herrbach E., Alliaume A., Prator C. A. , Daane K. M., Cooper M. L., Almeida R. P. P. (2017). Vector Transmission of Grapevine Leafroll-Associated Viruses. U: Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management (Meng B., Martelli G., Golino D., Fuchs M.), Springer International Publishing, Cham, 483-503.
22. Jones T. (2016). Grapevine Viruses and Associated Vectors in Virginia: Survey, Vector Management, and Development of Efficient Grapevine Virus Testing Methods. Doctoral dissertation, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
23. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
24. Krake L. R. , Steele Scott N., Rezaian M. A., Tayl R. H. (1999). Graft-transmitted Diseases of Grapevines. CSIRO PUBLISHING, Clayton.
25. King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (2012). Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Inc., San Diego.
26. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 1547-1549.
27. Koch K. G., Jones T., Badillo-Vargas I. E. Chapter (2020). Chapter 26 - Arthropod vectors of plant viruses. U: Applied Plant Virology (Awasthi L. P.), Academic Press, Cambridge, 349-379.
28. La Notte P., Buzkan N., Choueiri E., Minafra A., Martelli G.P. (1997). Acquisition and transmission of grapevine virus a by the mealybug *Pseudococcus longispinus*. *Journal of Plant Pathology*. 79(1): 79-85.
29. Monette P. L., James D. (1990). Use of in vitro cultures of *Nicotiana benthamiana* for the purification of grapevine virus A. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 23(2): 131-134.

30. Martelli G. P., Boudon-Padieu E. (2006). Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. CIHEAM, Bari.
31. Martelli G. P. (2010). Virus Diseases of Grapevine. Encyclopedia of Life Sciences. eLS. (Ed.).
32. Martelli G. P. (2014a). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Journal of Plant Pathology. 96(1): 1-81.
33. Martelli G. P. (2014b). Virus Diseases of Grapevine. eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.).
34. Maliogka V. I. , Olmos A., Pappi P. G., Lotos L., Efthimiou K., Grammatikaki G., Candresse T., Katis N. I., Avgelis A. D. (2015). A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. Virus Research. 203: 47-55.
35. Meng B., Martelli G. P., Golino D. A., Fuchs M. (2017). Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. Springer International Publishing, Cham.
36. Meng B., Rowhani A. (2017). Grapevine rupestris stem pitting-associated virus. U: Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management (Meng B., Martelli G., Golino D., Fuchs M.), Springer International Publishing, Cham, 257-287.
37. Minafra A., Mawassi M., Goszczynski D., Saldarelli P. (2017). Grapevine Vitiviruses. U: Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management (Meng B., Martelli G., Golino D., Fuchs M.), Springer International Publishing, Cham, 229-256.
38. Mannini F., Digiaro M. (2017). The Effects of Viruses and Viral Diseases on Grapes and Wine. U: Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management (Meng B., Martelli G., Golino D., Fuchs M.), Springer International Publishing, Cham, 453-482.
39. Maree H. J., Blouin A. G., Diaz-Lara A., Mostert I., Al Rwahnih M., Candresse T. (2020). Status of the current vitivirus taxonomy. Archives of Virology. 165: 451-458.
40. Nakaune R., Toda S., Mochizuki M., Nakano M. (2008). Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. Archives of Virology. 153(10): 1827-1832.
41. Osman F., Rowhani A. (2006). Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). Journal of Virological Methods. 133(2): 130-6.
42. Osman F., Golino D., Rowhani A. (2008). Real-time RT-PCR (TaqMan®) Assays and Low Density Array Detection of Viruses Associated with Rugose Wood Complex of Grapevine. Journal of Virological Methods. 154(1-2): 69-75.
43. Oliveira L. M., Orflio A. F., Inoue-Nagata A. K., Nagata T., Blawid R. (2017). A novel vitivirus-like sequence found in *Arracacia xanthorrhiza* plants by high throughput sequencing. Archives of Virology. 162(7): 2141-2144.
44. Panailidou P., Lotos L., Sassalou C-L., Gagiano E., Pietersen G., Katis N., Maliogka V. I. (2021). First report of grapevine virus H (GVH) in grapevine in Greece. Plant Disease.

45. Rosa C., Jimenez J. F., Margaria P., Rowhani A. (2011). Symptomatology and Effects of Viruses Associated with Rugose Wood Complex on the Growth of Four Different Rootstocks. *American Journal of Enology and Viticulture*. 62(2): 207-213.
46. Savino V., Boscia D., Martelli G. P. (1989). Rugose wood complex of grapevine: can grafting to *Vitis* indicators discriminate between diseases? U: *Proceedings 9th Meeting of ICVG, Kyriat Anavim* (1987), 91-94.
47. Shi B. J., Habili N., Gafny R., Symons R. H. (2004). Extensive variation of sequence within isolates of Grapevine virus B. *Virus Genes*. 29: 279-285.
48. Saldarelli P., Giampetruzzi A., Maree H. J., Al Rwahnih M. (2017). High-Throughput Sequencing: Advantages Beyond Virus Identification. U: *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management* (Meng B., Martelli G., Golino D., Fuchs M.), Springer International Publishing, Cham, 625-642.
49. Šubić M., Cvjetković B. (1996). Viroze i fitoplazme vinove loze. *Glasnik zaštite bilja*. 19(5): 259-261.
50. Velasco L., Padilla C. V., Cretazzo E., Hita I., Padilla V. (2006). Some aspects of the presence of Grapevine vitivirus in Spain: detection of GVB in *Planococcus citri* Risso. *Extended abstracts 15th Meeting of ICVG, Stellenbosh*, 240-241.
51. Vončina D. (2011). Utvrđivanje virusa na autohtonim sortama vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Dalmaciji serološkim, molekularnim i biološkim metodama. Doktorska disertacija, Agronomski fakultet, Zagreb.
52. Vončina D., Mihaljević M., de Stradis A. (2013). Istraživanje domaćina B-virusa vinove loze među zeljastim biljnim vrstama. *Poljoprivredni Fakultet Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek*.
53. Vončina D., Al Rwahnih M., Rowhani A., Gouran M., Almeida R. P. P. (2017). Viral Diversity in Autochthonous Croatian Grapevine Cultivars. *Plant Disease*. 101(7): 1230-1235.
54. Vončina D., Almeida R. P. P. (2018). Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals a multitude of viruses, including novel ones. *Archives of Virology*. 163: 2239-2243.
55. Vončina D., Preiner D., Šimon S., Cvjetković B., Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J. (2019). Distribucija devet virusa kod hrvatskih autohtonih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.) s područja Dalmacije uključenih u klonsku selekciju. *Journal of Central European Agriculture*. 20(1): 262-273.
56. Vončina D. (2021). Rasprostranjenost ekonomski važnih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj i njihov utjecaj na vinogradarsku proizvodnju. *Glasilo biljne zaštite*. 21(3): 344-349.
57. Zherdev A. V., Vinogradova S. V., Byzova N. A., Porotikova E. V., Kamionskaya A. M., Dzantiev B. B. (2018). Methods for the Diagnosis of Grapevine Viral Infections: A Review. *Agriculture*. 8(12): 195.

Popis korištenih poveznica:

1. Golino D. A. (2003). EMERGING GRAPEVINE DISEASES. U: 14th ICVG Conference, 12-17th September, Locorotondo, Bari, 136-138.
<https://icvg.org/data/2003Session45.pdf> - pristupljeno 28.07.2021.
2. ICTV (2020). Master Species List 2020.v1. The International Committee on Taxonomy of Viruses.
<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/12314> - pristupljeno 29.07.2021.
3. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> - pristupljeno 29.07.2021.

Slike:

ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics.

<https://viralzone.expasy.org/270> - pristupljeno 24.07.2021

Životopis

Kristina Nikolić rođena je u Zagrebu 12.01.1998. godine. Onovnu školu završila je u Zagrebu 2012. godine te je iste godine upisala srednju školu Ženska opća gimnazija Družbe sestara milosrdnica koju završava 2016. godine. Nastavila je obrazovanje upisom na studij Zaštite bilja (Fitomedicine) na Agronomskom fakultetu.