

Ekologija i karakterizacija G-virusa vinove loze i badnavirusa vinove loze 1

Jagunić, Martin

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:990151>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-25**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

Martin Jagunić

**EKOLOGIJA I KARAKTERIZACIJA G-
VIRUSA VINOVE LOZE I BADNAVIRUSA
VINOVE LOZE 1**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB FACULTY OF AGRICULTURE

Martin Jagunić

**ECOLOGY AND CHARACTERIZATION
OF GRAPEVINE VIRUS G AND
GRAPEVINE BADNAVIRUS 1**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU AGRONOMSKI FAKULTET

Martin Jagunić

**EKOLOGIJA I KARAKTERIZACIJA G-
VIRUSA VINOVE LOZE I BADNAVIRUSA
VINOVE LOZE 1**

DOKTORSKI RAD

Mentor: izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

UNIVERSITY OF ZAGREB FACULTY OF AGRICULTURE

Martin Jagunić

**ECOLOGY AND CHARACTERIZATION
OF GRAPEVINE VIRUS G AND
GRAPEVINE BADNAVIRUS 1**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Assoc. Prof. Darko Vončina, PhD

Zagreb, 2023.

Bibliografski podatci:

- **Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti
- **Znanstveno polje:** Poljoprivreda/ agronomija
- **Znanstvena grana:** Fitopatologija
- **Institucija:** Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za fitopatologiju
- **Voditelj doktorskog rada:** izv. prof. dr. sc. Darko Vončina
- Broj stranica: 183
- Broj tablica: 12
- Broj slika: 40
- Broj grafikona: 7
- Broj priloga: 9
- Broj literaturnih referenci: 280
- Datum obrane doktorskog rada: 15.03.2023.
- Sastav povjerenstva za obranu doktorskog rada:
 - prof. dr. sc. Tihomir Miličević
 - prof. dr. sc. Edyta Đermić
 - prof. dr. sc. Dijana Škorić

Rad je pohranjen u:

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, Ulica Hrvatske bratske zajednice 4 p.p 550, 10 000 Zagreb, Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta, Svetošimunska cesta 25, 10 000 Zagreb.

Tema rada prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Agronomskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 6. listopada 2020. godine te odobrena na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 16. veljače 2021. godine.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Martin Jagunić, izjavljujem da sam samostalno izradio doktorski rad pod naslovom:

EKOLOGIJA I KARAKTERIZACIJA G-VIRUSA VINOVE LOZE I BADNAVIRUSA VINOVE LOZE 1

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedini autor ovoga doktorskog rada;
- da je doktorski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u izradi istoga nisam koristio drugim izvorima osim onih koji su u njemu navedeni;
- da sam upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

Zagreb, ____ . ____ . godine

Potpis doktoranda

Ocjena doktorskog rada

Martin Jagunić, mag. ing. agr. je doktorski rad pod naslovom: „**Ekologija i karakterizacija G-virusa vinove loze i badnavirusa vinove loze 1**“ obranio _____
pred povjerenstvom u sastavu:

1. Prof. dr. sc. Tihomir Miličević _____
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

2. Prof. dr. sc. Edyta Đermić _____
Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet

3. Prof. dr. sc. Dijana Škorić _____
Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet

Disertacija je ocijenjena od strane istog povjerenstva.

Informacije o mentoru

Darko Vončina rođen je 21. kolovoza 1979. g. u Zagrebu, Republika Hrvatska. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu smjer Bilinogojstvo upisao je 1998. g. nakon čega 2000. g. upisuje smjer Zaštita bilja na kojem diplomira u listopadu 2005. g. Od prosinca 2005. g. radi kao asistent na Zavodu za fitopatologiju Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta. U travnju 2006. g. upisuje poslijediplomski doktorski studij „Poljoprivredne znanosti“ na Sveučilištu u Zagrebu Agronomski fakultet. Doktorski rad naslova „Utvrđivanje virusa na autohtonim sortama vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Dalmaciji serološkim, molekularnim i biološkim metodama“ obranio je 3. lipnja 2011. g. te stekao akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti, znanstveno polje poljoprivreda, grana fitomedicina. U suradničko zvanje i na radno mjesto višeg asistenta izabran je 15. studenog 2011. g., u znanstveno-nastavno zvanje docenta 22. svibnja 2013. g., a trenutno je u znanstveno-nastavnom zvanju izvanrednog profesora na koje je izabran 2018. g. Nakon stjecanja doktorata znanosti specijalizirao se iz područja biljne virologije na prestižnim svjetskim institucijama (Istituto di Virologia vegetale – Sezione di Bari del CNR, University of California Berkeley, University of California Davis).

Predavač je na 20 različitih predmeta na preddiplomskoj, diplomskoj i poslijediplomskoj (doktorskoj) razini. Područje znanstvenog rada vezano je uz biljne viruse s posebnim naglaskom na virusne bolesti vinove loze, njihovu biologiju, ekologiju, epidemiologiju te mogućnosti detekcije primjenom različitih metoda. Tijekom 2015./16. bio je voditelj međunarodnog projekta „*Ecology of an emerging grapevine virus in Croatia and California*“. Kroz navedeni projekt, u suradnji s kolegama s Kalifornijskog Sveučilišta Berkeley otkriven je novi virus vinove loze nazvan badnavirus vinove loze 1. Trenutno je voditelj i glavni istraživač na projektu „*Ekologija i karakterizacija dva nova virusa vinove loze*“ kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost (HRZZ). Bio je koordinator VIP projekta „*Poboljšanje kvalitete sadnog materijala višnje Maraske zdravstvenom selekcijom i genetičkom evaluacijom*“ kojeg financira Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske. Trenutno je ili je bio suradnik na 10 nacionalnih i/ili međunarodnih projekata (COST, TEMPUS, IPA itd.).

Kao autor ili koautor publicirao je 50 znanstvenih i stručnih radova, od čega 27 a1 znanstvenih radova citiranih u CC i SCI bazama podataka. Koautor je dva sveučilišna priručnika/monografije te jednog poglavlja u znanstvenoj knjizi. Rezultate svojih znanstvenih i stručnih istraživanja prezentirao je na više nacionalnih i međunarodnih skupova (APS Annual Meeting 2016, ICVG Meeting 2009, Simpozij agronoma, Seminari zaštite bilja, itd.). U razdoblju 2016. – 2020. bio je član uređivačkog odbora časopisa *Journal of Central European Agriculture* (JCEA). Trenutno je član Međunarodnog vijeća za proučavanje viroza i virozama sličnih bolesti vinove loze (*International Council for the Study of Virus and Virus-like diseases of the Grapevine* (ICVG), američkog fitopatološkog društva (*American Phytopathological Society* – APS) te Hrvatskog društva biljne zaštite (HDBZ) gdje trenutno obnaša dužnost člana upravnog odbora. Od 2018. do 2021. obnašao je funkciju prodekana za znanost i međunarodnu suradnju pri Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu.

Doktorski rad je izrađen u sklopu programa Hrvatske zaklade za znanost „*Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti*“ te istraživačkog projekta „*Ekologija i karakterizacija dva nova virusa vinove loze– ENVISaGE (IP-2018-01- 1305)*“, voditelj izv. prof. dr. sc. Darko Vončina (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet).



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet



Zahvala

Zahvaljujem se svima koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ove doktorske disertacije.

Hvala Vam!

Sažetak

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najznačajnijih višegodišnjih kultura u Hrvatskoj i svijetu. Vinovu lozu inficira više od 86 različitih virusa iz 18 porodica i 35 rodova, od kojih su mnogi okarakterizirani kao uzročnici ekonomski značajnih virusnih bolesti. U Hrvatskoj je 2018. godine prvi puta potvrđena prisutnost G-virusa vinove loze (GVG; rod *Vitivirus*, porodica *Betaflexiviridae*) i badnavirusa vinove loze 1 (GBV-1; rod *Badnavirus*, porodica *Calimoviridae*). S obzirom na pripadnost navedenih virusa rodovima čiji predstavnici uzrokuju ekonomske štete u vinovoj lozi, ciljevi ovog doktorskog rada bili su: za oba virusa razviti precizne i pouzdane molekularne metode detekcije, utvrditi osjetljivost i efikasnost razvijenih protokola, utvrditi sposobnost detekcije i sezonsku dinamiku virusa u inficiranim biljkama, istražiti njihovu rasprostranjenost u Hrvatskoj, okarakterizirati izolate na molekularnoj razini te utvrditi načine prijenosa i domaćine (vrste roda *Vitis* ili izvan njega).

U razvoju novih protokola za detekciju metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) korištena su dva GVG i četiri GBV-1 izolata utvrđena metodom sekvenciranja visoke protočnosti (eng. *high throughput sequencing*, HTS), zajedno s 11 otprije poznatih GVG te jednim GBV-1 izolatom iz baze GenBank (NCBI). Osjetljivost novorazvijenih PCR protokola ispitana je serijskim razrjeđenjima izoliranih RNA, DNA i TNA, korištenjem komercijalnih kompleta za izolaciju (RNeasy/DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) i metode glicin-EDTA-natrij (eng. *glycin-EDTA-sodium*, GES), a efikasnosti metoda PCR u stvarnom vremenu (qPCR) standardnim krivuljama. Razvijeni višestruki RT-qPCR protokol za detekciju GVG i GBV-1 primijenjen je za procjenu sposobnosti detekcije i sezonske dinamike virusa u zaraženim biljkama na temelju TNA izolirane metodom GES. Istim metodama istraživana je rasprostranjenost virusa, testiranjem 4327 uzorka vinove loze iz komercijalnih i kolekcijskih vinograda u kontinentalnoj i priobalnoj Hrvatskoj. Protokoli temeljeni na metodi RT-PCR za GVG i PCR za GBV-1 primijenjeni su za dobivanje produkata od 35, odnosno 50 izolata, koji su sekvencirani Sangerovom metodom te filogenetski obrađeni zajedno s izolatima determiniranim metodom HTS u ovom istraživanju i s otprije poznatim izolatima. Nadalje, testirani su sljedeći tipovi prijenosa: prijenos ličinkama lozine štitaste uši (*Planococcus ficus* Sign.) i mehaničkom inokulacijom na sjemenjake vinove loze, zeljaste test biljke i korove; prijenosom sjemenom vinove loze; prijenos cijepljenjem „na zrelo“ na drvenaste indikatore *Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, Kober 5BB i LN 33 te cijepljenje „zeleno na zrelo“ korištenjem zelenih diferenciranih pupova na drvenaste indikatore i vinovu lozu.

Nove početnice i probe za detekciju virusa razvijene su na osnovi kapsidnog proteina (GVG), odnosno regije genoma reverzne transkriptaze (GBV-1), a razvijena metoda RT-qPCR pokazala je 100 puta veću osjetljivost u usporedbi s metodom RT-PCR za GVG i PCR za GBV-1, uz efikasnost detekcija u rasponu od 97,91 % do 107,28 %. Sposobnost detekcije virusa utvrđena je kroz cijelu sezonu, uz najmanju osjetljivost metode RT-qPCR za GVG u razdoblju kretanja vegetacije (travanj, svibanj) te negativne rezultate u tri termina uzorkovanja u istom razdoblju za GBV-1. Ukupno je GVG detektiran u 10,54 %, a GBV-1 u 13,38 % uzoraka, pri čemu je njihova pojavnost potvrđena samo u autohtonim sortama, a rasprostranjenost u kolekcijskom nasadu i komercijalnim vinogradima priobalne Hrvatske te u kolekcijskim nasadima na kontinentu. Filogenetskim analizama utvrđena je identičnost izolata podrijetlom iz istih vinograda/lokacija, sugerirajući lokalni prijenos virusa, pri čemu je za GVG utvrđena nova divergentnost formiranjem dvije nove grupe. Za oba virusa dokazan je prijenos ličinkama lozine štitaste uši na vinovu lozu u 14,63 % za GVG te 60,98 % za GBV-1. Ni jednim istraživanim načinom prijenosa nisu potvrđeni domaćini među zeljastim test biljkama ili korovima, kao ni sposobnost prijenosa sjemenom. Dokazan je prijenos na indikatore (*Vitis* sp.) u pokusima cijepljenja „na zrelo“ i „zeleno na zrelo“, pri čemu promjene na drvu nisu zabilježene, dok je na listovima biljaka inficiranim s GVG i GLRaV-3 uočeno uvijanje lista i/ili crvenilo/žučenje u ovisnosti o indikatoru.

Ključne riječi: vinova loza, virusi, GVG, GBV-1, PCR, osjetljivost i efikasnost, sezonska dinamika, rasprostranjenost, filogenetika, prijenos, domaćini

Ecology and characterization of grapevine virus G and grapevine badnavirus 1

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is one of the most important perennial crops in Croatia and worldwide. In addition to numerous fungal and bacterial pathogens, grapevine can also be infected by various viruses. To date, more than 86 viruses from 18 families and 35 genera have been identified as grapevine-infecting viruses, some of which are considered widespread agents of economically important viral diseases. Such viruses are major challenge for grape production in all viticultural regions of the world, as the diseases directly affect yield by reducing the grape quality and quantity, as well as the lifespan of the vines. In the absence of curative measures, virus control is based on preventive measures such as the production of healthy planting material and control of vectors. Control measures for grapevine viruses are based on their ecological and epidemiological characteristics, the most important of which are the modes of transmission and virus-host interactions. Viral studies on Croatian autochthonous grapevine cultivars already revealed high infection rates with economically important viruses, together with recently discovered ones that have not yet been characterized.

In 2018, grapevine virus G (GVG; genus *Vitivirus*, family *Betaflexiviridae*) and grapevine badnavirus 1 (GBV-1; genus *Badnavirus*, family *Calimoviridae*) were reported from Croatia for the first time using the high-throughput sequencing (HTS) technology. GVG was detected in the Croatian autochthonous cultivars Babica (VB -108, MF993573), Dobričić (VD -102, MF993574), Ljutun (VLJ-178, MF781081) and Vlaška (VVL-101, MF993575) from the Grapevine virus collection (University of Zagreb Faculty of Agriculture). GBV-1 was detected from the same collection in cv. Ljutun (VLJ-178, NC_055481) and Dobričić (VD-102). While GVG was already reported from New Zealand in 2017, GBV-1 was reported from Croatia for the first time. Both viruses could be of economic importance, as they belong to genera comprising viral pathogens causing economically important viral diseases in grapevine. For this reason, and considering that both viruses were reported from valuable Croatian autochthonous cultivars, the objectives of this research were: the development of accurate, sensitive and robust molecular detection methods, determination of their seasonal dynamics, distribution in Croatia, partial molecular characterization, together with determination of their modes of transmission and host range within and out of the genus *Vitis*.

To develop primers and probes for accurate and robust detection, already known virus isolates from the GenBank (NCBI) were analysed together with two GVG and four GBV-1 isolates revealed by HTS in this study. Using Primer 3 and Geneious softwares, conserved genomic regions were selected in the coat protein region (CP) for GVG and reverse transcriptase (RT) for GBV-1 for the new primers and probes design and the detection by end-point reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for GVG, PCR for GBV-1, and reverse-transcription real-time PCR (RT-qPCR). To make detection more cost-effective, a multiplex RT-qPCR assay was developed and two DNA/RNA/TNA isolation methods were tested: column-based methods of RNA/DNA isolation using commercial kits from Qiagen (RNeasy/DNeasy Plant Mini Kit) and extraction of TNA based on the glycine-EDTA-sodium (GES) method. In addition, the sensitivity of both assays (end-point and real-time PCR) was tested together with two extraction methods using 10-fold serial dilutions. RT-qPCR assay had 100-fold higher sensitivity compared with end-point RT-PCR (GVG) or end-point PCR (GBV-1) for both GVG and GBV-1, regardless of which RNA and DNA isolation method was used (column-based or GES). Both detection methods for GBV-1, RT-qPCR (detectability down to a dilution of 1:10,000,000) and end-point PCR (1:10,000), were more sensitive when the column-based method was used for DNA isolation, compared with the GES method (1:100,000 and 1:100, respectively). In contrast, detection of GVG by RT-qPCR (1:100,000) and end-point RT-PCR (1:100) showed the same sensitivity regardless of the isolation method used. Analyses of standard curves obtained by RT-qPCR for GVG and GBV-1 showed better reaction efficiency based on DNA

and RNA isolated using Qiagen's kits (103.85% and 97.91%, respectively) compared to TNA isolated using the GES method (106.87% and 107.28%, respectively).

After verifying the efficiency of molecular methods, the detectability and seasonal dynamics of GVG and GBV-1 were studied in infected plants during the 2019 growing and dormant season, using different plant tissues (dormant season – cortical scrapings, young shoots at the beginning of vegetation, petioles of old leaves during vegetation). Using the GES method for isolation of TNA, both viruses were efficiently detected throughout dormancy and during most of the growing season by multiplex RT-qPCR. However, negative results have been found for GBV-1 early in the season (from shoots in April and from petioles in May). The statistically highest sensitivity (low Cq values) of the RT-qPCR for GVG was determined on petioles collected from June to September and the lowest sensitivity (high Cq values) from April to June. On the other hand, differences between detection ability for GBV-1 during dormancy and the growing season were not significant.

The distribution study for both viruses in Croatia was performed using the GES extraction method for TNA isolation, followed by multiplex RT-qPCR. During the summer of 2020 and 2021, a total 4,327 samples were collected from grapevines originating from 93 different commercial vineyards and five collection plantations. Field screening revealed an overall infection rate of 10.54% for GVG and of 13.38% for GBV-1. Both viruses were detected along the Croatian coastal winegrowing region in commercial vineyards and collection plantation, but only in autochthonous cultivars, with determined infection rates at specific sites ranging from 2 % to 100 % for GVG and from 1.9 % to 96 % for GBV-1. In the continental winegrowing region, GVG and GBV-1 were detected only in autochthonous cultivars from two collection plantations in Zagreb (University of Zagreb Faculty of Agriculture), but not in commercial vineyards.

The 35 end-point RT-PCR products for GVG and 50 PCR products for GBV-1 were selected by their origin, Sanger sequenced in both directions and phylogenetically processed using MEGA11 software. In addition to the previously mentioned isolates, two GVG isolates and four GBV-1 isolates determined by HTS were used for nucleotide and amino-acid comparison in selected genomic regions (CP for GVG and RT for GBV-1), along with isolates already available in GenBank (NCBI). The identities at the nucleotide (nt) and amino acid (aa) levels for newly discovered GVG isolates in the CP genome region ranged from 89.01-100 % and 96.79-100 %, respectively, whereas for GBV-1 isolates in the RT genome region ranged from 94.13-100 % and 92.74-100 %, respectively. Isolates originating from the same sites/vineyards showed mutual similarity or identity in the CP and RT regions of the genome compared to isolates from other sites, suggesting possible on-site transmission by insect vectors. Phylogenetic analysis of all known GVG isolates (from Croatia, New Zealand, and the United States) resulted in a division into five distinct groups, with two new groups formed consisting of isolates identified in this study revealing previously unknown genetic divergence of GVG in the CP region of the genome.

In transmission experiments using first and second instars of vine mealybug (*Planococcus ficus* Sign.), 10 instars per plant and 48 hours for acquisition and inoculation access period, only vine-to-vine transmission was successful with rates of 14.63 % for GVG and 60.98 % for GBV-1. In contrast, using the same approach, both viruses were not transmitted to herbaceous test plants (*Chenopodium murale* L. and *Nicotiana benthamiana* D.) and weeds commonly found in Croatian vineyards (*Amaranthus retroflexus* L., *Ambrosia artemisiifolia* L., *Chenopodium album* L., *Galinsoga parviflora* Cav., and *Abutilon theophrasti* Medik.). Negative results, verified by multiplex RT-qPCR, were also obtained for grapevine seed transmission and mechanical transmission using three different inoculation buffers (phosphate, nicotine and phosphate-nicotine-cysteine).

In addition to vector transmission, transference by dormant grafting was confirmed for both viruses, since they were successfully transmitted to the following rootstocks/indicator plants: *Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, Kober 5BB (*Vitis berlandieri* x *Vitis riparia*) and LN 33 (Couderc 1613 x *Vitis berlandieri*). Overall infection rates, determined by grafting of dormant canes, were 100 % for GVG and 57.69 % for GBV-1.

In transmission by green grafting using the T-budding technique, GVG and GBV-1 were grafted onto indicators: Kober 5BB, LN 33, 110 Richter (*V. berlandieri* × *V. rupestris*), *V. rupestris*, *V. riparia*, and grapevines 'Chardonnay' and 'Cabernet Sauvignon'. GVG was transferred to all previously mentioned plants except *V. riparia* and *V. rupestris*, whereas GBV-1 was successfully transferred only to 'Chardonnay' and 'Cabernet Sauvignon'. In the case of GBV-1, no symptoms were observed on leaves or woody cylinder after bark removal. While no symptoms occurred on woody cylinder in the case of GVG, symptoms such as reddening/yellowing and/or leaf rolling were observed on Kober 5BB, LN 33, Chardonnay, and Cabernet Sauvignon. It should be noted that in addition to GVG-infection, presence of GLRaV-3 was also confirmed in all previously mentioned plants, as GVG occurred in co-infection with GLRaV-3 in plants used as a source of buds for grafting.

Considering the overall results, GVG and GBV-1 are widespread viruses in Croatia, especially in the coastal winegrowing region. Since they have been transmitted by mealybug vector and grafting, and are not regulated in Croatia, there is a real risk of their further spread in Croatia and beyond. Therefore, future research should focus on demonstrating their impact on grape and wine production, while the data on ecological traits obtained in this study could be useful for developing management strategies to slow their spread in the future.

Key words: grapevine, viruses, GVG, GBV-1, PCR, sensitivity and efficiency, seasonal dynamics, distribution, phylogenetic, transmission, hosts

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja	4
2. PREGLED RELEVANTNE LITERATURE	5
2.1. Vinova loza (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	5
2.1.1. Klasifikacija i podrijetlo vinove loze	5
2.1.2. Uzgoj vinove loze.....	6
2.1.3. Vinogradarstvo u Hrvatskoj	8
2.2. Virusi vinove loze.....	11
2.2.1. Ekonomski značajne virusne bolesti vinove loze	16
2.2.2. Posljedice zaraze i ekonomski gubici	17
2.2.3. Rod <i>Vitivirus</i>	18
2.2.3.1. Taksonomija i nomenklatura	18
2.2.3.2. Morfologija i organizacija genoma	20
2.2.3.3. Ekologija i epidemiologija vitivirusa vinove loze	21
2.2.3.4. Kompleks naboranosti drveta vinove loze (RW)	22
2.2.3.5. G-virus vinove loze (GVG).....	26
2.2.4. Rod <i>Badnavirus</i>	27
2.2.4.1. Virus prosvjetljivanja žila vinove loze (GVCV).....	29
2.2.4.2. Virus povezan s diskoloracijom lista sorte 'Roditis' (GRLDaV)	31
2.2.4.3. Badnavirus vinove loze 1 (GBV-1).....	33
2.3. Metode detekcije virusa vinove loze.....	35
2.4. Mjere kontrole virusnih bolesti vinove loze	38
2.5. Istraživanja virusa vinove loze u Hrvatskoj.....	40
3. MATERIJALI I METODE	43
3.1. Izolacija nukleinskih kiselina	43
3.1.1. Izolacija nukleinskih kiselina korištenjem komercijalnih kompleta.....	43
3.1.2. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina metodom GES	43
3.2. Razvoj molekularnih metoda detekcije.....	44
3.2.1. Detekcija izolata poznatim protokolima	44
3.2.2. Dizajniranje novih početnica i proba.....	46
3.2.3. Optimizacija koncentracija početnica i proba za višestruki RT-qPCR	47
3.2.4. Određivanje optimalnog volumena uzorka izoliranog metodom GES za detekciju metodama RT-PCR i PCR	48

3.2.5. Usporedba osjetljivosti i učinkovitosti novih protokola detekcije korištenjem različitih metoda izolacije nukleinskih kiselina	49
3.3. Istraživanje sezonske dinamike virusa u vinovoj lozi	49
3.4. Istraživanje rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u Hrvatskoj.....	50
3.5. Sekvenciranje novootkrivenih izolata virusa i filogenetske analize	55
3.6. Utvrđivanje načina prijenosa	57
3.6.1. Testovi prijenosa ličinkama lozine štitaste uši (<i>Planococcus ficus</i> Sign.).....	57
3.6.2. Testovi prijenosa mehaničkom inokulacijom	60
3.6.3. Testovi prijenosa sjemenom vinove loze	61
3.6.4. Testovi prijenosa cijepljenjem „na zrelo“.....	62
3.6.5. Testovi prijenosa cijepljenjem „zeleno na zrelo“	63
4. REZULTATI.....	64
4.1. Izolacija nukleinskih kiselina	64
4.2. Razvoj molekularnih metoda detekcije	64
4.2.1. Detekcija izolata poznatim protokolima	64
4.2.2. Dizajniranje novih početnica i proba	65
4.2.3. Optimiranje koncentracije početnica i proba za višestruki RT-qPCR	67
4.2.4. Određivanje optimalnog volumena uzorka izoliranog metodom GES za detekciju metodama RT-PCR i PCR	71
4.2.5. Osjetljivost i efikasnost razvijenih protokola detekcije s obzirom na različite metode izolacije nukleinskih kiselina	72
4.3. Sezonska dinamika virusa u zaraženoj vinovoj lozi	77
4.4. Rasprostranjenost u Hrvatskoj.....	83
4.5. Sekvenciranje i filogenetske analize	89
4.6. Prijenos istraživanih virusa.....	97
4.6.1. Prijenos ličinkama lozine štitaste uši (<i>Planococcus ficus</i> Sign.).....	97
4.6.2. Prijenos mehaničkom inokulacijom	98
4.6.3. Prijenos sjemenom vinove loze	99
4.6.4. Prijenos cijepljenjem „na zrelo“	99
4.6.5. Prijenos cijepljenjem „zeleno na zrelo“	100
5. RASPRAVA	103
5.1. Osjetljivost i učinkovitost novih molekularnih metoda detekcije	103
5.2. Rasprostranjenost i filogenetika istraživanih virusa	109
5.3. Prijenos i alternativni domaćini istraživanih virusa.....	113
6. ZAKLJUČCI	119
7. POPIS LITERATURE	120

ŽIVOTOPIS AUTORA	146
PRILOZI	148

Popis kratica

(-)ssRNA	negative single-stranded RNA (negativna jednolančana RNA)
(+)ssRNA	positive single-stranded RNA (pozitivna jednolančana RNA)
18S rRNA	18S ribosomska RNA
aa	amino acid (nukleinska kiselina)
AAP	acquisition access period (razdoblje akvizicije)
AlkB	alkane hydroxylase (alkan hidroksilaza)
ANOVA	analysis of variance (analiza varijance)
BIC	Bayesian information criterion (Bayesov informacijski kriterij)
BLASTn/x	Basic local alignment search tool – nucleotide/x (osnovni alat za pretraživanje poravnatih sekvenci – nukleotid/x)
bp	baznih parova
BSA	bovine serum albumin (goveđi serumski albumin)
CB	corky bark (plutavost kore)
cDNA	complementary DNA (komplementarna DNA)
CP	coat protein (kapsidni protein)
Cq	cycle quantification (ciklus kvantifikacije)
CTAB	cetyltrimethylammonium bromide (cetilmetilamonijev bromid)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoksiribonukleinska kiselina)
dNTP	deoxynucleoside triphosphate (deoksinukleozid trifosfat)
dsDNA	double-stranded DNA (dvolančana DNA)
dsDNA-RT	reverse transcribing double-stranded DNA viruses (dvolančani DNA virusi s reverznom transkripcijom)
dsRNA	double-stranded RNA (dvolančana RNA)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etilendiamintetraoctena kiselina)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (imunoenzimska metoda na čvrstoj fazi)
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization (Europska i mediteranska organizacija za zaštitu bilja)
G	gama raspodjela
GES	glycine-EDTA-sodium (glicin-EDTA-natrij)
GLD	grapevine leafroll disease (bolest uvijenosti lista vinove loze)
ha	hectare (hektar)
Hel	helicase (helikaza)
HTS	high-throughput sequencing (sekvenciranje visoke protočnosti)
IAP	inoculation access period (razdoblje inokulacije)

ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Međunarodno vijeće za taksonomiju virusa)
ICVG	International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (Međunarodno vijeće za proučavanje viroza i virozama sličnih bolesti vinove loze)
kbp	tisuću baznih parova
KH ₂ PO ₄	kalijev hidrogenfosfat
KSG	Kober stem grooving (užljebljenost drveta podloge Kober)
LNSG	LN 33 stem grooving (naboranost drveta podloge LN 33)
ML	maximum likelihood (najveća vjerojatnost)
MP	movement protein (protein za pokretanje)
mRNA	messenger RNA (glasnička RNA)
Mtr	methyltransferase (metiltransferaza)
Na ₂ CO ₃	natrijev karbonat
Na ₂ HPO ₄	natrijev hidrogenfosfat
NaCl	natrijev klorid
NaHCO ₃	natrijev hidrogenkarbonat
NaOH	natrijev hidroksid
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Nacionalni centar za biotehnoške informacije)
NCGR	National Clonal Germplasm Repository (Nacionalni repozitorij klonske germplazme)
nt	nucleotide (nukleotid)
nts	nucleotides (nukleotidi)
NJ	neighbor-joining (sparivanje susjeda)
OIV	International Organisation of Vine and Wine (Međunarodna organizacija za lozu i vino)
ORF	open reading frame (otvoreni okvir čitanja)
PCR	polymerase chain reaction (lančana reakcija polimerazom)
Pep A3	cauliflower mosaic virus peptidase (peptidaza virusa mozaika cvjetače)
PPM	plant preservative mixture (mješavina za zaštitu biljaka)
PVP	polivinilpirolidone (polivinilpirolidon)
qPCR	quantitative polymerase chain reaction (kvantitativna lančana reakcija polimerazom)
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase (RNA-ovisna RNA-polimeraza)
RLD	Roditis leaf discoloration (diskoloracija lista sorte Roditis)
RLT	RNeasy lysis buffer (RNeasy pufer za lizu)

RNA	ribonucleic acid (ribonukleinska kiselina)
RNase H	ribonuclease H (ribonukleaza H)
RNaza A	ribonukleaza A
rpm	revolution per minute (okretaja u minuti)
rRNA	ribosomal RNA (ribosomska RNA)
RT	reverse transcriptase (reverzna transkriptaza)
RT-PCR	reverse-transcription polymerase chain reaction (lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije)
RW	rugose wood (naboranost drveta)
RW1	RNeasy washing buffer 1 (RNeasy pufer za ispiranje 1)
SDS	sodium dodecyl sulfate (natrijev dodecil-sulfat)
sgRNA	subgenomic RNA (subgenomska RNA)
SOD	superoxide dismutase (superoksid dismutaza)
SZAF	Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet
T3	Tamura-3-parameter model
TaqDNA	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase (DNA-polimeraza iz <i>Thermus aquaticus</i>)
TBE	tris-borat-EDTA
TNA	total nucleic acids (ukupne nukleinske kiseline)
tRNA	transfer RNA (prijenosna RNA)
VIRD	virus-induced rootstock decline (virusima inducirano odumiranje podloge)
VRSP	<i>Vitis rupestris</i> stem-pitting (naboranost drveta podloge <i>V. rupestris</i>)
Zn-finger	zinc finger proteins (proteini s cinkovim „prstom“)
ΔR_n	povećanje fluorescencije

Popis akronima virusa

ALSV	apple latent spherical virus (latentni sferični virus jabuke)
ArMV	arabis mosaic virus (virus mozaika gušarke)
ATLV	Agava tequilana leaf virus (virus lista <i>Agava tequilana</i>)
BSMYV	banana streak MY virus (MY virus crtičavosti banane)
CarMV	carnation mottle virus (virus išaranosti karanfila)
CiYMV/CYMV	citrus yellow mosaic virus (virus žutog mozaika citrusa)
CSSV	cacao swollen shoot virus (virus zadebljanih izbojaka kakaovca)
DBSNV	Dioscorea bacilliform SN virus (Dioscorea baciliformni SN virus)
FBV-1	fig badnavirus 1 (badnavirus smokve 1)
GBV-1	grapevine badnavirus 1 (badnavirus vinove loze 1)
GCMV	grapevine chrome mosaic virus (virus kromiranog mozaika vinove loze)
GFkV	grapevine fleck virus (virus pjegavosti vinove loze)
GFLV	grapevine feanleaf virus (virus lepezastog lista vinove loze)
GLRaV-1, -2, -3, -4,	grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3, 4 (uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, 2, 3, 4)
GPGV	grapevine Pinot gris virus (virus Pinota sivog)
GRBV	grapevine red blotch virus (virus crvenih mrlja vinove loze)
GRLDaV	grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (virus povezan s diskoloracijom lista sorte Roditis)
GRSPaV	grapevine Rupestris stem pitting-associated virus (virus povezan s naboranosti drveta podloge <i>Rupestris</i>)
GSyV-1	grapevine Syrah virus 1 (virus Syraha 1)
GVA	grapevine virus A (A-virus vinove loze)
GVB	grapevine virus B (B-virus vinove loze)
GVCV	grapevine vein clearing virus (virus prosvjetljivanja žila vinove loze)
GVD	grapevine virus D (D-virus vinove loze)
GVE	grapevine virus E (E-virus vinove loze)
GVF	grapevine virus F (F-virus vinove loze)
GVFV	grapevine vein feathering virus (virus rasperjanih žila vinove loze)
GVG	grapevine virus G (G-virus vinove loze)

GVH	grapevine virus H (H-virus vinove loze)
GVI	grapevine virus I (I-virus vinove loze)
GVJ	grapevine virus J (J-virus vinove loze)
GVK	grapevine virus K (K-virus vinove loze)
GVL	grapevine virus L (L-virus vinove loze)
GVM	grapevine virus M (M-virus vinove loze)
GVN	grapevine virus N (N-virus vinove loze)
GVO	grapevine virus O (O-virus vinove loze)
HLV	heracleum latent virus (latentni virus šapike)
PYMV	piper yellow mottle virus (virus žutog šarenila papra)
RpRSV	raspberry ringspot virus (virus prstenaste pjegavosti kupine)
SCBV	sugarcane bacilliform virus (baciliformni virus šećerne trske)
TaBV	taro bacilliform virus (baciliformni virus tara)
ToRS	tomato ringspot virus (virus prstenaste pjegavosti rajčice)

Popis slika

- Slika 2.1. Vinogradarske regije Hrvatske. Izvor: Vina Croatia, 2023. Udruženje vinarstva HGK (<https://vinacroatia.hr/en/promo-materials/wine-map-of-croatia/>; pristup: 20.10.2022).9
- Slika 2.2. Simptomi četiri virusna kompleksa na vrstama roda *Vitis*: asimptomatski list – lijevo, uvijenost i crvenilo lista – desno (A) te slaba obojenost grožđa crne sorte vinove loze uzrokovana infekcijom virusa iz GLD skupine (B); plutavost kore vrste *V. labrusca* sorte 'Niagara Rosada' (C) i naboranost drveta podloge Paulsen 1103 (D) uzrokovana virusima iz RW skupine (asimptomatska podloga – lijevo); simptomi infektivne degeneracije uzrokovane virusom lepezastog lista vinove loze – GFLV (E); pjegavost lista uzrokovana infekcijom virusom iz istoimenog kompleksa na vrsti *V. rupestris* St. George (F) (prema Basso i sur., 2017).16
- Slika 2.3. Filamentozne čestice GVA nalik na uže snimljene elektronskim mikroskopom. Oznaka predstavlja veličinu jednaku 100 nm (prema du Preez i sur., 2011).20
- Slika 2.4. Organizacija i ekspresija genoma GVA s relativnim pozicijama otvorenih okvira čitanja (ORF), njihovim transkripcijskim produktima i subgenomskim molekulama RNA. Kratice: Mtr–metiltransferaza; AlkB–alkan hidroksilaza; Hel–helikaza; RdRp–RNA-ovisna RNA-polimeraza; MP–protein za pokretanje; CP–kapsidni protein. Izvor: ICTV, 2023. International Committee on Taxonomy of Viruses. Family: *Betaflexiviridae* (https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae; pristup 03.10.2022.).21
- Slika 2.5. Rasprostranjenost GVA u svijetu (označeno crveno). Izvor: CABI, 2023. Centre for Agriculture and Bioscience International. Grapevine virus A (grapevine closterovirus) (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/26189#toDistributionMaps>; pristup: 03.10.2022.).22
- Slika 2.6. Simptomi virusnih bolesti na vinovoj lozi povezani s vitivirusima: simptomi plutavosti drveta na podlozi LN 33 (A); naboranost i užljebljenja na drvetu podloge (nakon skidanja kore) ispod cijepljenog mjesta (B); simptomi bolesti Syraha (SD) na vinovoj lozi sorte 'Merlot' pred kraj vegetacijske sezone (C) (prema Minafra i sur., 2017).24
- Slika 2.7. Filogenetsko stablo konstruirano statističkom metodom sparivanja susjeda (NJ) na osnovi nukleotidnih sekvenci GVG izolata podrijetlom iz SAD-a (PI8938, PI8936, PI8932, CH8935), Novog Zelanda (MF405924, MF405923, MF405925) i Hrvatske (MF993574, MF781081, MF993573, MF993575) u regiji genoma kapsidnog proteina (CP; 507 nukleotida). Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu (prema Diaz-Lara i sur., 2019).26

Slika 2.8. Elektronska mikrografija tipičnih baciliformnih čestica badnavirusa na primjeru MY virusa crtičavosti banane (eng. banana streak MY virus, BSMYV). Izvor: ICTV, 2023. International Committee on Taxonomy of Viruses. Family: <i>Caulimoviridae</i> . (https://ictv.global/report/chapter/caulimoviridae/caulimoviridae ; pristup: 04.10.2022.)	28
Slika 2.9. Prikaz organizacije genoma badnavirusa na primjeru badnavirusa vinove loze 1 (GBV-1; VLJ-178 – MF781082). Prikazana je virusna DNA (crna linija) s pozicijama otvorenih okvira čitanja (ORF) te funkcionalnim motivima (obojeno) u ORF2 poliproteinu. Kratice: RNase H–ribonukleaza H; RT–reverzna transkriptaza; Pep A3–peptidaza virusa mozaika cvjetače; Zn-finger–protein s cinkovim „prstom“ (prema Vončina i Almeida, 2018).	28
Slika 2.10. Simptomi bolesti prosvjetljivanja žila i odumiranja vinove loze koju uzrokuje GVCV: prosvjetljivanje žila (A) i nekrotična pjegavost na starim listovima (B) vrste <i>V. rupestris</i> ; prosvjetljivanje žila sa žućenjem na sorti 'Vidal Blanc' (C); prosvjetljivanje žila i deformacija lista na sorti 'Cabernet Sauvignon' (D) (prema Qiu i Schoelz, 2017).	30
Slika 2.11. Simptomi diskoloracije lista sorte 'Roditis' (RLD) uzrokovanih badnavirusom GRLDaV: simptomi bolesti na listovima (A – C); simptomi bolesti na grozdovima (D i E). Desni grozd (D) pripada nezaraženoj biljci (prema Maliogka i sur., 2015b).	32
Slika 2.12. Rasprostranjenost GRLDaV u svijetu (označeno crveno – nije označena JAR). Izvor: CABI, 2023. Centre for Agriculture and Bioscience International. Grapevine Roditis leaf discoloration associated virus (https://www.cabi.org/isc/datasheet/11285332#toDistributionMaps ; pristup: 05.10.2022.).	33
Slika 2.13. Filogenetsko stablo pripadnika roda <i>Badnavirus</i> , konstruirano statističkom metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju nukleotidnih sekvenci RT/RNaza H regije genoma, pokazuje pozicioniranje GBV-1 izolata VLJ-178 (MF81082) u zasebnu grupu od ostalih badnavirusa koji inficiraju vinovu lozu – posebno naznačen hrvatski GRLDaV izolat VLJ-178 (MF991952) utvrđen u istoj lozi u koinfekciji s GBV-1. Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu (prema Vončina i Almeida, 2018).	34
Slika 2.14. Stereomikroskopski prikaz (povećanje 150X) odrasle ženke (lijevo) i mužjaka (desno) lozine štitaste uši (<i>Planacoccus ficus</i> Sign.), dokazanog vektora virusa vinove loze iz rodova <i>Vitivirus</i> , <i>Ampelovirus</i> i <i>Badnavirus</i> . Oznaka označava veličinu 1 mm.	39
Slika 3.1. Koraci u provedbi izolacije TNA pomoću metode GES: homogenizirani biljni materijal u ekstrakcijskom puferu u mikroepreveti volumena 2 mL (A); suspenzija supernatanta i GES pufera u mikroepreveti volumena 0,2 mL (B); mikroeprevete (0,2 mL) s uzorcima u uređaju Mastercycler neposredno prije denaturacije (C).	44

- Slika 3.2. Mjesta uzorkovanja po županijama u Hrvatskoj u blizini kojih su sakupljeni uzorci vinove loze za potrebe utvrđivanja rasprostranjenosti istraživanih virusa: zelene oznake – Požeško-slavonska: 1–Velika, 2–Kutjevo; crna oznaka – Sisačko-moslavačka: Popovača; crvena oznaka – Krapinsko-zagorska: Sveti Križ Začretje; ljubičaste oznake – Zagrebačka: 1–Plešivica, 2–Marija Gorica, 3–Velika Gorica; plava oznaka – Zagreb; tirkizna oznaka – Istarska: Poreč; siva oznaka – Primorsko-goranska: otok Krk; tamnoplava oznaka – Ličko-senjska: otok Pag; narančasta oznaka – Zadarska: 1–otok Rava, 2–Zadar, 3–Poličnik, 4–Benkovac, 5–otok Pag, 6–Nin, 7–Zemunik; tamno-zelena oznaka – Šibensko-kninska: Primošten; žute oznake – Splitsko-dalmatinska: 1–Kaštela, 2–Split, 3–Imotski, 4–Podbablje, 5–Proložac, 6–Runovići, 7–otok Hvar, 8–otok Vis, 9–otok Šolta; smeđe oznake – Dubrovačko-neretvanska: 1–Pelješac, 2–Konavle.....55
- Slika 3.3. Test biljke snimljene u stadiju 3 – 5 pravih listova u fazi akvizicije vektora (lijevo) i u odraslom stadiju u fazi inkubacije (desno): sjemenjak vinove loze sorte 'Grk' x 'Panonia' (A); zeljaste test biljke *Chenopodium murale* (B) i *Nicotiana benthamiana* (C); korovne vrste *Amaranthus retroflexus* (D) *Ambrosia artemisifolia* (E), *Chenopodium album* (F) i *Galinsoga parviflora* (G).....58
- Slika 3.4. Prikaz ličinke lozine štitaste uši (*Planococcus ficus*) u različitim fazama testova prijenosa: ličinka prvog stadija u usporedbi s dlačicama kista snimljena pod stereomikroskopom (povećanje 200X) prije akvizicijskog razdoblja (A); ličinka prvog stadija snimljena pod stereomikroskopom (povećanje 250X) u fazi akvizicije na naličju lista vinove loze uz glavnu žilu (B); ličinke prvog i drugog stadija tijekom inokulacijskog razdoblja na licu lista vrste *Ambrosia artemisifolia* (C).59
- Slika 3.5. Prikaz provedbe prijenosa virusa mehaničkom inokulacijom: određivanje mase zaraženog biljnog materijala na analitičkoj vagi (A); dodatak inokulacijskog pufera u tarionik s odvaganim biljnim materijalom (B); homogenizacija biljnog materijala uz pomoć tučka (C); nanošenje abrazivnog praha na lice lista bezvirusnog sjemenjaka vinove loze (D); utrljavanje homogenata na plojku lista (E); ispiranje lista s destiliranom vodom (F).61
- Slika 3.6. Prikaz postupka uzgoja sjemenjaka iz sjemena sakupljenog od biljke vinove loze zaražene s GVG: grozd sorte 'Žlahtina' u fiziološkoj zrelosti (A); izdvojeno i osušeno sjeme (B); sjemenke potopljene u otopinu PPM neposredno prije sjetve (C); sjetva sjemena u poliesterske kontejnere napunjene supstratom (D); sjemenjak vinove loze u optimalnoj fazi za testiranje (3 – 5 razvijenih listova).....62
- Slika 3.7. Postupak provedbe metode cijepjenja „zeleno na zrelo“: umetanje zaraženog pupa vinove loze pod koru ukorijenjenog indikatora tehnikom okuliranja na T-spoj (A); omatanje cijepljenog mjesta parafilmom (B); izboj izrastao iz nacijepljenog pupa 30 dana nakon cijepjenja (C).63

- Slika 4.1. Vizualizacija PCR produkata na agaroznom gelu umnoženih metodom RT-PCR korištenjem parova početnica F13/R13 (500 baznih parova) za GVG u regiji genoma kapsidnog proteina (CP) (A) te metodom PCR korištenjem para početnica F2/R2 (731 baznih parova) za GBV-1 u regiji genoma poliproteina (B). Oznake: M–DNA ljestvica (GelPilot Mid Range Ladder); P–pozitivna kontrola; 1–izolat VVL-150 (A) i VG-102 (B); 2 – 12–uzorci negativni na istraživane viruse; N–negativna kontrola.64
- Slika 4.2. Odabrane regije genoma za sintezu početnica i proba na osnovu CP regije za GVG (A) te RT regije za GBV-1 (B). Grafički prikaz je pripremljen korištenjem MEGA 11 programa. Isprekidana linija predstavlja izrezani dio CP, odnosno RT regije genoma.66
- Slika 4.3. Prikaz raspona amplifikacijskih krivulja u tri repeticije u odnosu na granicu detekcije (eng. *threshold*) – 0,040, u postupku optimiranja koncentracija početnica i probe u detekciji GVG metodom RT-qPCR. Detekcija uz promjenu koncentracija početnica (uzvodnih i nizvodnih) u odnosu na konstantnu koncentraciju probe od 250 nM (A), detekcija uz promjenu koncentracija probe u odnosu na konstantu koncentraciju početnica od 400 nM (uzvodnih i nizvodnih) (B) te detekcija uz promjenu koncentracije uzvodnih i nizvodnih početnica u odnosu na 150 nM koncentracije probe (C). Oznake: ΔR_n –povećanje fluorescencije; N–negativna kontrola.68
- Slika 4.4. Prikaz raspona amplifikacijskih krivulja u tri repeticije u odnosu na granicu detekcije (eng. *threshold*) – 0,073, u postupku optimiranja koncentracija početnica i probe u detekciji 18S rRNA metodom RT-qPCR. Detekcija uz promjenu koncentracija početnica (uzvodnih i nizvodnih) u odnosu na konstantnu koncentraciju probe od 250 nM (A), detekcija uz promjenu koncentracija probe u odnosu na konstantu koncentraciju početnica od 400 nM (uzvodnih i nizvodnih) (B) te detekcija uz promjenu koncentracije uzvodnih i nizvodnih početnica u odnosu na 150 nM koncentracije probe (C). Oznake: ΔR_n –povećanje fluorescencije; N–negativna kontrola.69
- Slika 4.5. Prikaz raspona amplifikacijskih krivulja u tri repeticije u odnosu na granicu detekcije (eng. *threshold*) – 0,051, u postupku optimiranja koncentracija početnica i probe u detekciji GBV-1 metodom RT-qPCR. Detekcija uz promjenu koncentracija početnica (uzvodnih i nizvodnih) u odnosu na konstantnu koncentraciju probe od 250 nM (A), detekcija uz promjenu koncentracija probe u odnosu na konstantu koncentraciju početnica od 400 nM (uzvodnih i nizvodnih) (B) te detekcija uz promjenu koncentracije uzvodnih i nizvodnih početnica u odnosu na 150 nM koncentracije probe (C). Oznake: ΔR_n –povećanje fluorescencije; N–negativna kontrola.70
- Slika 4.6. Amplifikacijske krivulje dobivene detekcijom GVG, 18S rRNA i GBV-1 primjenom optimiranog protokola za višestruki RT-PCR u stvarnom vremenu (višestruki RT-qPCR). Pokus je izvedbe u tri repeticije. Oznaka: ΔR_n –povećanje fluorescencije.71

- Slika 4.7. Produkti detekcije GVG metodom RT-PCR u regiji genoma kapsidnog proteina (CP; 606 baznih parova) (A) i detekcije GBV-1 metodom PCR u regiji genoma reverzne transkriptaze (RT; 419 baznih parova) (B), pri korištenju raspona volumena uzorka TNA dobivenog metodom GES. Oznake: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); 0,2 – 1,4 – volumen TNA (u μL) u reakcijskoj smjesi od 10 μL72
- Slika 4.8. Usporedba osjetljivosti metoda RT-qPCR i RT-PCR u detekciji GVG temeljenim na RNA izoliranoj korištenjem kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen): 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:100 000–deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja RNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshold*-crvena linija, 0,018181) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔR_n –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost RT-qPCR protokola: Cq–ciklus kvantifikacije; R^2 –determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (606 baznih parova) dobiveni metodom RT-PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu; M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.73
- Slika 4.9. Usporedba osjetljivosti metoda RT-qPCR i RT-PCR u detekciji GVG temeljenim na TNA izoliranoj korištenjem metode GES: 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:100 000–deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja TNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshold*-crvena linija, 0,030077) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔR_n –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost RT-qPCR protokola: Cq–ciklus kvantifikacije; R^2 –determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (606 baznih parova) dobiveni metodom RT-PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.....74
- Slika 4.10. Usporedba osjetljivosti metoda qPCR i PCR u detekciji GBV-1 temeljenim na DNA izoliranoj korištenjem kompleta DNeasy Plant Mini Kit: 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:10 000 000–deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja DNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshold*-plava linija, 0,111336) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔR_n –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost qPCR protokola: Cq–ciklus kvantifikacije; R^2 –determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (419 baznih parova) dobiveni metodom konvencionalnog PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.75
- Slika 4.11. Usporedba osjetljivosti metoda qPCR i PCR u detekciji GBV-1 temeljenim na TNA izoliranoj korištenjem metode GES: 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:100 000–

deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja TNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshol*d-plava linija, 0,09573) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔR_n –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost qPCR protokola: C_q–ciklus kvantifikacije; R²–determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (419 baznih parova) dobiveni metodom PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.

.....76

Slika 4.12. Rasprostranjenost GVG (A) i GBV-1 (B) prikazana prema pojavnosti po županijama u Hrvatskoj; 1–Požeško-slavonska; 2–Sisačko-moslavačka; 3–Krapinsko-zagorska, 4–Zagrebačka; 5–Grad Zagreb; 6–Istarska; 7–Primorsko-goranska; 8–Ličko-senjska; 9–Zadarska; 10–Šibensko-kninska; 11–Splitsko-dalmatinska; 12–Dubrovačko-neretvanska. Županije označene bijelom bojom nisu bile uključene u istraživanje.88

Slika 4.13. Vizualizacija RT-PCR produkata (606 baznih parova) na 1,5 % agaroznom gelu od 35 GVG izolata odabranih za sekvenciranje u regiji genoma kapsidnog proteina (CP). Oznake: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus DNA Ladder, Qiagen, Hilden, Njemačka); 1 – 35–GVG izolati; P–pozitivna kontrola; N–negativna kontrola; *–nesekvencirani izolat.

.....89

Slika 4.14. Matrica procjene evolucijske udaljenosti, po modelu p-udaljenosti na osnovi nukleotidnih sekvenci unutar regije genoma kapsidnog proteina (564 nukleotida), između 37 hrvatskih GVG izolata utvrđenih ovim istraživanjem i sedam izolata preuzetih iz baze GenBank. Podudaranje na razini nukleotida – ispod dijagonale; podudaranje na razini aminokiselina – iznad dijagonale. Izolati podrijetlom iz Novog Zelanda označeni su imenom izolata i pripadajućim pristupnim brojem u bazi GenBank, dok su hrvatski izolati označeni mjestom, položajem, sortom i rednim brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.90

Slika 4.15. Filogenetsko stablo, konstruirano statističkom metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parameter modelu nukleotidne supstitucije i gama raspodjeli (T3 + G), prikazuje 37 GVG izolata utvrđenih ovim istraživanjem (dva izolata sekvenciranih metodom HTS – VVL-150 i VM-160 i 35 izolata sekvenciranih Sangerovom metodom) te 11 izolata preuzetih iz baze GenBank, na osnovi nekletidnih sekvenci unutar regije genoma kapsidnog proteina (CP; 564 nukleotida). Prikazana je podržanost ogranaka veća od 50 %. Izolati opisani ovim istraživanjem označeni su mjestom, položajem, sortom i brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pripadajućim pristupnim brojem u bazi GenBank. Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu. Oznake: 1 – 5–filogenetske grupe.....92

- Slika 4.16. Vizualizacija PCR produkata (419 baznih parova) na 1,5 % agaroznom gelu od 50 GBV-1 izolata odabranih za sekvenciranje u regiji genoma reverzne transkriptaze (RT). Oznake: M–DNA ljestvica (GelPilot 100 bp Plus Ladder, Qiagen, Hilden, Njemačka); 1 – 50–različiti GBV-1 izolati; N–negativna kontrola.....93
- Slika 4.17. Matrica procjene evolucijske udaljenosti, po modelu p-udaljenosti na osnovi nukleotidnih sekvenci unutar regije genoma reverzne transkriptaze (RT; 375 baznih parova), između 54 GBV-1 izolata utvrđenih ovim istraživanjem i izolata VLJ-178 preuzetog iz baze GenBank. Podudaranje na razini nukleotida – ispod dijagonale; podudaranje na razini aminokiselina – iznad dijagonale. Izolati su označeni mjestom, položajem, sortom i rednim brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.94
- Slika 4.18. Filogenetsko stablo, konstruirano statističkom metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parameter modelu nukleotidne supstitucije i gama raspodjeli (T3 + G), prikazuje 54 GBV-1 izolata utvrđenih ovim istraživanjem te izolat VLJ-178 preuzet iz baze GenBank, na osnovi nukleotidnih sekvenci unutar regije genoma reverzne transkriptaze (RT; 375 nukleotida). Prikazana je podržanost ogranaka veća od 50 %. Izolati su označeni mjestom, položajem, sortom i brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank. Za ukorjenjivanje stabla korišten je GRLDaV izolat w4. Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu.....96
- Slika 4.19. Različiti simptomi na listovima drvenastih indikatora (Kober 5BB i LN 33) i vinove loze ('Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon') inficiranih s GVG i GLRaV-3 pet mjeseci nakon provedbe cijepljenja „zeleno na zrelo“, s izuzetkom indikatora 110 Richter koji je bez simptoma. Na pripadajućim centralnim cilindrima kambija nisu uočene promjene koje bi upućivale na virusnu infekciju.102

Popis tablica

Tablica 2.1. Popis virusa vinove loze, njihovih karakteristika te bolesti koje uzrokuju (prema Fuchs, 2020).	13
Tablica 3.1. Početnice korištene za detekciju GVG i GBV-1 u svrhu otkrivanja novih izolata za razvoj novih i pouzdanijih molekularnih metoda detekcije.	45
Tablica 3.2. GVG i GBV-1 izolati preuzeti iz baze GenBank te korišteni u dizajniranju novih početnica i proba za molekularne metode detekcije.....	47
Tablica 3.3. Popis uzoraka vinove loze sakupljenih za potrebe istraživanja rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u Republici Hrvatskoj.....	51
Tablica 4.1. Sekvence novodizajniranih početnica i proba korištene u različitim izvedbama metode PCR za detekciju istraživanih virusa.	65
Tablica 4.2 Rezultati istraživanja rasprostranjenosti GVG u Hrvatskoj prema lokacijama uzorkovanja, tipu nasada (komercijalni vinograd–V, kolekcijski nasad–K) i sortama. ...	84
Tablica 4.3. Rezultati istraživanja rasprostranjenosti GBV-1 u Hrvatskoj prema lokacijama uzorkovanja, tipu nasada (komercijalni vinograd–V, kolekcijski nasad–K) i sortama. ...	85
Tablica 4.4. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 na zeljaste test biljke, korove i sjemenjake vinove loze korištenjem ličinki lozine štitaste uši (<i>Planococcus ficus</i>) prvog i drugog razvojnog stadija.....	97
Tablica 4.5. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 na sjemenjake vinove loze, zeljaste test biljke i korove mehaničkom inokulacijom korištenjem tri različita inokulacijska pufera. Oznake: P–fosfatni pufer; N–nikotinski pufer; P-N-C–fosfat-nikotin-cisteinski pufer.	98
Tablica 4.6. Rezultati prijenosa istraživanih virusa sjemenom vinove loze. Prisutnost virusa provjerena je metodom višestrukog RT-qPCR.....	99
Tablica 4.7. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 cijepljenjem zaražene plemke vinove loze na podlogu američkih vrsta i hibrida. Uspješnost prijenosa provjerena je metodom višestrukog RT-qPCR.....	100
Tablica 4.8. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 cijepljenjem „zeleno na zrelo“ korištenjem drvenastih indikatora i vinove loze. Uspješnost prijenosa provjerena je metodom višestrukog RT-qPCR.....	101

Popis grafikona

- Grafikon 2.1. Proizvodnja grožđa prema namjeni u vodećim vinogradarskim zemljama u 2021. godini. Oznaka mt–milijuna tona. Izvor: OIV, 2022. International Organisation of Wine and Vine. State of the world vine and wine sector 2021 (https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Annual_Assessment_of_the_World_Vine_and_Wine_Sector_in_2021.pdf; pristup: 15.01.2023).7
- Grafikon 4.1. Sezonska dinamika GVG (puna linija) i 18S rRNA (isprekidana linija) iskazana kroz vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet zaraženih biljaka sorte 'Vlaška' (VVL) tijekom 16 datuma uzorkovanja u 2019. godini. Različiti datumi predstavljaju 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala korištenog za izolaciju TNA: mladice–ružičasto područje, peteljke bazalnih listova–neobojeno područje, rozgva–sivo područje.77
- Grafikon 4.2. Box-plot dijagrami vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) za GVG (A) i 18S rRNA (B) dobivene metodom RT-qPCR u 16 različitih datuma uzorkovanja biljaka sorte 'Vlaška' (VVL) u 2019. godini. Prikazane su najmanje i najveće Cq vrijednosti (okomite linije), prva i treća kvartila Cq vrijednosti (pravokutnici) te njihove medijane (vodoravne linije). Statistički signifikantne srednje (aritmetička sredina) Cq vrijednosti za GVG i 18S rRNA prema varijantama datuma uzorkovanja označene su različitim slovima (a, b, c, d, e, f, g, h, i), a utvrđene su analizom varijance (ANOVA) i Tukey testom na razini $p < 0,05$79
- Grafikon 4.3. Box-plot dijagram vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) za GVG dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet biljaka sorte 'Vlaška' (VVL) u 16 različitih datuma uzorkovanja u 2019. godini. Prikazane su najmanje i najveće Cq vrijednosti (okomite linije), prva i treća kvartila Cq vrijednosti (pravokutnici) te njihove medijane (vodoravne linije). Statistički signifikantne srednje (aritmetička sredina) Cq vrijednosti za GVG prema varijantama testiranih biljaka označene su različitim slovima (a, b), a utvrđene su analizom varijance (ANOVA) i Tukey testom na razini $p < 0,05$80
- Grafikon 4.4. Sezonska dinamika GBV-1 iskazana kroz vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet zaraženih biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC) tijekom 16 datuma uzorkovanja u 2019. godini. Različiti datumi predstavljaju 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala za izolaciju TNA: mladice–ružičasto područje, peteljke bazalnih listova–neobojeno područje, rozgva–sivo područje.....81
- Grafikon 4.5. Box-plot dijagram vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) za GBV-1 dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC) u 16 različitih datuma uzorkovanja u 2019. godini. Prikazane su najmanje i najveće Cq vrijednosti (okomite linije), prva i treća kvartila Cq vrijednosti (pravokutnici) te njihove medijane

(vodoravne linije). Statistički signifikantne srednje (aritmetička sredina) Cq vrijednosti za GBV-1 prema varijantama testiranih biljaka označene su različitim slovima (a, b, c, d), a utvrđene su analizom varijance (ANOVA) i Tukey testom na razini $p < 0,05$	82
Grafikon 4.6. Broj biljaka autohtonih sorata zaraženih s GVG i GBV-1 te onih bez virusa uzorkovanih u komercijalnim vinogradima priobalne Hrvatske. U zagradama je naznačen broj različitih lokacija/vinograda s kojih su sakupljeni uzorci peteljki listova za testiranje metodom višestrukog RT-qPCR.	87

Popis priloga

Prilog 1. Spektrofotometrijska očitavanja koncentracije i čistoće izolirane RNA i DNA iz rozgvi (R) i peteljki listova (P) biljaka podrijetlom iz zbirke virusa vinove loze (SZAF).	148
Prilog 2. Sekvence GVG izolata utvrđene metodom HTS u okviru provedenog istraživanja.	152
Prilog 3. Sekvence GBV-1 izolata utvrđene metodom HTS u okviru provedenog istraživanja.	156
Prilog 4. Cq vrijednosti dobivene metodom RT-qPCR za GVG (gore) i 18S rRNA (dolje) testiranjem pet zaraženih biljaka sorte Vlaška (VVL-112, VVL-113, VVL-114, VVL-122 i VVL-123) tijekom 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala (rozgve: 26.11. – 01.03.; mladice: 04.04.; peteljke: 18.05. – 13.11.) u vegetacijskoj sezoni 2019. godine, uključujući srednje vrijednosti aritmetičkih sredina, standardne devijacije i standardne pogreške aritmetičkih sredina. Najmanje Cq vrijednosti prema terminima uzorkovanja su označene crveno, a najveće zeleno.	164
Prilog 5. Cq vrijednosti dobivene metodom qPCR za GBV-1 testiranjem pet zaraženih biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC-022, PMC-235, PMC-245, PMC-282 i PMC-313) tijekom 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala (rozgve: 26.11. – 01.03.; mladice: 04.04.; peteljke: 18.05. – 13.11.) u vegetacijskoj sezoni 2019. godine, uključujući srednje vrijednosti aritmetičkih sredina, standardne devijacije i standardne pogreške aritmetičkih sredina. Najmanje Cq vrijednosti prema terminima uzorkovanja su označene crveno, a najveće zeleno.	165
Prilog 6. Usporedba djelomične nukleotidne sekvence gena kapsidnog proteina (CP, 564 nts) od 37 istraživanjem utvrđenih GVG izolata, referentnog izolata VID561 (NC_040616) te ostalih izolata preuzetih iz baze GenBank podrijetlom iz Novog Zelanda, Hrvatske i SAD-a (474 i 478 nts). Hrvatski izolati su prikazani po mjestu i lokaciji podrijetla u Hrvatskoj, pripadajućim imenima sorata, brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.	166
Prilog 7. Usporedba djelomične aminokiselinske sekvence gena kapsidnog proteina (CP, 187 aa) od 37 istraživanjem utvrđenih GVG izolata, referentnog izolata VID561 (NC_040616) te ostalih izolata preuzetih iz baze GenBank podrijetlom iz Novog Zelanda, Hrvatske i SAD-a (157 i 158 aa). Hrvatski izolati su prikazani po mjestu i lokaciji podrijetla u Hrvatskoj, pripadajućim imenima sorata, brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.	174

Prilog 8. Usporedba djelomične nukleotidne sekvence gena reverzne transkriptaze (RT, 375 nts) od 54 istraživanjem utvrđenih GBV-1 izolata i referentnog izolata VLJ-178 (NC_055481). Izolati su prikazani po mjestu i lokaciji podrijetla u Hrvatskoj, pripadajućim imenima sorata, brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.....177

Prilog 9. Usporedba djelomične aminokiselinske sekvence gena reverzne transkriptaze (RT, 124 aa) od 54 istraživanjem utvrđenih GBV-1 izolata i referentnog izolata VLJ-178 (NC_055481). Izolati su prikazani po mjestu i lokaciji podrijetla u Hrvatskoj, pripadajućim imenima sorata, brojem uzorkovanja u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.....182

1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najstarijih i najrasprostranjenijih kultiviranih biljnih vrsta u svijetu te ekonomski najvažnija voćna vrsta. Njen se plod – grožđe, osim za potrošnju u svježem ili suhom stanju, najčešće upotrebljava kao sirovina za proizvodnju vina. Prema Međunarodnoj organizaciji za lozu i vino (eng. *International Organization of Wine and Vine*, OIV), u svijetu je u 2021. godini proizvedeno 262 milijuna hektolitara vina, dok je globalna potrošnja procijenjena na 235 milijuna hektolitara (OIV, 2022). Temeljem velike potrošnje vina, ali i grožđa u svježem i suhom stanju, loza (*Vitis* sp.) – dominantno vinova loza (*V. vinifera*), smatra se trećom po redu ekonomski najvrjednijom poljoprivrednom kulturom (iza krumpira i rajčice), s vrijednošću proizvodnje grožđa od 68 milijardi američkih dolara (\$) u 2016. godini (Alston i Sambucci, 2019). Osim toga, vino se smatra gospodarski i ekonomski značajnim i visoko dohodovnim poljoprivrednim proizvodom s vrijednošću tržišta od približno 35 milijardi eura (€) u 2021. godini (OIV, 2022). Vinogradarstvo i vinarstvo u Hrvatskoj predstavlja važnu granu nacionalne ekonomije, a s obzirom na dugu i bogatu tradiciju proizvodnje, povoljne klimatske i pedološke uvjete te brojne autohtone sorte, Hrvatska se smatra vinogradarskom zemljom (Maletić i sur., 2015). Uspješan i rentabilan uzgoj vinove loze i proizvodnje grožđa u suvremenom svijetu ovisi, osim o povoljnim klimatskim uvjetima umjerenog pojasa, ponajprije o kontroli štetnika i bolesti koji nanose najveće ekonomske gubitke. Uzimajući u obzir navedeno, vinova loza je jedna od kultura u čijem se uzgoju troši najviše fungicida, što govori o njenoj izraženoj osjetljivosti na patogene, ali i o visokoj dohodovnoj vrijednosti proizvodnje čiji se gubitci nastoje svesti na najmanju moguću mjeru (Rantsiou i sur., 2020).

Pored brojnih gljivičnih i bakterijskih bolesti vinova loza može biti domaćin i različitim virusnim oboljenjima koje imaju negativan učinak na prinos i životni vijek trsa. Do danas je u vinovoj lozi identificirano 86 različitih vrsta virusa pridruženih u 18 porodica i 35 rodova, od kojih se mnogi smatraju ekonomski značajnim i široko rasprostranjenim patogenima (Fuchs, 2020; Martelli, 2018). S naglaskom na preventivne, i u nedostatku kurativnih mjera kontrole, ekonomski značajne viroze trenutno su jedan od najvećih izazova u uzgoju poljoprivrednih kultura koje se vegetativno razmnožavaju. Preventivne mjere kontrole temelje se na proizvodnji bezvirusnog certificiranog sadnog materijala i kontrolu vektora (kukci, grinje, nematode) (Maliogka i sur., 2015a). Certifikacijski protokoli za proizvodnju bezvirusnog materijala u EU regulirani su smjericama Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (eng. *European and Mediterranean Plant Protection Organization*, EPPO), prema dokumentu PM 4/8(2) – „Sadni materijal loznih sorti i podloga testiranog na patogene“ (EPPO, 2008). U prošlosti su takve smjernice bile temeljene na

rezultatima viroloških istraživanja koja su proizašla iz simptoma primijećenih na zaraženim biljkama. Prepoznate simptomatične biljke u nasadu bile su od presudne važnosti za daljnja istraživanja poput razvoja metoda detekcije i karakterizacije virusa, nakon kojih su dobiveni važni podaci za njihovu regulativu i uvrštavanje u EPPO smjernice. Sukladno navedenom, prvi korak u implementaciji mjera kontrole je precizna dijagnostika virusnih bolesti koja se prvotno temeljila na biološkim testovima, a danas se bazira na preciznim i visoko osjetljivim molekularnim metodama detekcije (Martelli i Boudon-Padieu, 2006). U posljednjem desetljeću su razvoj i implementacija novih metoda sekvenciranja, poput sekvenciranja visoke protočnosti (eng. *high-throughput sequencing*, HTS), omogućile istraživanja u asimptomatičnim biljkama u kojima je otkriven veliki broj novih virusa vinove loze, što je potpuno promijenilo polazište i slijed u istraživanju virusa te viroza koje uzrokuju (Saldarelli i sur., 2017). Međutim, otkrića novih virusa u vinovoj lozi često nisu popraćena dodatnim istraživanjima u svrhu njihove detaljnije karakterizacije u pogledu ekoloških karakteristika koje se manifestiraju kroz interakciju virusa s domaćinima (primarnim i alternativnim) te vektorima (Vončina i Almeida, 2018). Takva istraživanja daju osnovna saznanja koja se mogu koristiti u istraživanjima vezanima uz utjecaj virusa na vinovu lozu i vinogradarsku proizvodnju te definiranje i implementaciju mjera kontrole kroz zakonsku regulativu.

U istraživanju iz 2018. godine, metodom HTS je prvi puta u Hrvatskoj potvrđena prisutnost G-virusa vinove loze (eng. grapevine virus G, GVG; rod *Vitivirus*, porodica *Betaflexiviridae*) i badnavirusa vinove loze 1 (eng. grapevine badnavirus 1, GBV-1; rod *Badnavirus*, porodica *Calimoviridae*). Virusi su detektirani u zbirci virusa vinove loze (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, SZAF), pri čemu su četiri trsa autohtonih sorata vinove loze (Babica VB-108, Dobričić VD-102, Ljutun VLJ-178 i Vlačka VVL-101) bila inficirana s GVG, a dva trsa (Ljutun VLJ-178 i Vlačka VVL-101) s GBV-1 (Vončina i Almeida, 2018). Tom je prilikom detekcija GVG u Hrvatskoj objavljena kao drugi nalaz u svijetu, poslije otkrića virusa na Novom Zelandu (Blouin i sur., 2017a), dok je GBV-1 navedenom studijom otkriven prvi puta u svijetu. Osim podataka o genomu i ograničenih podataka o rasprostranjenosti, druge studije koje detaljnije opisuju navedene viruse u pogledu ekoloških i epidemioloških karakteristika nisu obavljene. Bez obzira na to, otkriveni vitivirus (GVG) i badnavirus (GBV-1) svrstani su u rodove koji obuhvaćaju ekonomski značajne viruse vinove loze, a koji uzrokuju velike štete i ekonomske gubitke u proizvodnji te skraćivanje životnog vijeka trsa (Maree i sur., 2020; Zhang i sur., 2011). Potencijalna štetnost GVG i GBV-1 mogla bi imati poseban značaj budući da su virusi detektirani u vrijednim autohtonim sortama koje se smatraju osjetljivim ili gotovo ugroženim u Hrvatskoj, zbog čega su sastavni dio kolekcijских nasada te različitih programa klonske i zdravstvene selekcije namijenjenih njihovom očuvanju i revitalizaciji (Maletić i sur., 2015).

Rod *Vitivirus* obuhvaća viruse čiji genom je jednolančana molekula RNA te koji uzrokuju jedan od najopasnijih i zemljopisno najrasprostranjenijih kompleksa bolesti vinove loze naziva naboranost drveta (eng. *rugose wood*, RW). Bolesti navedenog kompleksa mogu se manifestirati na drvenastim dijelovima plemke i podloge u vidu različitih abnormalnosti (ulegnuća, užljebljenja, izbočenja, plutavost, spužvastost) koje skraćuju životni vijek trsa (Minafra i sur., 2017). Iz tih razloga su glavni uzročnici, A-virus vinove loze (eng. grapevine virus A, GVA) i B-virus vinove loze (eng. grapevine virus B, GVB), regulirani certifikacijskim protokolima za proizvodnju bezvirusnog sadnog materijala u zemljama poput SAD-a i Italije (Maliogka i sur., 2015a). Također, u rod *Badnavirus* svrstani su ekonomski značajni virusi vinove loze, naziva virus prosvjetljivanja žila vinove loze (eng. grapevine vein clearing virus, GVCV) i virus povezan s diskoloracijom lista sorte 'Roditis' (eng. grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus, GRLDaV), koji uzrokuju ozbiljne bolesti u biljkama koja mogu dovesti do krčenja vinograda (Zhang i sur., 2011; Maliogka i sur., 2015b). Zbog šteta koje uzrokuju u proizvodnji, GVCV se smatra jednim od najopasnijih novootkrivenih virusa u svijetu (Cieniewicz i sur., 2020), dok je GRLDaV bio uvršten na EPPO listu upozorenja (eng. *alert list*) s ciljem ograničavanja daljnjeg rasprostranjivanja (EPPO, 2022).

Uzevši u obzir sve navedeno te dogmu da se svi virusi smatraju patogenima dok se ne dokaže suprotno, cilj ovog rada bio je provesti detaljnu karakterizaciju GVG i GBV-1 kao potencijalnih patogena od značaja za vinogradarsku proizvodnju.

1.1. Hipoteze i ciljevi istraživanja

Glavne hipoteze ovog istraživanja su:

- H1. Za GVG i GBV-1 se mogu razviti precizne molekularne metode detekcije.
- H2. GVG i GBV-1 su široko rasprostranjeni u vinovoj lozi na području Hrvatske.
- H3. GVG i GBV-1 se, osim zaraženim materijalom, prenose sjemenom, mehanički, cijepljenjem te štitaštim ušima.
- H4. Vinova loza nije jedini domaćin navedenih virusa.

Sukladno postavljenim hipotezama, ciljevi ovog istraživanja bili su:

- C1. Konstruirati početnice za konvencionalnu lančanu reakciju polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) te početnice i probe za PCR u stvarnom vremenu (eng. *real time* ili *quantitative* PCR, qPCR) te istražiti osjetljivost i efikasnost razvijenih protokola koristeći dvije metode izolacije nukleinskih kiselina, u svrhu razvoja pouzdane i prikladne metode za testiranje velikog broja uzoraka vinove loze na GVG i GBV-1.
- C2. Analizom uzoraka prikupljenih iz komercijalnih vinograda te kolekcijskih nasada autohtonih i introduciranih sorata odrediti rasprostranjenost istraživanih virusa te učestalost njihove pojave u Republici Hrvatskoj.
- C3. U uvjetima plastenika, različitim testovima prijenosa (vektorskim prijenosom korištenjem ličinki lozine štitaše uši (*Planococcus ficus* Signoret), mehaničkim prijenosom korištenjem tri inokulacijska pufera, cijepljenjem „na zrelo“ te cijepljenjem „zeleno na zrelo“) utvrditi potencijalne načine prijenosa istraživanih virusa.
- C4. U uvjetima plastenika, korištenjem različitih metoda prijenosa, utvrditi potencijalne alternativne domaćine među drvenastim indikatorskim biljkama (*Vitis* sp.), njihovim hibridima, zeljastim test biljkama te korovnim vrstama čestim u hrvatskim vinogradima.

2. PREGLED RELEVANTNE LITERATURE

2.1. Vinova loza (*Vitis vinifera* L.)

2.1.1. Klasifikacija i podrijetlo vinove loze

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) pripada u porodicu *Vitaceae* (lozice) koja objedinjuje 14 rodova i oko 910 biljnih vrsta (Chirstenhusz i Byng, 2016). Lozice su dikotiledonske kritosjemenjače među kojima, s obzirom na tip rasta, razlikujemo drvenaste i zeljaste penjačice (loze) te mala sukulentna stabla (Wen, 2007). Većinu pripadnika porodice predstavljaju loze raspoređene u rodove *Ampelocissus*, *Ampelopsis*, *Cayratia*, *Cissus*, *Clematicissus*, *Parthenocissus*, *Tetrastigma* i *Vitis*, od kojih je jedino rod *Vitis* udomaćen za uzgoj. Od oko 60 vrsta u rodu *Vitis*, vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je najrasprostranjenija i najznačajnija u poljoprivrednoj proizvodnji (Reynolds, 2017).

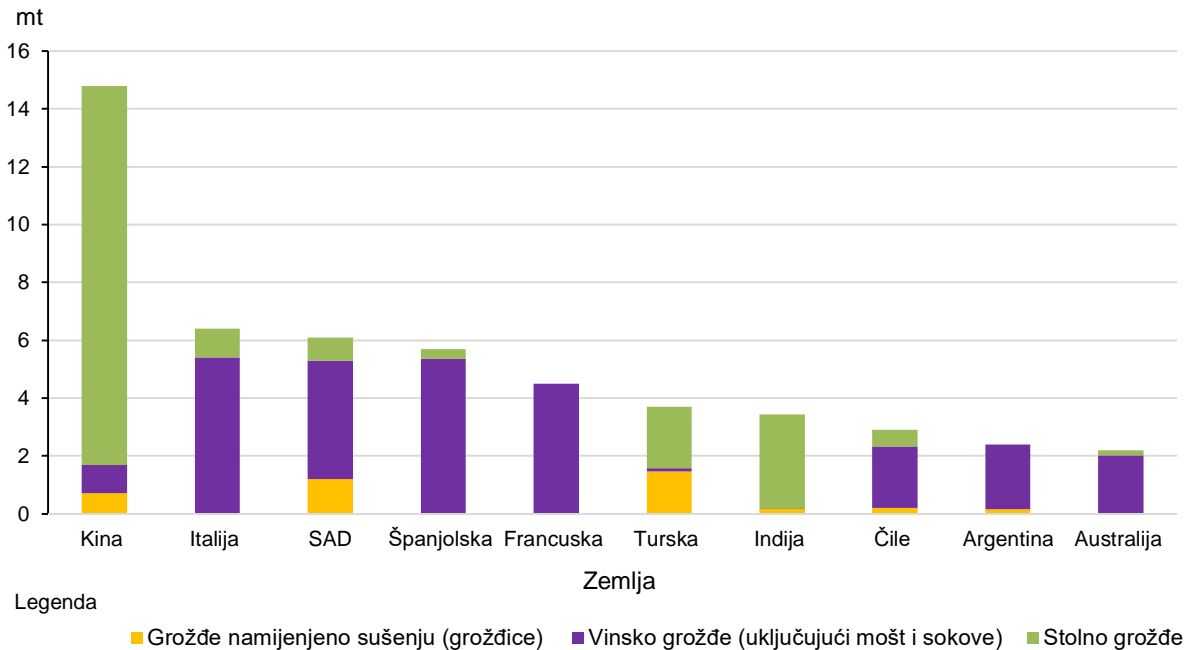
Usuglašeno je mišljenje oko podrijetla vinove loze (*V. vinifera* ssp. *vinifera*) te se smatra kako je ona nastala u dugom razdoblju domestikacije iz divlje (šumske) loze vrste *V. vinifera* ssp. *sylvestris* na području bliskog istoka i Europe (Mullins i sur., 1992; Olmo, 1996; Myles i sur., 2011). Vinova loza je, s obzirom na podrijetlo, uvrštena u euroazijsku skupinu loza iz roda *Vitis* koje se jasno genetski razlikuju od američke i istočnoazijske grupe (Maletić i sur., 2015). Genetska različitost triju spomenutih grupa rezultat je izoliranih evolucijskih procesa koji su se odvijali nakon raspada sjevernog Pangejskog superkontinenta Laurazije na kontinente (prije 200 milijuna godine) te konačnim geografskim razdvajanjem vrsta nakon zadnjeg ledenog doba (prije 2 milijuna godina) (Reynolds, 2017). Unatoč tome, lociranjem gena različitih vrsta roda *Vitis* pretpostavljeno je njihovo spontano križanje u prošlosti iz čega proizlazi teorija o njihovom zajedničkom prahistorijskom podrijetlu (Maletić i sur., 2015).

Precima današnjih loza smatraju se biljke koje su evoluirale u razdoblju Krede (prije oko 100 milijuna godina), a svrstane su u izumrle rodove *Cissites* i *Vitiphyllum* od kojih postoje sačuvani fosilni ostaci u SAD-u i Portugalu (Reynold, 2017) te u rod *Paleovitis* (Maletić i sur., 2015). Najstariji fosilni ostaci vrsta iz roda *Vitis* datiraju iz razdoblja eocena (prije oko 50 milijuna godina), a pronađeni su u Engleskoj (*V. subglosa*) i Francuskoj (*V. sezannensis*). Iz približnog razdoblja pronađeni su i fosilni ostaci vrste *V. teutonica* u Njemačkoj (Reynolds, 2017) i Hrvatskoj (Maletić i sur., 2015).

2.1.2. Uzgoj vinove loze

Vinova loza, s više od 10 000 poznatih sorata, smatra se jednom od najstarijih kultiviranih vrsta s tradicijom uzgoja od preko 8 tisuća godina. Dugoj povijesti uzgoja svjedoče arheološki nalazi iz neolitskog razdoblja (5000 – 6000 godina prije nove ere) s područja Transkavkazije, koje se smatra domovinom vinove loze (Mullins i sur., 1992; McGovern, 2003). Iako se kroz tisućljeća vinova loza uzgaja u namjene poput konzumacije grožđa u svježem ili suhom stanju (grožđice) ili proizvodnje različitih prehrambenih i kozmetičkih proizvoda i sl., grožđe se u najvećem dijelu svijeta koristi za proizvodnju vina (OIV, 2022). Zbog velikog povijesnog, kulturnog i socijalnog značaja uzgoja grožđa i proizvodnje vina, vinova loza je danas najrasprostranjenija voćarska kultura u svijetu (Candar i sur., 2021).

Prema OIV (2022), u 2021. godini se vinova loza uzgajala na ukupno 7,3 milijuna ha, pri čemu je pet zemalja obuhvaćalo polovinu svjetskih vinograda, redom: Španjolska (13,2 %), Francuska (10,9 %), Kina (10,7 %), Italija (9,8 %) i Turska (5,7 %). Iste je godine proizvedeno ukupno 74,8 milijuna tona grožđa, od čega 43,3 milijuna tona vinskih sorti grožđa, 30,1 milijuna tona grožđa namijenjenog konzumaciji u svježem stanju (stolno grožđe) te 1,4 milijuna tona grožđa namijenjenog sušenju i konzumaciji u suhom stanju (grožđice). Pritom je polovina ukupne proizvodnje grožđa proizvedena u Kini (14,8 %), Italiji (6,4 %), SAD-u (6,1 %), Španjolskoj (5,7 %), Francuskoj (4,5 %), Turskoj (3,7 %), Indiji (3,5 %), Čileu (2,9 %) i Argentini (2,4 %) (Grafikon 2.1).



Grafikon 2.1. Proizvodnja grožđa prema namjeni u vodećim vinogradarskim zemljama u 2021. godini. Oznaka mt–milijuna tona. Izvor: OIV, 2022. International Organisation of Wine and Vine. State of the world vine and wine sector 2021 (https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Annual_Assessment_of_the_World_Vine_and_Wine_Sector_in_2021.pdf; pristup: 15.01.2023).

Brzom širenju uzgoja vinove loze kroz povijest pridonijelo je vegetativno razmnožavanje (reznicama i grebenicama) za koje se vjeruje da se primjenjivalo već u samim počecima uzgoja (Singleton, 1996). Ukorjenjivanje vinove loze na vlastitom korijenu bila je uobičajena praksa uzgoja sve do pojave štetnika trsovog ušenca ili filoksere (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch), koji je došao trgovinom iz američkog kontinenta i u značajnoj mjeri uništio europsko vinogradarstvo u drugoj polovici 19. st. (Powell i sur., 2013). Zbog navedenog su u proces proizvodnje sadnog materijala uključene filoksera-rezistentne američke vrste loza poput *Vitis rupestris*, *V. riparia* i *V. berlandieri* te njihovi hibridi, koje, iako nisu gospodarski važne u uzgoju grožđa na vlastitom korijenu, služe kao podloge (korijen) u standardnom protokolu cijepjenja vinove loze (Mudge i sur., 2009). Međutim, intenzifikacija trgovine sadnim materijalom uzrokovala je širenje različitih bolesti vinove loze koje se smatraju jednim od glavnih ograničavajućih čimbenika ekonomski isplative proizvodnje. Prema statističkim podacima, vinova loza se smatra jednom od poljoprivrednih kultura u uzgoju koje se utroši najviše sredstava za zaštitu bilja (Rantsiou i sur., 2020). To je prije svega posljedica gljivičnih bolesti koje su se trgovinom proširile s američkog kontinenta, a na koje je europska loza posebno osjetljiva, poput pepelnice (*Uncinula necator* Schwein.), plamenjače (*Plasmopara viticola* Berk. i M. A. Curtis; Berl i De

Toni), crne truleži (*Guignardia bidwellii* Ellis; Viala i Ravaz) i crne pjegavosti (*Phomopsis viticola* Sacc.) (Reynolds i sur., 2017). Pored gljivičnih i pseudogljivičnih, izrazito štetnim i ekonomski značajnim patogenima smatraju se virusi i virusima slični organizmi za koje ne postoje kurativne mjere kontrole u vidu primjene sredstava za zaštitu bilja te jednom zaražena biljka ostaje zaražena kroz cijelo razdoblje iskorištavanja (Martelli, 1993a). Virusne bolesti vinove loze su danas široko rasprostranjene u svijetu kao rezultat vegetativnog razmnožavanja i trgovine sadnim materijalom, a njihov značajniji utjecaj na proizvodnju zabilježen je upravo uvođenjem američkih podloga (Reynolds, 2017). Osim američkih vrsta loza u novije se vrijeme intenzivno koriste i loze iz istočnoazijske skupine, poput *Vitis amurensis* i *V. romanetti*, koje služe u oplemenjivačkim programima stvaranja hibrida rezistentnih na biotski stres koji uzrokuju ekonomski značajne mikoze i bakterioze (Eibach i Töpfer, 2015). Također, loze iz istočnoazijske grupe česte su u oplemenjivačkim programima stvaranja hibrida vinove loze tolerantnih na abiotske faktore (niska temperatura, suša), s posebnim naglaskom na kineske vrste poput *V. davidii* i *V. pentagona* (Wan i sur., 2008). Bez obzira na nemjerljivu korist korištenja različitih vrsta loza u uzgoju vinove loze, takva praksa bi u budućnosti mogla rezultirati još većom rasprostranjenošću i pojavnošću patogenih organizama te njima uzrokovanih gospodarskih šteta. Navedeno je već vidljivo u slučaju virusa, od kojih su neki rasprostranjeni u svim vinogradarskim regijama u svijetu, a osim vegetativnim razmnožavanjem vinove loze, s majčinske biljke na novu biljku se mogu prenijeti i provedbom spomenutih oplemenjivačkih programa, u kojima se vinova loza razmnožava generativno (Zhang i sur., 2022).

2.1.3. Vinogradarstvo u Hrvatskoj

Vinova loza je jedna od najstarijih i najrasprostranjenijih poljoprivrednih kultura na području Hrvatske koja se uzgaja u većini poljoprivrednih regija, izuzev Like i Gorskog kotara. Prema Zakonu o vinu (NN, 32/2019), vinogradarska je proizvodnja u Hrvatskoj organizirana prema geografsko-klimatskim područjima uzgoja te je podijeljena na više podregija svrstanih u četiri regije: Slavonija i hrvatsko Podunavlje, Središnja bregovita Hrvatska, Hrvatska Istra i Kvarner te regiju Dalmacija (Slika 2.1). O značaju vinogradarstva u Hrvatskoj svjedoče podaci o proizvodnji prema kojima je u 2020. godini u vinogradarsko-vinarskom sektoru djelovalo 42 274 (29,9 %) poljoprivrednih gospodarstava s uzgojem na ukupno 21 220 ha vinograda, što je obuhvaćalo 27,8 % svih trajnih nasada, 23,8 % nasada voćarskih kultura te 1,4 % ukupnog korištenog poljoprivrednog zemljišta u RH (DZS, 2022).



Slika 2.1. Vinogradarske regije Hrvatske. Izvor: Vina Croatia, 2023. Udruženje vinarstva HGK (<https://vinacroatia.hr/en/promo-materials/wine-map-of-croatia/>; pristup: 20.10.2022).

Uzgoj vinove loze i proizvodnja vina imaju dugu tradiciju na području RH. Najstariji arheološki nalazi uzgoja potječu iz trećeg tisućljeća prije nove ere te se pretpostavlja da su starosjedilačka plemena Ilira (Dalmati, Liburni, Japodi, Histri) koristili vinovu lozu u gospodarske svrhe (Milat, 2005; Gašparec-Skočić, 2015). Prema Gašparec-Skočić (2015), kultura proizvodnje grožđa i konzumacije vina na području Hrvatske dodatno se razvijala u razdoblju razvoja antičkih grčkih kolonija u Dalmaciji (4. st. pr. Kr.) te dolaskom Kelta na područje kontinentalne Hrvatske (3. st. pr. Kr.), a iz tog razdoblja postoje prvi tekstualni zapisi o uzgoju vinove loze. Hrvati svojim dolaskom na današnje prostore Hrvatske prihvaćaju kulturu uzgoja vinove loze koja se nastavila do današnjih dana, pri čemu najveći procvat doživljava u 19 st. (prije dolaska filoksere) kada je u Hrvatskoj bilo 170 000 ha vinograda (Maletić i sur, 2015). Osim povoljnih uvjeta za uzgoj i duge tradicije, hrvatsko vinogradarstvo karakterizira čak 125 izvornih (autohtonih) sorata vinove loze, što predstavlja veliku poljoprivrednu i kulturnu baštinu (Maletić i sur., 2015).

Zbog velikog gospodarskog značaja sve do današnjih dana vinova loza tema je mnogih znanstvenih istraživanja u Hrvatskoj. U najvećoj mjeri ona su vezana uz autohtone sorte, u očuvanje i revitalizaciju kojih se u posljednje vrijeme ulažu veliki napori i financijska sredstva (Maletić i sur., 2015). Osim što velik dio hrvatskih vinogradarskih površina čine autohtone sorte, poput 'Malvazije istarske' (11 %), 'Plavca malog' (9 %) i 'Plavine' (oko 4 %), oko 15 % autohtonih sorata je gotovo ugroženo (15 000 – 50 000 jedinki u uzgoju: 'Babica', 'Malvasija dubrovačka', itd.), 12 % je osjetljivo (5 000 – 15 000: 'Dobričić', 'Ljutun', itd.), 10 % je ugroženo (1 000 – 5 000: 'Belina starohrvatska', 'Jarbola', itd.), a čak 49 % autohtonih sorata je kritično ugroženo (manje od 1000 biljaka u uzgoju: 'Galac', 'Topol', itd.) (Maletić i sur., 2015). Iz tog razloga je pokrenuto više projekata u svrhu očuvanja autohtonih sorata te su osnovani kolekcijski nasadi, poput Nacionalne kolekcije autohtonih sorata vinove loze SZAF (Maletić i sur., 2015). U kontekstu zaštite osjetljive i posebno vrijedne germplazme posebna se pažnja posvećuje patogenima vinove loze, a posebno onima intracelularnima (virusi, viroidi, fitoplazme). Virus, kao najbrojniji patogeni vinove loze, mogu utjecati na pogoršanje proizvodnih karakteristika (prinos i kakvoća), ali i na drastično skraćivanje životnog vijeka trsa, što za posljedicu može imati i krčenje vinograda (Qiu i sur., 2007). U tu je svrhu, osim klonske selekcije, iznimno važna i zdravstvena selekcija trsova koja je u Hrvatskoj rezultirala brojnim istraživanjima zdravstvenog stanja vinove loze, pri čemu je poseban naglasak stavljen na pojavnost virusa u autohtonim sortama (Karoglan Kontić i sur., 2009; Vončina i sur., 2019). Sprječavanje zaraze i kontrola patogena vinove loze u komercijalnim i kolekcijskim vinogradima zahtijeva puno znanja i sredstava, a posebno je to kompleksno kod ekonomski značajnih intracelularnih patogena kojima biljka u vinogradu ostaje trajno zaražena, a čija eliminacija ovisi o dugotrajnim, neizvjesnim i skupim laboratorijskim metodama (Maliogka i sur., 2015a).

2.2. Virusi vinove loze

Vinova loza poznata je kao kultura koju inficira najveći broj intracelularnih obligatnih patogena (virusi, viroidi, floemom i ksilemom ograničeni prokarioti) u usporedbi sa svim ostalim kulturama, među kojima se brojnošću dominantno ističu virusi. Prema posljednjem popisu, vinovu lozu inficira 86 različitih vrsta virusa iz 18 porodica i 35 rodova (Martelli, 2018; Fuchs, 2020). Osim toga, iz vinove loze izolirano je ukupno sedam vrsta viroida od kojih samo dva uzrokuju vidljive simptome na biljci (Martelli, 2017). Prema Fuchs (2020), pet je glavnih razloga za tako veliki broj potvrđenih virusa u vinovoj lozi, to su: (i) kontinuirani i izolirani koevolucijski odnosi virusa s različitim pripadnicima roda *Vitis*; (ii) dugo razdoblje domestikacije vrsta iz roda *Vitis*; (iii) ograničeni izvori rezistentnosti *Vitis*-vrsta prema virusima; (iv) velika razmjena germplazme *Vitis*-vrsta na globalnoj razini; i (v) razvoj i korištenje visokoprotočnih metoda sekvenciranja u svrhu otkrivanja i identifikacije virusa.

Pretpostavlja se kako su virusi vinove loze prisutni od samih početaka njenog uzgoja. Među najstarijima navode se virusi iz skupine infektivne degeneracije, poput virusa lepezastog lista vinove loze (eng. grapevine fanleaf virus, GFLV), za koje se smatra da su bili prisutni u neolitskim vinogradima na područjima današnje Turske, Sirije i Iraka, odakle su se vegetativnim razmnožavanjem i premještanjem vinove loze rasprostranili na nova područja uzgoja (Hewitt, 1968). Iako se simptomi viroza mogu primijetiti na umjetničkim prikazima vinove loze iz doba antike, prvi dostupni zapisi o primijećenim simptomima nalik na viroze potječu iz sredine 19. st. i nastali su u europskim zemljama (Reynolds, 2017). To se vremenski poklapa s dolaskom filoksere i uvođenjem američkih vrsta loza kao podloga u procesima proizvodnje sadnog materijala, što je značajno pridonijelo širenju viroza i povećanju značaja virusnih bolesti (Reynolds, 2017; Martelli, 2017). Pionikom znanstvenih istraživanja vezanih uz viruse vinove loze smatra se W. B. Hewitt, koji je 1954. godine objavio prvi popis virusa vinove loze (Hewitt, 1954). Prekretnicom u istraživanju smatra se osnivanje Međunarodnog vijeća za proučavanje viroza i virozama sličnih bolesti vinove loze (eng. *International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*, ICVG) 1962. godine, koje i danas daje velik poticaj u istraživanju intracelularnih patogena vinove loze (Martelli, 2014). U novije vrijeme je korištenje naprednih tehnologija, poput sekvenciranja visoke protočnosti (HTS), omogućilo detekciju virusa i u asimptomatskim biljkama, što je promijenilo slijed istraživačkih postupaka i uvelike proširilo listu poznatih virusa koji inficiraju vinovu lozu (Saldarelli i sur., 2017). Najbolji primjer su virusi iz porodice *Betaflexiviridae* kojoj su pridruženi brojni novootkriveni vitivirusi (rod *Vitivirus*) u ovom i posljednjem desetljeću (Maree i sur., 2020) (Tablica 2.1).

Tablica 2.1. Popis virusa vinove loze, njihovih karakteristika te bolesti koje uzrokuju (prema Fuchs, 2020).

Porodica	Rod	Vrsta	Genom	Oblik viriona	Vektor	Bolest
<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Potexvirus</i>	potato virus X (PVX)	(+)ssRNA	nitast	nema	nepoznata
	<i>Fivirus</i>	grapevine Kizil Sapak virus (GKSV)	(+)ssRNA	nitast	nepoznat	nepoznata
	<i>Foveavirus</i>	grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV)	(+)ssRNA	nitast	nepoznat	naboranost drveta
	<i>Trichovirus</i>	grapevine virus T (GVT) grapevine berry inner necrosis virus (GINV) grapevine Pinot gris virus (GPGV)	(+)ssRNA	nitast	eriofidne grinje	unutrašnja nekroza bobice pjegavost/deformacija listova
<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Vitivirus</i>	grapevine virus A (GVA)	(+)ssRNA	nitast	štitaste uši	naboranost drveta
		grapevine virus B (GVB)				
		grapevine virus D (GVD)				
		grapevine virus E (GVE)				
		grapevine virus F (GVF)				
		grapevine virus G (GVG)				
		grapevine virus H (GVH)				
		grapevine virus I (GVI)				
		grapevine virus J (GVJ)				
		grapevine virus K (GVK)				
		grapevine virus L (GVL)				
grapevine virus M (GVM)						
<i>Bromoviridae</i>	<i>Alfamovirus</i>	alfalfa mosaic virus (AMV) related to Amazon lily	(+)ssRNA	baciliforman	lisne uši	žuti mozaik
	<i>Anulavirus</i>	mild mottle virus (ALiMMV)	(+)ssRNA	izometričan	nema	nepoznata
	<i>Cucumovirus</i>	cucumber mosaic virus (CMV)	(+)ssRNA	izometričan	lisne uši	nepoznata
	<i>Ilarvirus</i>	grapevine angular mosaic virus (GaMoV) grapevine line pattern virus (GLPV) grapevine virus S (GVS)	(+)ssRNA	izometričan	nema	rubni mozaik crtičavost
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i>	tomato spotted wilt virus (TSWV)	(-)ssRNA	izometričan	tripsi	nepoznata
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Badnavirus</i>	grapevine vein clearing virus (GVCV)	dsDNA	baciliforman	lisne uši	prosvjetljivanje žila
		grapevine badnavirus 1 (GBV-1) grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV)				nepoznata diskoloracija lista sorte Roditis
<i>Closteroviridae</i>	<i>Closterovirus</i>	grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)	(+)ssRNA	nitast	nepoznat	uvijenost listova/ inkompatibilnost
		grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)				
	<i>Ampelovirus</i>	(+)ssRNA	nitast	štitaste uši	uvijenost listova	
						grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)
						grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4) grapevine leafroll-associated virus 13 (GLRaV-13)

Tablica 2.1 Nastavak

Porodica ^a	Rod ^a	Vrsta ^a	Genom	Oblik viriona ^b	Vektor ^c	Bolest ^d				
<i>Closteroviridae</i>	<i>Velarivirus</i>	grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7)	(+)ssRNA	nitast	nepoznat	nepoznata				
<i>Endornaviridae</i>	<i>Endornavirus</i>	grapevine endophyte endornavirus (GEEV)	(+)ssRNA	nema	Nema	nepoznata				
<i>Geminiviridae</i>	<i>Begomovirus</i>	grapevine begomovirus A (GBVA)	ssDNA	upareni ikozaedri	štitasti moljci	nepoznata				
	<i>Grablovirus</i>	grapevine red blotch virus (GRBV)	ssDNA	upareni ikozaedri	cvrčak	crvene mrlje				
		wild Vitis latent virus 1 (WVV-1)			nepoznat	nepoznata				
	<i>Unassigned</i>	grapevine geminivirus A (GGVA) temperate fruit-decay-associated virus (TFDaV)	ssDNA	upareni ikozaedri	nepoznat	nepoznata				
<i>Luteoviridae</i>	<i>Enamovirus</i>	grapevine enamovirus 1 (GEV-1)	(+)ssRNA	izometričan	lisne uši	nepoznata				
<i>Partitiviridae</i>	<i>Deltapartivirus</i>	grapevine cryptic virus (GCV)			nema	nepoznata				
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Rubodvirus</i>	grapevine Garan dmak virus (GGDV)	(-)ssRNA	izometričan	nepoznat	nepoznata				
		grapevine Muscat rose virus (GMRV)				nepoznata				
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	bean common mosaic virus (BCMV) potato virus Y (PVY)	(+)ssRNA	nitast	lisne uši	nepoznata				
<i>Reoviridae</i>	Ne dodijeljen	grapevine Cabernet Sauvignon reovirus (GCSV)	dsRNA	izometričan	cvrčci	nepoznata				
	<i>Cheravirus</i>	apple latent spherical virus (ALSV) ^e	(+)ssRNA	izometričan	nepoznat	nepoznata				
<i>Secoviridae</i>	<i>Fabavirus</i>	broad bean wilt virus (BBMV)	(+)ssRNA	izometričan	lisne uši	nepoznata				
		grapevine fabavirus (GFabV)								
		artichoke Italian latent virus (AILV)					nepoznat			
		arabis mosaic virus (ArMV)					nematoda			
		blueberry leaf mottle virus (BBLMV)								
		cherry leafroll virus (CLRV)								
		grapevine Anatolian ringspot virus (GARSV)								
		grapevine Bulgarian latent virus (GBLV)					nepoznat			
		grapevine deformation virus (GDeV)								
		grapevine chrome mosaic virus (GCMV)								
		grapevine fanleaf virus (GFLV)					(+)ssRNA	izometričan	nematoda	infektivna degeneracija
		grapevine Tunisian ringspot virus (GTRV)							nepoznat	
		peach rosette mosaic virus (PRSM)								
		raspberry ringspot virus (RpRSV)								
	tobacco ringspot virus (TRSV)			nematode						
tomato ringspot virus (ToRSV)										
tomato black ring virus (TBRV)										
<i>Unassigned</i>	strawberry latent ringspot virus (SLRSV)			nematode						

Tablica 2.1 Nastavak

Porodica ^a	Rod ^a	Vrsta ^a	Genom	Oblik viriona ^b	Vektor ^c	Bolest ^d	
Tombusviridae	<i>Carmovirus</i>	carnation mottle virus (CarMV)	(+)ssRNA	izometričan	nema	nepoznata	
	<i>Necrovirus</i>	tobacco necrosis virus D (TNV-D)	(+)ssRNA	izometričan	nema	nepoznata	
	<i>Tombusvirus</i>	grapevine Algerian latent virus (GALV) petunia asteroid mosaic virus (PAMV)	(+)ssRNA	izometričan	nema	nepoznata	
Tymoviridae	<i>Marafivirus</i>	blackberry virus S (BIVS)	(+)ssRNA	izometričan	cvrčci	nepoznata	
		grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV) grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV)				mozaik asteroida paperjaste žile	
	<i>Maculavirus</i>	grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1)	(+)ssRNA	izometričan	nepoznat	nepoznata	
		grapevine fleck virus (GFkV)				pjegavost	
		grapevine redglobe virus (GRGV)				nepoznata	
<i>Gratylivirus</i>	grapevine-associated tymo-like virus (GaTLV)	(+)ssRNA	izometričan	nepoznat	nepoznata		
Virgaviridae	<i>Tobamovirus</i>	grapevine virga-like virus (GVLV) tobacco mosaic virus (TMV) tomato mosaic virus (ToMV)	(+)ssRNA	štapičast	nema	nepoznata	
Nedodijeljena	<i>Idaeovirus</i>	raspberry bushy dwarf virus (RBDV)	(+)ssRNA	izometričan	nema	žuta crtičavost	
	<i>Sobemovirus</i>	sowbane mosaic virus (SoMV)	(+)ssRNA	izometričan	nema	nepoznata	
	<i>Virtovirus</i>	grapevine virus satellite (GV-Sat)	(+)ssRNA	izometričan	kukci kornjaši	nepoznata	
	Nedodijeljen		grapevine Ajinashika virus (GAgV)	(+)ssRNA	izometričan	nepoznat	nepoznata
			grapevine labile rod-shaped virus (GLRSV)	nepoznat	nitast	nepoznat	nepoznata
		grapevine stunt virus (GSV)		izometričan	cvrčak	nepoznata	

^a Neki od taksonomskih naziva i imena virusa su provizorni, budući da se čekaju ratifikacije Međunarodnog odbora za taksonomiju virusa (eng. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV).

^b Oblici nekih viriona pretpostavljeni su analogijom s drugim virusima istog roda ili iste porodice, a ne stvarnim promatranjima pomoću elektronske mikrofografije.

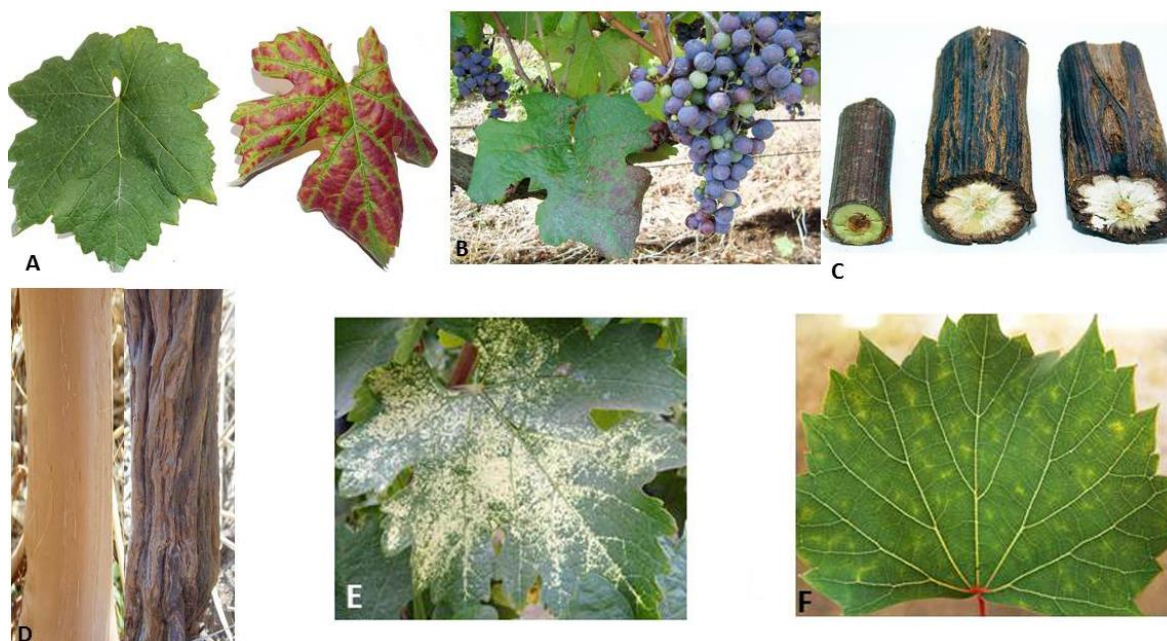
^c Neki od vektora su pretpostavljeni analogijom s vektorima drugih virusa istog roda, a ne iz provedenih testova prijenosa.

^d Većina simptoma virusnih bolesti ne može se pripisati jednoj vrsti virusa, jer su simptomatske loze pretežno zaražene mješovitim infekcijama u vinogradu, osim ako nisu ispunjeni Kochovi postulati.

^e Za latentni sferični virus jabuke (eng. apple latent spherical virus, ALSV) eksperimentalno je utvrđeno da inficira sadnice vinove loze i vinovu lozu uzgojenu u kulturi tkiva (Maeda i sur., 2020). Navedeni virus nije identificiran u prirodno zaraženim trsovima.

2.2.1. Ekonomski značajne virusne bolesti vinove loze

Tridesetak virusa smatra se uzročnicima ekonomski značajnih bolesti (viroza) vinove loze, koje se jasno očituju kroz vidljive simptome na/u biljci i štete koje uzrokuju (Martelli, 2014). Ekonomski najznačajniji i najbolje proučeni virusi mogu se podijeliti u četiri skupine (kompleksa) bolesti koje uzrokuju na vinovoj lozi: (i) infektivna degeneracija (europski nepovirusi) i propadanje (američki nepovirusi), (ii) uvijanje listova (eng. *grapevine leafroll disease*, GLD), (iii) naboranost drveta (eng. *rugose wood*, RW) i (iv) pjegavost lista (Martelli, 2017). Uzročnici su virusi s genomom u obliku pozitivne jednolančane ribonukleinske kiseline (eng. (+) *single-stranded ribonucleic acid*, (+)ssRNA) koji su svrstani u porodice *Secoviridae*, *Closteroviridae*, *Betaflexiviridae* i *Tymoviridae*, a koji u inficiranim biljkama induciraju simptome poput degeneracija, uvijanja listova, inkompatibilnosti podloge i plemke, deformacija i abnormalnosti drva te promjene boje listova (Fuchs, 2020) (Slika 2.2). Virusni uzročnici navedenih bolesti široko su rasprostranjeni u svijetu, a osim sadnim materijalom i cijepljenjem, ovisno o skupini/vrsti, prenose se i vektorima, poput štitastih i vunastih ušiju (Hemiptera: *Pseudococcidae* i *Coccidae*), nematodama (Nematoda: *Longidoridae*) i cvrčcima (Hemiptera: *Membracidae*) (Maliogka i sur., 2015a; Fuchs, 2020).



Slika 2.2. Simptomi četiri virusna kompleksa na vrstama roda *Vitis*: asimptomatski list – lijevo, uvijenost i crvenilo lista – desno (A) te slaba obojenost grožđa crne sorte vinove loze uzrokovana infekcijom virusa iz GLD skupine (B); plutavost kore vrste *V. labrusca* sorte 'Niagara Rosada' (C) i naboranost drveta podloge Paulsen 1103 (D) uzrokovana virusima iz RW skupine (asimptomatska podloga – lijevo); simptomi infektivne degeneracije uzrokovane virusom lepezastog lista vinove loze – GFLV (E); pjegavost lista uzrokovana infekcijom virusom iz istoimenog kompleksa na vrsti *V. rupestris* St. George (F) (prema Basso i sur., 2017).

U novije vrijeme su metodom HTS otkriveni novi virusi svrstani u gore navedene porodice, za koje je dokazan ekonomski štetan utjecaj na vinogradarsku proizvodnju. Jedan od njih je virus Pinota sivog (eng. grapevine Pinot gris virus, GPGV; rod *Trichovirus*, porodica *Betaflexiviridae*), otkriven 2012. godine (Giampetruzzi i sur., 2012), koji se danas smatra jednim od tri najštetnija novootkrivena virusa vinove loze (Cieniewicz, i sur., 2020). Također, novootkriveni virusi pridruženi su i u druge porodice za koje se do tada nije znalo da njihovi predstavnici mogu inficirati vinovu lozu. Primjer za to su ekonomski značajni virusi s genomom u obliku dvolančane deoksiribonukleinske kiseline (eng. *double-stranded deoxyribonucleic acid*, dsDNA), poput badnavirusa (rod *Badnavirus*, porodica *Caulimoviridae*) i virusa crvene mrljavosti vinove loze (eng. grapevine red blotch virus, GRBV; rod *Grablovirus*, porodica *Geminiviridae*), koji zajedno s GPGV predstavljaju veliku prijetnju globalnom vinogradarstvu (Cieniewicz, i sur., 2020).

2.2.2. Posljedice zaraze i ekonomski gubici

Zaraza ekonomski značajnim virusima vinove loze uzrokuje brojne poremećaje u biljci. Virusi negativno utječu na rast, vigor i fiziologiju biljke, što se posljedično reflektira na smanjenu i kvantitetu i kvalitetu (kakvoću) prinosa (Mannini i Digiario, 2017). U vinovoj lozi zaraženoj s GFLV (infektivna degeneracija) zabilježen je pad prinosa sorte 'Traminac' od 93,6 %, dok je u sorti 'Faber' inficiranoj s virusom mozaika gušarke (eng. arabis mosaic virus, ArMV) maksimalan pad prinosa iznosio 77 % (Rüdel, 1985). Također, zabilježen je i značajan pad prinosa u uzgoju biljaka inficiranim s drugim nepovirusima, poput virusa kromiranog mozaika vinove loze (eng. grapevine chrome mosaic virus, GCMV) u Mađarskoj od 47 % i virusa prstenaste pjegavosti kupine (eng. raspberry ringspot virus, RpRSV) u Njemačkoj od 30 % i više (Lehoczky i Tasnady, 1971; Vuittenez i sur., 1970). U istraživanjima vezanim uz utjecaj virusa iz skupine uvijenosti lista (GLD) na vinovu lozu ustanovljeno je da eliminacija uvijenosti lista pridruženog virusa 3 (eng. grapevine leafroll-associated virus 3, GLRaV-3) termoterapijom može rezultirati povećanjem prinosa do 27 %, u odnosu na zaražene kontrolne biljke sorata 'Cabernet Franc' i 'Traminac' (Clingeleffer i Krake, 1992; Balthazard, 1993). Istraživanje Komar i sur. (2007) o utjecaju uvijenosti lista vinove loze pridruženih virusa 1, 2 i 3 (eng. grapevine leafroll-associated virus 1, 2 and 3, GLRaV-1, -2, -3) i GVB na vinovu lozu pokazalo je da eliminacija GLRaV-2 ima najveći pozitivan učinak na biljke, koji se odrazio na povećanje vegetativne mase od 21 % te prinosa grožđa od 22 %. Osim prinosa i vigora, virusi vinove loze uzrokuju smanjenje sadržaja šećera u soku grožđa za 3 do 5 °Brix, smanjuju intenzitet obojenja grožđa crnih sorata za do 35 %, utječu na smanjenje ukupnih polifenola za do 38 % te negativno utječu na biosintezu tanina, flavonoida, antocijanina, poliamina, aromatičnih komponenti te ostalih

metabolita (Basso i sur., 2017). Redukcija navedenih komponenti u grožđu se posljedično negativno reflektira i na kvalitetu vina, pri čemu je najveći negativan utjecaj, u pogledu slabije obojenosti crnih vina i slabije izraženosti tercijarnih aroma (fra. *bouquet*), zabilježen u biljkama istovremeno zaraženima s GVA (RW) i s GLRaV-3 (GLD) (Mannini i Digiario, 2017). Virusi imaju utjecaj i na inkompatibilnost, odnosno ne srastanje plemke s podlogom nakon cijepjenja, što može dovesti do iznenadnog ugibanja biljaka. Pirolo i sur. (2009) pokazali su kako inkompatibilnost pod utjecajem GLRaV-2 ovisi o korištenoj podlozi, s obzirom da je 83,9 % biljaka uginulo nakon cijepjenja na Kober 5BB, a ni jedna cijepljenjem na podlogu 420 A.

Uz prethodno navedene negativne posljedice, uključujući i skraćivanje životnog vijeka trsa, virusi vinove loze utječu na rentabilnost i isplativost uzgoja vinove loze uzrokujući velike ekonomske gubitke, koji se najviše očituju u krčenju i nadomještanju zaraženih biljaka i cijelih vinograda (Perrone i sur., 2017). Ekonomski gubici najbolje su istraženi u slučaju infekcije s pripadnicima skupine GLD. Gubici od istih su u području uzgoja savezne države New York (SAD) procijenjeni na 25 000 – 40 000 američkih dolara (\$) po hektaru tijekom razdoblja od 25 godina uzgoja sorte 'Cabernet Franc' (Atallah i sur., 2012) te na 29 902 – 226 405 američkih dolara (\$) po hektaru (ovisno o stupnju infekcije i mjerama kontrole) na području uzgojnog područja Kalifornije (Ricketts i sur., 2015). Na Novom Zelandu su gubici procijenjeni na 47 000 dolara/ha tijekom 20 godina uzgoja sorata 'Sauvignon Blanc' i 'Merlot' (Mannini i Digiario, 2017). Ekonomski gubici su istraživani i u europskim zemljama. U Valaisu (Švicarska) ekonomski učinak virusa iz kompleksa uvijenosti lista procijenjen je na 5 % godišnjeg bruto dohotka (Besse i sur., 2009). Na području Rias Baixas (Španjolska) je prosječno 40 % zaraženih trsova utjecalo na oko 20 % ekonomskih gubitaka u vinogradima sorte 'Albariño' (Pesqueira i sur., 2012). Temeljem navedenih istraživanja se procjenjuje kako bi globalni ekonomski gubici uzrokovani virusima u vinogradarstvu mogli iznositi milijune američkih dolara (\$) godišnje (Perrone i sur., 2017).

2.2.3. Rod *Vitivirus*

2.2.3.1. Taksonomija i nomenklatura

Vitivirusi (rod *Vitivirus*, porodica *Betaflexiviridae*) poznati su kao najbrojnija skupina virusa vinove loze klasificirana unutar istog roda (Maree i sur., 2020). A-virus vinove loze (GVA) je najstariji otkriveni vitivirus vinove loze, koji je zbog svoje filamentozne građe prvotno svrstan u skupinu „klosterovirusima-sličnih čestica“ (Conti i sur., 1980). Nedvojbeno razlika između vitivirusa i drugih virusa slične morfologije potvrđena je serološkom analizom, nakon čega je GVA dobio svoj današnji naziv (Milne i sur., 1984). Prema Martelli

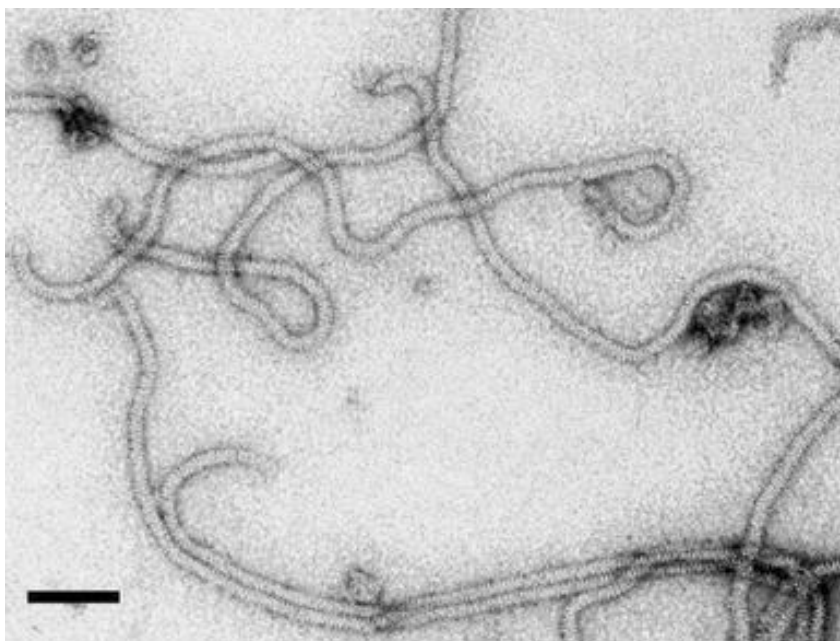
(1994), GVA je originalno svrstan u rod *Trichovirus*, zajedno s kasnije otkrivenim B virusom vinove loze (GVB) (Boscia i sur., 1993) i prvim otkrivenim vitivirusom nazvanim latentni virus šapike (eng. heracleum latent virus, HLV) (Bem i Murant, 1979). Nedugo nakon toga, zajedno s novootkrivenim D-virusom vinove loze (eng. grapevine virus D, GVD) (Abou-Ghanem i sur., 1997), navedeni virusi su premješteni u novi rod *Vitivirus* (Martelli i sur., 1997) i to na temelju prethodno sekvenciranih i istraženih genoma koji su sadržavali dva dodatna cistrona koji kodiraju polipeptide (Saldarelli i sur., 1996; Minafra i sur., 1997). Rod *Vitivirus* originalno je pridružen u porodicu *Flexiviridae* na temelju sličnosti genoma vitivirusa i morfologije njihovih čestica s drugim predstavnicima porodice (Adams i sur., 2005). Ubrzo nakon toga, na temelju razlike u strukturnim i replikacijskim proteinima, virusi iz porodice *Flexiviridae* su raspodijeljeni u tri nove porodice *Alphaflexiviridae*, *Gammaplexiviridae* te porodicu *Betaflexiviridae* kojoj su i danas pridruženi vitivirusi (Martelli i sur., 2007).

Prema trenutnoj klasifikaciji Međunarodnog vijeća za taksonomiju virusa (ICTV, 2023a), 15 je priznatih vrsta vitivirusa od kojih devet inficira vinovu lozu: A-, B-, D-, E-, F-, G-, H-, I- te J-virus vinove loze (grapevine virus A, B, D, E, F, G, H, I, J; GVA, GVB, GVD, GVE, GVF, GVG, GVH, GVI, GVJ) (Conti i sur., 1980; Boscia, i sur., 1993; Abou-Ghanem i sur., 1997; Nakaune i sur., 2008; Al Rwahnih i sur., 2012a; Blouin i sur., 2017a; Candresse i sur., 2018; Blouin i sur., 2018; Diaz-Lara i sur., 2018a). Osim vinove loze i šapike, drugi predstavnici roda *Vitivirus* inficiraju kulture poput, kivija, arakače, kupine, mente i agave (Maree i sur., 2020). Na listu priznatih vitivirusa još nisu dodani novootkriveni vitivirusi vinove loze, predloženih imena: K-, L-, M-, N- i O-virus vinove loze (grapevine virus K, L, M, N, O; GVK, GVL, GVM, GVN, GVO) (Jo i sur., 2017; Debat i sur., 2019; Alabi i sur., 2019; Read i sur., 2022). Jedan od glavnih uvjeta za priznavanje nove vrste unutar porodice *Betaflexiviridae* je podudarnost između izolata koja mora biti manja od 72 % na nukleotidnoj (eng. *nucleotide*, nt) i 80 % na aminokiselinskoj (eng. *amino acid*, aa) razini i to unutar regija koje kodiraju kapsidni protein (eng. *coat protein*, CP) i enzim RNA-ovisnu RNA-polimerazu (eng. *RNA-dependent RNA polymerase*, RdRp) (Adams i sur., 2004). U tom kontekstu su GVD, GVJ i GVK razmatrani kao jedna vrsta, budući da u CP regiji dijele sličnost od 75,9 % do 87,7 % u nt i 84,3 % do 93,9 % u aa slijedu. Bez obzira na tu visoku podudarnost u CP regiji genoma, GVJ je, za razliku od GVK, priznat kao zasebna vrsta zbog međusobne sličnosti od 64 % do 64,3 % nt i 65,5 % do 66,4 % u aa slijedu, unutar regije koja kodira protein povezan s replikacijom (eng. *replication-associated protein*, RAP) (Maree i sur., 2020). S druge strane, GVL i GVM za sada nisu priznati od strane ICTV-a zbog prevelike sličnosti s GVE, odnosno s GVH, premda još treba uzeti u obzir RAP regiju u kojoj GVM i GVH dijele 68 % nt i 74,9 % aa identičnosti (Maree i sur., 2020). Također, zbog prevelike sličnosti s GVG, odnosno s GVE, GVN i GVO još nisu priznati kao nove vrste virusa (Read

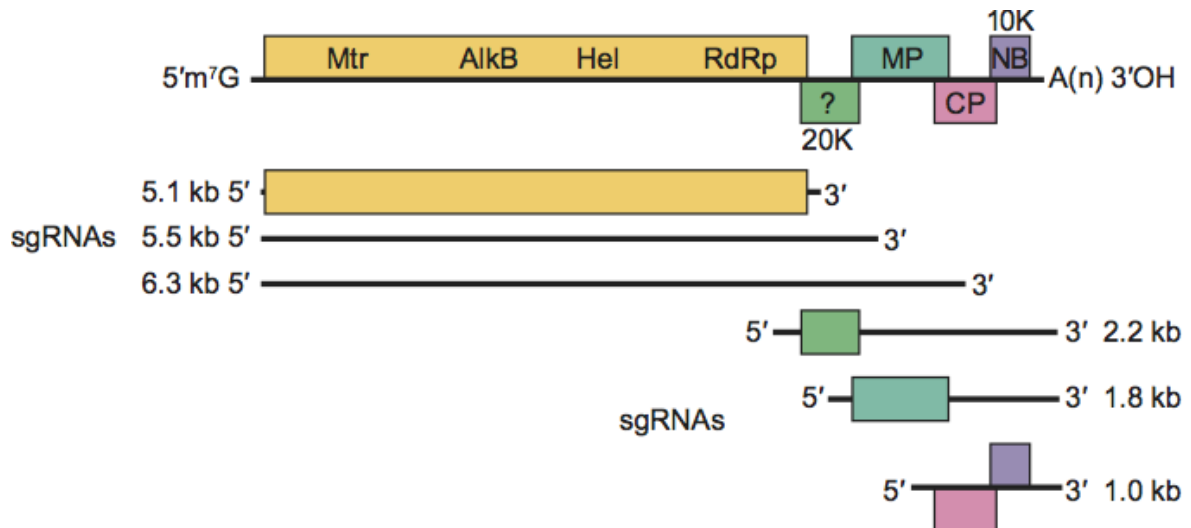
i sur., 2022). Nedavno su Silva i sur. (2022) na osnovu dubinske analize genoma predložili nove razlikovne kriterije koji prednost daju proteinu replikaze postavljajući granicu na aminokiselinskoj razini od 80%, pri čemu kod sličnosti vrsta između 78-82 % treba uključiti i dodatne kriterije razlikovanja kao što je CP regija.

2.2.3.2. Morfologija i organizacija genoma

Vitivirusi imaju filamentozan oblik virusne čestice, dužine 725 – 785 nm i promjera 12 nm, koje prema izgledu podsjećaju na uže (Slika 2.3). Genom vitivirusa je (+)ssRNA molekula, koja se sastoji od približno 7,3 – 7,6 kilobaza (eng. *kilobase*, kb) i karakterističnih pet otvorenih okvira čitanja (eng. *open reading frames*, ORF) (du Preez i sur., 2011). Prema Maree i sur. (2020), ORF1 kodira protein povezan s replikacijom (eng. *replication-associated protein*, RAP); uloga ORF2, koji je visoko konzerviran unutar roda *Vitivirus*, nije poznata; ORF3 kodira protein za pokretanje (eng. *movement protein*, MP); ORF4 kodira kapsidni protein (CP); dok ORF5 kodira protein koji veže nukleinsku kiselinu (eng. *nucleic-acid-binding protein*, NABP). Prema ICTV (2023b), ekspresija genoma se temelji na subgenomskim molekulama RNA (eng. *subgenomic RNA*, sgRNA) koje služe za ekspresiju svih ORF-ova, osim ORF5. On se eksprimira izravno s 5'-kraja genoma kao glasnička RNA (eng. *messenger RNA*, mRNA). U GVA postoji šest sgRNA različitih duljina (Slika 2.4.) u kilobaznim parovima (kb), koje u stanici stvaraju dvolančane RNA molekule (eng. *double-stranded RNA*, dsRNA) kao replikativne forme tijekom infekcije (veličine 7,6, 6,48, 5,68 i 5,1 kbp za GVA i GVD te 7,6, 6,48, 5,68 i 5,1 kbp za GVA) (Slika 2.4).



Slika 2.3. Filamentozne čestice GVA nalik na uže snimljene elektronskim mikroskopom. Oznaka predstavlja veličinu jednaku 100 nm (prema du Preez i sur., 2011).

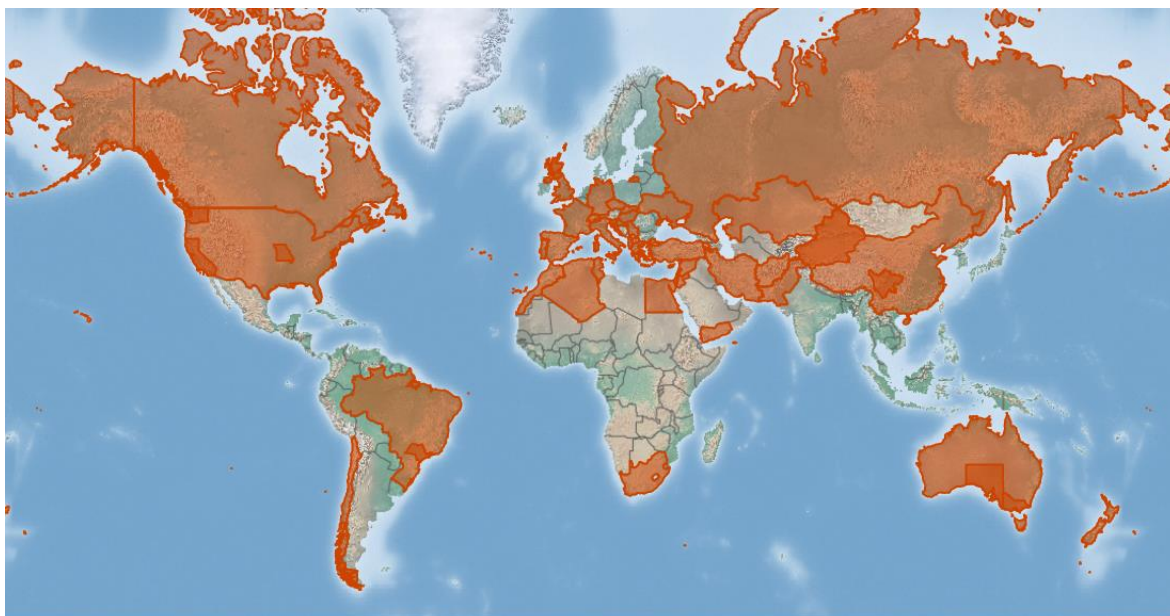


Slika 2.4. Organizacija i ekspresija genoma GVA s relativnim pozicijama otvorenih okvira čitanja (ORF), njihovim transkripcijskim produktima i subgenomskim molekulama RNA. Kratice: Mtr–metiltransferaza; AlkB–alkan hidroksilaza; Hel–helikaza; RdRp–RNA-ovisna RNA-polimeraza; MP–protein za pokretanje; CP–kapsidni protein. Izvor: ICTV, 2023. International Committee on Taxonomy of Viruses. Family: *Betaflexiviridae* (https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae; pristup 03.10.2022.).

2.2.3.3. Ekologija i epidemiologija vitivirusa vinove loze

Najbolje istraženi vitivirusi su ujedno i prvi otkriveni vitivirusi koji inficiraju vinovu lozu, GVA (Conti i sur., 1980) i GVB (Boscia i sur., 1993). Navedeni virusi su identificirani elektronskom mikroskopijom u zeljastim test biljkama roda *Nicotiana* nakon što je dokazana sposobnost njihovog prijenosa mehaničkom inokulacijom (Conti i sur., 1980; Boscia i sur., 1993). To je kasnije dokazano i za GVD (Bonavia i sur., 1996; Abou Ghanem i sur., 1997). Za razliku od tih vitivirusa, drugi vitivirusi vinove loze otkriveni su metodom HTS u vinovoj lozi diljem svijeta (Maree i sur., 2020). Osim mehaničkog prijenosa, potvrđen je i nespecifičan i semiperzistentan način prijenosa vektorima na vinovu lozu i zeljaste test biljke korištenjem kukaca iz skupine štastih uši (red *Hemiptera*, porodice *Pseudococcidae* i *Coccidae*). Prema Martelli (2017), kao vektori GVA potvrđeni su *Planococcus citri*, *Pl. ficus*, *Pseudococcus longispinus*, *P. affinis*, *Heliococcus bohemicus*, *Phenacoccus aceris* i *Neopulvinaria innumerabilis*; vektori GVB su *Ps. longispinus*, *Ps. affinis*, *Pl. ficus* i *Ph. aceris*; dok je vrsta *Pseudococcus comstocki* dokazani vektor GVE. Nedavno je lozina štastava uš (*Planococcus ficus* Sign.) potvrđena kao vektor GVH sa zaražene na bezvirusnu lozu (Jagunić i sur., 2021). Specifičnost prijenosa vitivirusa vektorima karakterizira koinfekcijski simultani prijenos s ampelovirusima, uzročnicima GLD, pri čemu se smatra da su ti virusi u sinergističkom odnosu (Rowhani i sur., 2018). Osim u vinovoj lozi, vitivirusi su detektirani u divljim slobodno živućim vrstama lozama *Vitis californica* i križancima *Vitis*

californica × *Vitis vinifera* (Klaassen i sur., 2011). Vitivirusi vinove loze smatraju se jednim od najrasprostranjenijih virusa vinove loze s dokazanom prisutnošću u svim vinogradarskim regijama svijeta (Slika 2.5).



Slika 2.5. Rasprostranjenost GVA u svijetu (označeno crveno). Izvor: CABI, 2023. Centre for Agriculture and Bioscience International. Grapevine virus A (grapevine closterovirus) (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/26189#toDistributionMaps>; pristup: 03.10.2022.).

2.2.3.4. Kompleks naboranosti drveta vinove loze (RW)

Za vitiviruse GVA i GVB se smatra da u necijepljenim biljkama vinove loze i američkim vrstama, odnosno lozama koje se uzgajaju na vlastitom korijenu, ne uzrokuju bolesti ili ih uzrokuju tek u rijetkim slučajevima, ali uz zanemariv utjecaj na vigor biljke i prinos (Reynolds i sur., 1997; Martelli i Boudon-Padieu, 2006). S druge strane, simptomi infekcije se manifestiraju nakon cijepljenja inficirane podloge i plemke, zbog čega ih se često naziva „bolestima cijepljenja“ (Mannini i Digiario, 2017). Prema Minafra i sur. (2017), takva ekspresija i interakcija s lozama upućuje na europsko podrijetlo vitivirusa, pri čemu je vinova loza mogla razviti tolerantnost na infekciju kroz zajednički koevolucijski odnos s vitivirusima. Isti autori navode da najraniji pisani podaci o simptomima na drvu vinove loze, koji bi mogli biti povezani s vitivirusima, potječu iz francuske literature s početka 20. st., što se poklapa s početkom intenzivnog korištenja cijepljenja u svrhu proizvodnje sadnog materijala. Međutim, zanimljivo je da su virusi također detektirani na područjima gdje se nije uvezao biljni materijal iz Amerike (Cipar, grčki otoci, Armenija, Jemen i Anatolija), što bi mogao biti dokaz da vitivirusi nisu došli trgovinom sa zapada (Minafra i sur., 2017). Bolest povezana s vitivirusima prvi je puta opisana u vinovoj lozi u SAD-u, pod nazivom hrapava

kora (eng. *rough bark*) (Hewitt, 1954). Slična bolest je nakon toga opisana u Italiji i Mađarskoj, gdje je nazvana naboranost drveta (tal. *legno riccio*) (Graniti i Martelli, 1965; Martelli i sur., 1967). Simptomi vidljivi na kori, nazvani plutavost kore (eng. *corky bark*), opisani su na sjemenjacima LN 33 (Couderc 1613 × Thompson Seedless) u SAD-u (Beukman i Goheen, 1965.), gdje je kasnije opisana bolest naziva bolest hrapavosti kore i jamičavost drveta vinove loze (eng. *grapevine bark and wood pitting disease*) (Hewitt i Neja, 1971). Slični nazivi simptoma uočeni u različitim zemljama upućivali su na istu etiologiju bolesti, međutim ona nije bila poznata sve do otkrića virusnih čestica u vrsti *Nicotiana clevelandii*, koja je mehanički inokulirana biljnim sokom iz loze koja je pokazivala spomenute simptome (Conti i sur., 1980). Sve promjene na drvu vinove loze koje imaju istu virusnu etiologiju kasnije su nazvane kompleks naboranosti drveta (eng. *rugose wood*, RW) (Martelli, 1993b). Osim vitivirusa GVA, GVB i GVD, uzročnikom bolesti iz RW skupine smatra se i virus naboranosti drveta podloge *Rupestris* (eng. *grapevine rupestris stem pitting-associated virus*, GRSPaV) (Meng i sur., 1998), koji je pridružen u rod *Foveavirus* (Martelli i Jelkmann, 1998) unutar iste porodice (*Betaflexiviridae*).

Danas se RW smatra jednim od četiri najvažnija i najrasprostranjenija kompleksa bolesti vinove loze u svijetu (Sabaghian i sur., 2021; Orfanidou i sur., 2021). Kompleks naboranosti drveta manifestira se kroz tri glavne bolesti koje se pojavljuju u ovisnosti o korištenom indikatoru, uključujući *Vitis rupestris* St. George, LN 33 (Couderc 1613 × *V. berlandieri*) te Kober 5BB (*V. berlandieri* × *V. riparia*). Bolesti su:

- i. plutavost kore (eng. *corky bark*, CB) uzrokovana s GVB ili GVD – internodijalne promjene na tkivu (uključujući pucanje mladica) koje se manifestiraju najbrže na LN 33 nakon cijepjenja inokuliranjem dormantnim pupom (eng. *chip budding*), uz zaostajanje u rastu, užljebljenje tkiva i pojavu žutih pjega i crvenila na listovima (Slika 2.6 A);
- ii. naboranost drveta podloge LN 33 (eng. *LN 33 stem grooving*, LNSG), nespecifična povezanost – užljebljenja drveta inokuliranih podloga LN 33, ali bez promjena na kori tipičnih za CB;
- iii. užljebljenost drveta podloge Kober (eng. *Kober stem grooving*, KSG) kojeg uzrokuje GVA – užljebljenje drveta nakon cijepjenja na podlogu Kober 5BB (Slika 2.6 B);
- iv. naboranost drveta podloge *V. rupestris* (eng. *vitis rupestris stem-pitting*, VRSP) uzrokovana s GRSPaV (Martelli, 2017; Minafra i sur., 2017).

Pored RW kompleksa, GVA je povezan s razornim bolestima na vinovoj lozi naziva bolest Syraha (eng. *Shiraz disease*, SD), koja je primijećena u JAR-u (Engelbrecht i Kasdorf, 1987; Engelbrecht i Kasdorf, 1990a) te u Australiji, gdje je nazvana Australaska

bolest Syraha (eng. *Australian Shiraz disease*, ASD) (Habibi i Randles, 2004). Simptomi SD-a podsjećaju na zarazu virusima iz GLD skupine, pri čemu dolazi do uvijanja i crvenila listova, a zaražene biljke odumiru kroz nekoliko godina (Slika 2.6 C).



Slika 2.6. Simptomi virusnih bolesti na vinovoj lozi povezani s vitivirusima: simptomi plutavosti drveta na podlozi LN 33 (A); naboranost i užljebljenja na drvetu podloge (nakon skidanja kore) ispod cijepljenog mjesta (B); simptomi bolesti Syraha (SD) na vinovoj lozi sorte 'Merlot' pred kraj vegetacijske sezone (C) (prema Minafra i sur., 2017).

Štetnost RW kompleksa najprije je vidljiva kroz utjecaj na smanjenje vigora biljke te posljedično smanjenje prinosa kao rezultat otežanog kretanja hranjiva i vode kroz biljku (Mannini i Digiaro, 2017). Posebno štetnom smatra se koinfekcija s virusima uzročnicima GLD, koji se često pojavljuju zajedno u inficiranim trsovima (Rowhani i sur., 2018). U studiji Mannini i sur. (1998), GVA je u koinfekciji s GLRaV-1 smanjio prinos za 24 – 30 % u crnoj sorti 'Nebbiolo' u Italiji, dok je koinfekcija GVA i GLRaV-3 uzrokovala narušavanje kakvoće grožđa kroz smanjenje otopljenih čvrstih tvari u soku te smanjenje količine antocijana, pri čemu je utjecaj na prinos bio zanemariv. Slični su rezultati dobiveni i u istovremenoj infekciji s GVA, GLRaV-1 i GRSPaV u navedenoj sorti, gdje je ukupan prinos bio smanjen zbog smanjene veličine grozdova, koji su ujedno imali povećan sadržaj kiselina i sevastrola u odnosu na neinficirane trsove, ali također bez utjecaja na otopljene čvrste tvari i fenolni sastav grožđa (Giribaldi i sur., 2011). Za GVB se smatra da utječe na prinos, ali još više na vigor trsa u odnosu na GVA, s obzirom da je u inficiranim trsovima sorata 'Chardonnay' i 'Albarossa' zabilježen 35 %, odnosno 14 % slabiji razvoj nadzemne mase (Mannini i Digiaro, 2017).

Najštetniji utjecaj RW kompleksa na vinovu lozu očituje se skraćivanjem životnog vijeka trsova te njihovim odumiranjem. Prema Savino i sur. (1985), šest godina nakon cijepjenja plemki zaraženih s RW na šest različitih podloga primijećeno je 60 % odumrlih

biljaka ili biljaka bez prinosa, neovisno o korištenom tipu podloge. Također, 1998. godine u sorti 'Refošk' u Sloveniji je primijećeno odumiranje simptomatskih trsova u stopi od 17,9 % po hektaru (trsovi kod koji su se simptomi pojavili na podlozi) te 7,6 % (pojava simptoma na plemci) u usporedbi s 2,5 % odumrlih biljaka kod kojih nisu primijećeni simptomi RW-a (Tomažić i sur., 2005).

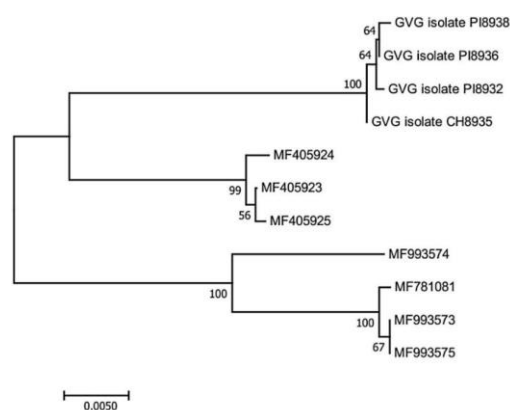
Prema Mannini i Digiaro (2017), utjecaj RW kompleksa na vinovu lozu varira u ovisnosti o vrsti virusa i soju, o korištenoj kombinaciji podloge i plemke te o klimatskom području uzgoja vinove loze, s time da su simptomi i utjecaj virusa na vinovu lozu manje izraženi u hladnijoj i vlažnijoj klimi. Značaj podloge dobro je razjašnjen na primjeru zaraze s GRSPaV, za kojeg se smatra da podloga ima ključnu ulogu u ekspresiji simptoma i štetnom utjecaju na lozu. Signifikantan utjecaj GRSPaV na prinos i sadržaj šećera u grožđu sorte 'Cabernet Sauvignon' u Italiji primijećen je u slučaju cijepjenja na podloge 110 R i 3309 C, dok cijepjenje na podloge Kober 5BB, 1103 P, 101–14 Mgt i *V. rupestris* St. George nije rezultiralo negativnim utjecajem virusa (Golino i sur., 2009). Podloga se također smatra ključnom u manifestiranju učinka inkompatibilnosti podloge i plemke nakon cijepjenja. Ovaj efekt, koji dovodi do odumiranja cijepova, primijećen je prilikom cijepjenja plemke koinficirane s vitivirusima i ampelovirusima na podloge, a bolest je nazvana "virusima inducirano odumiranje podloge" (eng. *virus-induced rootstock decline*, VIRD) (Rowhani i sur., 2017a). VIRD je manifestiran nakon cijepjenja plemki koinficiranih s GVB i GLRaV-2 na podlogu Freedom (Dogridge x 1613 Couderc), dok se podloga Couderc 1613 pokazala rezistentnom, a podloge AXR-1 (*V. vinifera* x *V. rupestris*) i St. George (*V. rupestris*) kao tolerantne na zarazu (Golino i sur., 2003). Inkompatibilnost se nije manifestirala u trsovima s pojedinačnim infekcijama spomenutih virusa (Golino i sur., 2000). Slična pojava je primijećena u koinfekciji GVA s GLRaV-1 prilikom cijepjenja „na zrelo“ i dormantnim pupovima na podloge 3309 Couderc, 101–14 Mtg, Freedom i 420A Mgt, pri čemu su se pojavili simptomi tipični za GLD te odumiranje trsova 1 – 2 godine nakon cijepjenja (Uyemoto i Rowhani, 2003; Golino i sur., 2015). Nadalje, utjecaj soja virusa vidljiv je na primjeru bolesti Syraha, pri čemu je više varijanata GVA izolirano iz simptomatske loze (Goszczyński i Jooste, 2003a), nakon čega je ustanovljeno da varijante iz molekularne grupe II naspram varijanata iz molekularne grupe III uzrokuju simptome bolesti SD (Goszczyński, 2007) i ASD (Goszczyński i Habili, 2012).

Za razliku od spomenutih GVA, GVB i GVD koji su povezani s nekom od bolesti RW kompleksa, GVE i GVF su također detektirani u RW-simptomatičnoj vinovoj lozi, ali njihova interakcija s vinovom lozom i uloga u razvoju i manifestiranju RW kompleksa još nije razjašnjena (Mannini i Digiaro, 2017).

2.2.3.5. G-virus vinove loze (GVG)

G-virus vinove loze (eng. grapevine virus G, GVG) otkriven je metodom HTS na Novom Zelandu 2017. godine u sorti 'Chardonnay' podrijetlom iz Francuske (Blouin i sur., 2017a). Sekvencirani genom izolata VID561 (GenBank pristupni kod – MF405923) bio je veličine 7496 nukleotida organiziranih u 5 ORFova s konzerviranim regijama sličnima rodu *Vitivirus* u kojega je klasificiran. Najveća sličnost referentnog izolata od 65 % na nukleotidnoj (nt) i 67 % na aminokiselinskoj (aa) razini unutar CP regije genoma dobivena je u usporedbi s virusom lista *Agava tequilana* (agava tequilana leaf virus, ATLV; rod *Vitivirus*), dok je u usporedbi s GVE sličnost u istoj regiji iznosila 59 % u nt i 55 % u aa (Slika 2.7).

Poslije otkrića na Novom Zelandu, GVG je detektiran metodom HTS u Hrvatskoj (kao drugi nalaz u svijetu), u autohtonim sortama 'Ljutun' (VLJ-178, MF781081), 'Dobričić' (VD-102, MF993574), 'Vlaška' (VVL 101, MF993575) i 'Babica' (VB-108, MF993573), podrijetlom iz zbirke virusa vinove loze SZAF. Hrvatski izolati su unutar RdRp regije genoma pokazali međusobnu sličnost 95 – 99 % u nt, a u usporedbi s izolatima iz Novog Zelanda sličnost od 73 % (nt) (Vončina & Almeida, 2018). Kao treći nalaz u svijetu GVG je detektiran u komercijalnim vinogradima okruga Santa Clara (Kalifornija, SAD), u četiri trsa sorata 'Pinot crni' i 'Chardonnay' (Diaz-Lara i sur., 2019). Okarakterizirani izolati (PI8938 – MK017693, PI8936 – MK017692, CH8935 – MK017691 i PI8932 – MK017690) pokazali su međusobnu nukleotidnu sličnost od 99 % u RdRp i CP regiji te nukleotidnu sličnost s referentnim izolatom VID561 (MF405923) iz Novog Zelanda od 78 % u RdRp i 92 % u CP regiji (Diaz-Lara i sur., 2019). Slika 2.7 prikazuje filogenetsku analizu do sada poznatih GVG izolata u CP regiji genoma te njihovo grupiranje u filogenetske grupe prema podrijetlu.

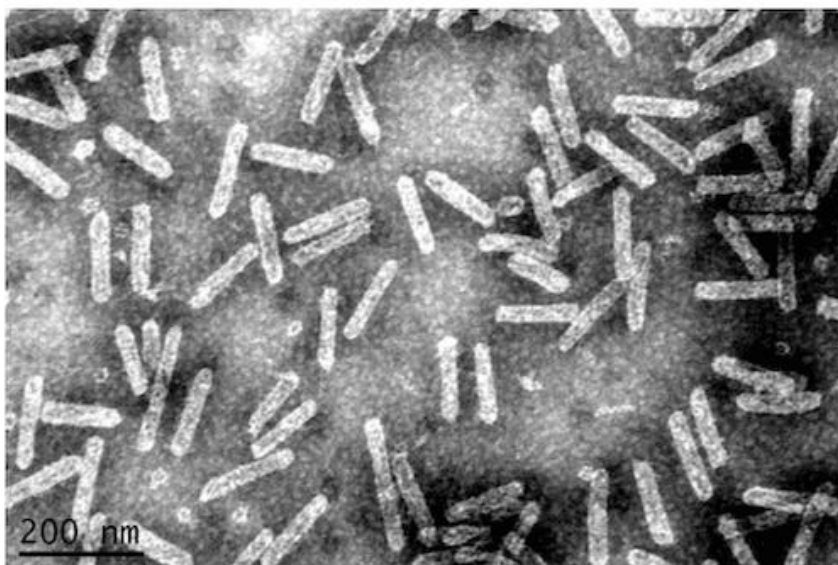


Slika 2.7. Filogenetsko stablo konstruirano statističkom metodom sparivanja susjeda (NJ) na osnovi nukleotidnih sekvenci GVG izolata podrijetlom iz SAD-a (PI8938, PI8936, PI8932, CH8935), Novog Zelanda (MF405924, MF405923, MF405925) i Hrvatske (MF993574, MF781081, MF993573, MF993575) u regiji genoma kapsidnog proteina (CP; 507 nukleotida). Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu (prema Diaz-Lara i sur., 2019).

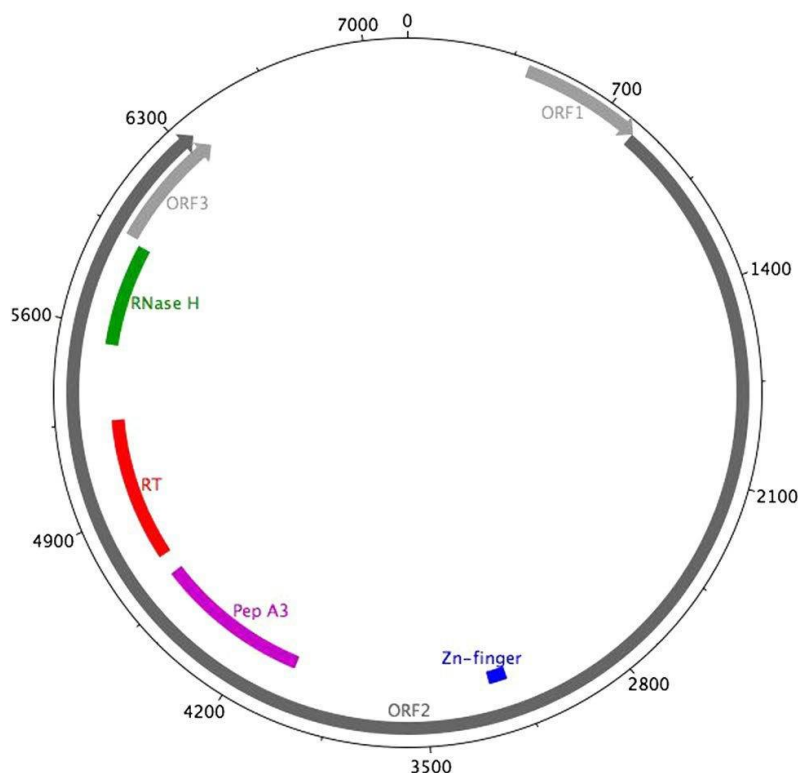
2.2.4. Rod *Badnavirus*

Badnavirusi (rod *Badnavirus*, porodica *Caulimoviridae*) predstavljaju veliku i dugo poznatu skupinu biljnih dvolančanih DNA virusa s reverznom transkripcijom (eng. *reverse transcribing double-stranded DNA viruses*, dsDNA-RT) koji inficiraju mono- i dikotiledonske biljne vrste (Bhat i sur., 2016). Tipični su predstavnici patogena tropskih i suptropskih kultura poput: banane (MY virus crtičavosti banane, eng. banana streak MY virus – BSMYV), crnog papra (virus žutog šarenila papra, eng. piper yellow mottle virus – PYMV), kakaa (virus zadebljelih izbojaka kakaovca, eng. cacao swollen shoot virus – CSSV), citrusa (virus žutog mozaika citrusa, eng. citrus yellow mosaic virus – CYMV), šećerne trske (baciliformni virus šećerne trske, eng. sugarcane bacilliform virus – SCBV), tara (baciliformni virus tara, eng. taro bacilliform virus – TaBV), jama (*Dioscorea* baciliformni SN virus, eng. *Dioscorea* bacilliform SN virus, DBSNV) i dr. (Lockhart i Olszewski, 1994; Borah i sur., 2013). Osim cijepljenjem i sadnim materijalom, badnavirusi se lisnim ili štitastim ušima mogu prenositi s jednog na drugog domaćina na kojima uzrokuju ekonomske štete do 90 % (Bhat i sur., 2016). Međutim, badnavirusi predstavljaju noviju skupinu virusa patogena vinove loze, budući da je prvi badnavirus u vinovoj lozi otkriven tek 2011. godine i to kao prvi predstavnik porodice *Caulimoviridae* i općenito kao prvi DNA virus vinove loze (Zhang i sur., 2011). Prema zadnjem popisu priznatih virusa (*Master Species List – MSL37*) ICTV-a (ICTV, 2023a), od 68 vrsta virusa pridruženih u rod *Badnavirus*, tri virusa inficiraju vinovu lozu: GVCV, GRLDaV i GBV-1 (Zhang i sur., 2011; Maliogka i sur., 2015b; Vončina i Almeida, 2018).

Prema Bhat i sur. (2016), badnavirusi imaju jednostavno građenu virusnu česticu baciliformnog oblika i uniformne širine (30 nm) i dužine (120 – 150 nm) (Slika 2.8). Monopartitni genom badnavirusa je prstenasta dsDNA veličine 7,2 – 9,2 kbp. koja se kod većine predstavnika sastoji od tri ORF-a (Slika 2.9) te se prevodi preko prijenosne RNA (eng. *transfer RNA*, tRNA) dulje od genoma. Također, poznato je da badnavirusi mogu biti prisutni u vidu sekvenci genoma integriranih u genom domaćina (tzv. endogeni badnavirusi) te se aktivirati u stresnim situacijama, kao što su one izazvane abiotskim ili biotskim čimbenicima (Hohn i sur., 2008).



Slika 2.8. Elektronska mikrofografija tipičnih baciliformnih čestica badnavirusa na primjeru MY virusa crtičavosti banane (eng. banana streak MY virus, BSMYV). Izvor: ICTV, 2023. International Committee on Taxonomy of Viruses. Family: *Caulimoviridae*. (<https://ictv.global/report/chapter/caulimoviridae/caulimoviridae>; pristup: 04.10.2022.)



Slika 2.9. Prikaz organizacije genoma badnavirusa na primjeru badnavirusa vinove loze 1 (GBV-1; VLJ-178 – MF781082). Prikazana je virusna DNA (crna linija) s pozicijama otvorenih okvira čitanja (ORF) te funkcionalnim motivima (obojeno) u ORF2 poliproteinu. Kratice: RNase H–ribonukleaza H; RT–reverzna transkriptaza; Pep A3–peptidaza virusa mozaika cvjetače; Zn-finger–protein s cinkovim „prstom“ (prema Vončina i Almeida, 2018).

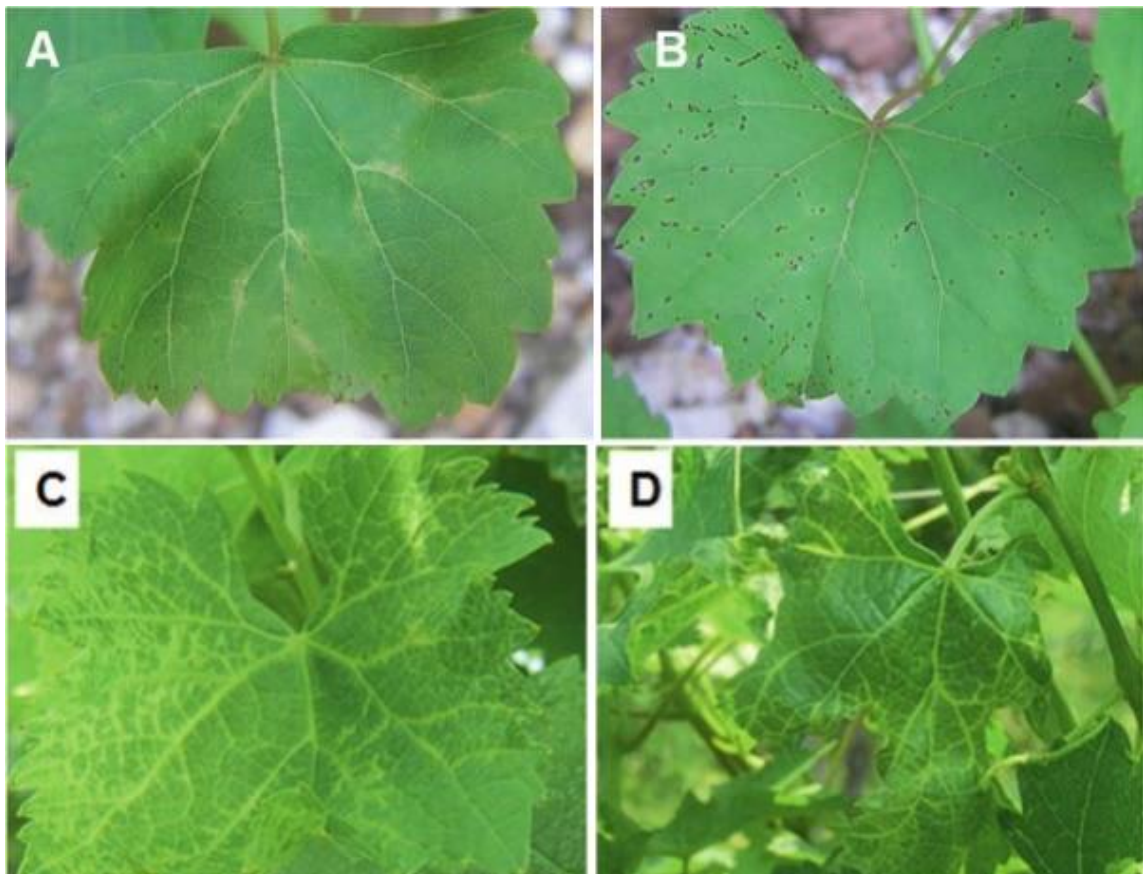
2.2.4.1. Virus prosvjetljivanja žila vinove loze (GVCV)

Virus prosvjetljivanja žila vinove loze (eng. grapevine vein clearing virus, GVCV) identificiran je 2011. godine u saveznoj državi Missouri (SAD) metodom HTS, u sorti 'Chardonnay' koja je pokazivala simptome bolesti prosvjetljivanja žila i odumiranja vinove loze (eng. *grapevine clearing and vine decline disease*) (Zhang i sur., 2011). Simptomi navedene bolesti, s opisima kratkih internodija i deformiranih mladica i listova s prosvjetljenim žilama (uz smanjenje vigora i prinosa), su na istom uzgojnom području sorte 'Chardonnay' opisani još 2004. Izvorni simptomatični vinograd je 2007. godine iskrčen radi odumiranja trsova od posljedica zaraze (Qiu i sur., 2007). Prema Qiu i Schoelz (2017), slični su simptomi uočeni i u 90-im godinama prošlog stoljeća u vinogradima savezne države Arkansas (SAD) u sorti 'Vidal Blanc', što je potvrđeno vizualnim pregledom 2012. godine nakon otkrića uzročnika GVCV. Međutim, Lunden i sur. (2009) su u navedenoj simptomatskoj lozi detektirali GRSPaV te nepoviruse GFLV i virus prstenaste pjegavosti rajčice (eng. tomato ringspot virus, ToRSV) te je zbog zaključeno da simptomi prosvjetljivanja žila ne predstavljaju novu bolest, nego da se radi o kombinaciji više različitih virusnih uzročnika. Tada je to mišljenje potkrijepljeno i činjenicom da su u vinovoj lozi sredinom dvadesetog stoljeća uočeni simptom prosvjetljivanja žila, ali su isti kasnije pripisani GFLV (Qiu i Schoelz, 2017). Konačno je 2011. godine navedena bolest pripisana novootkrivenom badnavirusu GVCV (Zhang i sur., 2011).

Guo i sur. (2014) potvrdili su rasprostranjenost GVCV u vinogradima saveznih država Missouri, Illinois i Indiana, u sortama 'Cabernet Sauvignon', 'Chardonnay', 'Chardonel', 'Cabernet Franc' i 'Riesling'. U istoj je studiji potvrđen prijenos virusa cijepljenjem „na zeleno“ na sorte 'Vidal Blanc', 'Cayuga White' i 'Traminette', ali ne i na sortu 'Chambourcin', zbog čega se pretpostavlja da je ona rezistentna na GVCV. Sličan je efekt rezistentnosti primijećen i u sorti 'Norton' (Qiu i sur., 2020). Pored vinove loze, GVCV je detektiran u divljoj lozi *V. rupestris* u saveznoj državi Oklahoma, prilikom čega je potvrđena sličnost između tih izolata i izolata iz vinove loze (Beach i sur., 2017). Prema Cieniewicz i sur. (2020), GVCV je detektiran i u divljim vrstama loza *V. cinerea*, *V. palmata*, te *V. vulpina*, u uzorcima sakupljenim iz prirodnih staništa. Također, utvrđeno je da je GVCV široko rasprostranjen u divljoj vrsti *Ampelopsis cordata* te je tom prilikom potvrđen i prijenos korištenjem lisnih uši vinove loze (*Aphis illinoisensis* Shimer) na sortu 'Chardonel' (Petersen i sur., 2019). Nakon toga je potvrđena široka rasprostranjenost GVCV u kolonijama i pojedinačnim jedinkama navedenih lisnih uši, u kojima su pronađene različite varijante virusa (Uhls i sur., 2021). Danas se GVCV smatra jednim od ekonomski najznačajnijih

novootkrivenih virusa vinove loze s dokazanom rasprostranjenošću u četirima saveznm državama u SAD-u: Indiana, Illinois, Missouri i Arkansas (Cieniewicz i sur., 2020).

Prema Qiu i Schoelz (2017), simptomi bolesti prosvjetljivanja žila i odumiranja vinove loze manifestiraju se u ovisnosti o razdoblju vegetacije, vrsti loze (vinova loza ili divlja loza) te sorti, a mogu se vidjeti na svim zelenim dijelovima biljke. Glavni dijagnostički simptom navedene bolesti je prosvjetljivanje žila mladih listova, a može se pojaviti u blagoj formi (na sorti 'Vidal Blanc'), normalnoj ili jako izraženoj formi na cijelom listu ('Cabernet Sauvignon' i 'Cabernet Franc'). Također, prva dva do tri lista na mladici često ostaju zakržljala i deformirana, te se, kako listovi stare, simptomi formiraju u mozaik sa žutim šarama te pjegavost i nekrozu na indikatorskim biljkama (Slika 2.10). Prema autorima simptomi se manifestiraju i "cik-cak" rastom mladica te skraćivanjem internodija, ali i deformacijom i diskoloracijom (smeđenje) bobica. Zaražene biljke su smanjenog vigora (što uzrokuje smanjenje prinosa) te odumiru, što za posljedicu ima krčenje vinograda (Qiu i sur., 2007).

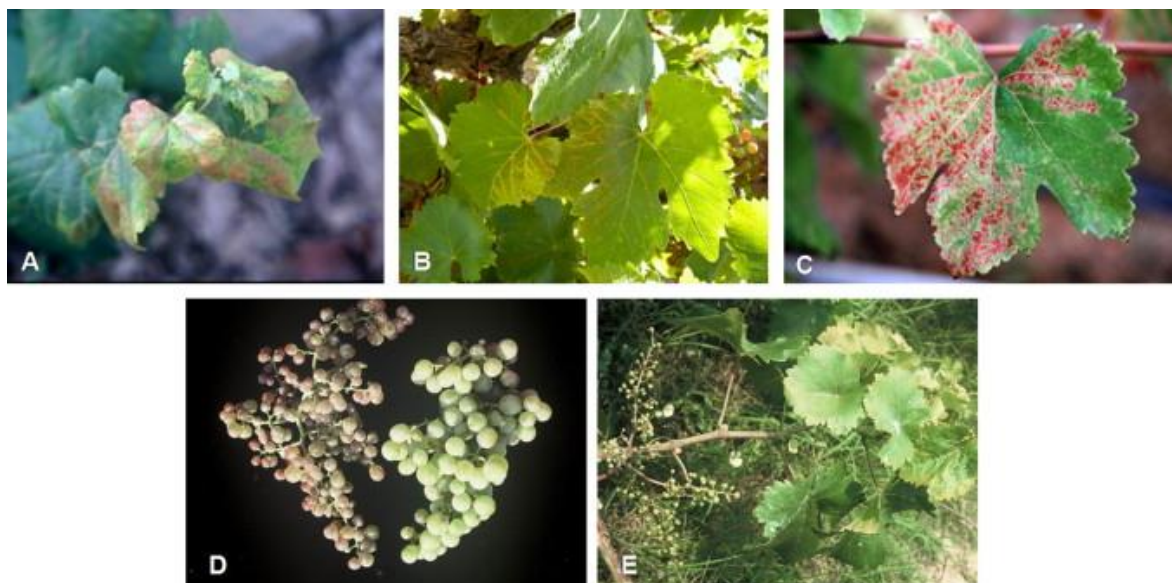


Slika 2.10. Simptomi bolesti prosvjetljivanja žila i odumiranja vinove loze koju uzrokuje GVCV: prosvjetljivanje žila (A) i nekrotična pjegavost na starim listovima (B) vrste *V. rupestris*; prosvjetljivanje žila sa žućenjem na sorti 'Vidal Blanc' (C); prosvjetljivanje žila i deformacija lista na sorti 'Cabernet Sauvignon' (D) (prema Qiu i Schoelz, 2017).

2.2.4.2. Virus povezan s diskoloracijom lista sorte 'Roditis' (GRLDaV)

Simptomi virusne bolesti, naziva diskoloracija lista sorte Roditis (eng. *Roditis leaf discoloration*, RLD), primijećeni su u ranim te opisani u kasnim 80-im godinama prošlog stoljeća, na sortama vinove loze 'Roditis' i 'Sevastiano' u Grčkoj (Rumbos i Avgelis, 1989). Prema istim autorima, simptomi RLD-a se pojavljuju krajem ljeta, a mogu se podijeliti u tri skupine: (i) svijetlo-zelene, žute i crvene zone na listovima uzduž žila prvog, drugog i trećeg reda, uz žućenje rubnih žila lista; (ii) međužilna kloroza, žućenje i crvenilo jednog dijela ili cijelog lista; (iii) deformacije plojke lista zbog abnormalne enacije popraćene crvenilom i uvijanjem deformiranog područja uz rub lista (najčešće na naličju lista pored peteljke). Uzročnik je u istoj studiji uspješno inokuliran metodom cijepljenja dormantnim pupom (eng. *chip-budding*) na sortu 'Mission', na kojoj su kasnije primijećeni simptomi RLD-a, a uspješan je bio i mehanički prijenos na vrste *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa* i *N. benthamiana*. Posljedica zaraze s RLD je smanjena veličina grozdova uz sporije dozrijevanje i neobojenost bobica, što rezultira smanjenim sadržajem šećera u grožđu (Rumbos i Avgelis, 1989).

Primjenom seroloških metoda na simptomatičnoj vinovoj lozi nastojalo se povezati simptome bolesti RLD s različitim virusnim uzročnicima. Tom metodom su najprije detektirani virus išaranosti karanfila (eng. *carnation mottle virus*, CarMV) (Avgelis i Rumbos, 1991) te GFLV (Rumbos i Avgelis, 1993), a kasnije GVB (Avgelis i sur., 2006). Prava etiologija bolesti ostala je nepoznata sve do 2015. godine i otkrića badnavirusa primjenom metode HTS u sorti 'Roditis' u Grčkoj (Maliogka i sur., 2015b). Na temelju simptoma (Slika 2.11) i domaćina, patogen je nazvan virus povezan s diskoloracijom lista sorte Roditis (eng. *grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus*, GRLDaV). Tom je prilikom dokazan i mehanički prijenos GRLDaV na zeljaste domaćine *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. rustica*, i *Physalis floridana*, a osim u sorti 'Roditis', virus je detektiran i u sortama 'Agiorgitiko' i 'Italia' (Maliogka i sur., 2015b).



Slika 2.11. Simptomi diskoloracije lista sorte 'Roditis' (RLD) uzrokovanih badnavirusom GRLDaV: simptomi bolesti na listovima (A – C); simptomi bolesti na grozdovima (D i E). Desni grozd (D) pripada nezaraženoj biljci (prema Maliogka i sur., 2015b).

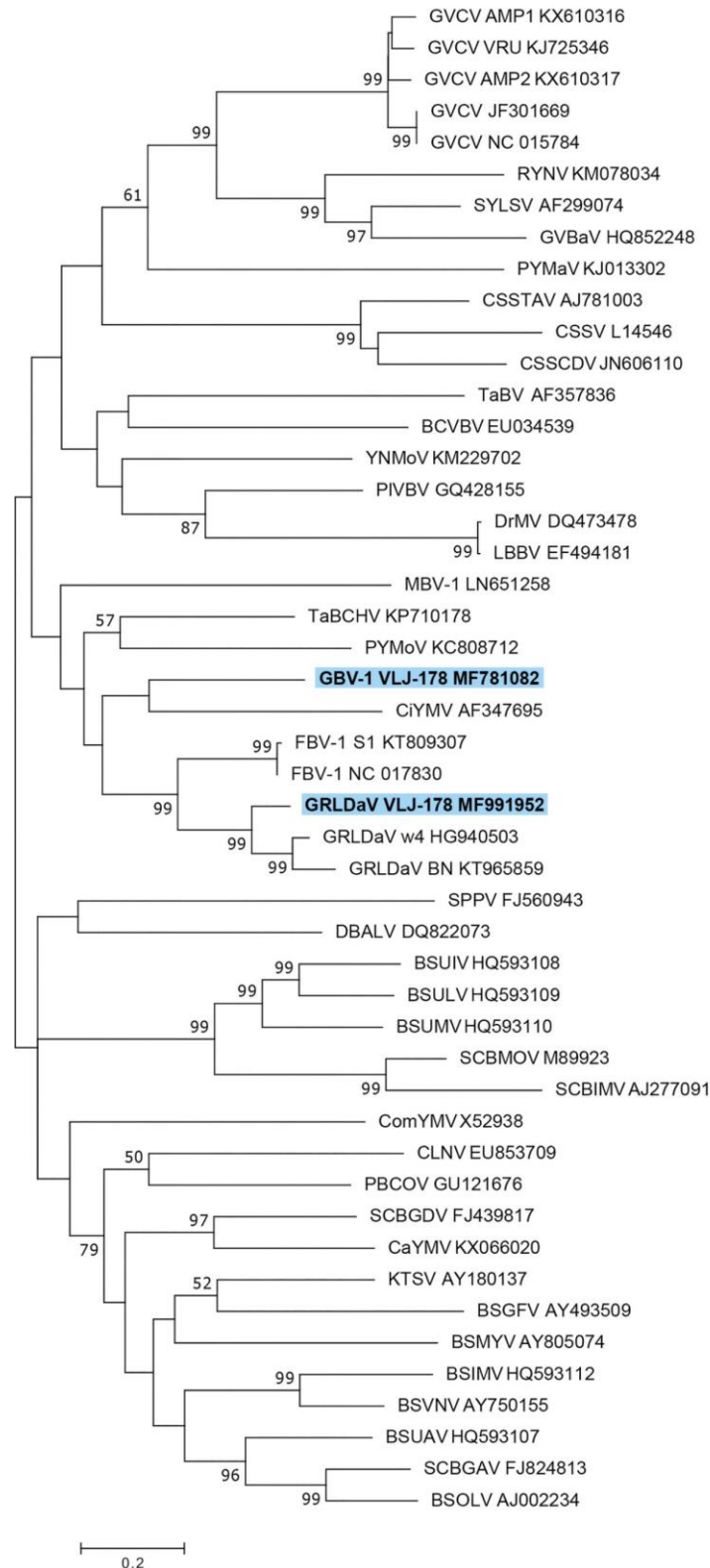
Otkriće GRLDaV proglašeno je „fitosanitarnim izazovom za vinogradarstvo Mediterana“ (CIHEAM, 2015). Iste je godine virus metodom HTS detektiran u asimptomatičnom trsu sorte 'Bombino Nero' u Italiji (Chiumenti i sur., 2015). Nakon toga je uslijedio prvi nalaz u Hrvatskoj (Vončina i Almeida, 2018), Turskoj (Ulubaş Serçe i sur., 2018) te Južnoj Africi (Bester i sur., 2021). Potvrđen je prijenos GRLDaV lozinom štitastom uši *Pl. ficus* (Ekemen, 2021). Zbog navedenih šteta koje uzrokuje u proizvodnji te zbog opasnosti od rasprostranjivanja izvan zemalja u kojima je detektiran (Slika 2.12), EPPO je GRLDaV uvrstio na listu upozorenja u svrhu bolje kontrole unutar Europe (EPPO, 2022). Za pouzdanije otkrivanje zaraze prilikom testiranja većeg broja uzoraka razvijen je protokol PCR u stvarnom vremenu, korištenjem kojeg je virus detektiran u štitastim ušima *Pl. citri* i *Pseudococcus viburni* koje su bile prisutne na zaraženim biljkama (Morán i sur., 2020). Prema upozorenjima, zemlje poput Ukrajine napravile su analize rizika od unosa i rasprostranjivanja GRLDaV kao ekonomski štetnog patogena vinove loze (Klechkovskiy i sur., 2022). Bez obzira na to, nalazi ovog virusa potvrđeni su i u asimptomatičnim biljkama vinove loze (Chiumenti i sur., 2015) kao i u asimptomatičnim zeljastim test biljkama *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* i *N. rustica* nakon provedene mehaničke inokulacije (Maliogka i sur., 2015b). Zbog navedenog su potrebna dodatna istraživanja u kojima bi se još preciznije utvrdila uloga GRLDaV na ekspresiju simptoma GLD te negativan utjecaj na vinogradarsku proizvodnju.



Slika 2.12. Rasprostranjenost GRLDaV u svijetu (označeno crveno – nije označena JAR). Izvor: CABI, 2023. Centre for Agriculture and Bioscience International. Grapevine Roditis leaf discoloration associated virus (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/11285332#toDistributionMaps>; pristup: 05.10.2022.).

2.2.4.3. Badnavirus vinove loze 1 (GBV-1)

Treći po redu badnavirus vinove loze, nazvan badnavirus vinove loze 1 (eng. grapevine badnavirus 1, GBV-1), otkriven je metodom HTS u hrvatskim autohtonim sortama 'Ljutun' (VLJ-178, MF781082) i 'Vlaška' (VVL-101) koji su sastavni dio zbirke virusa vinove loze SZAF (Vončina i Almeida, 2018). Prema autorima, RT/RNaza H regija genoma virusa pokazala je najveću sličnost na nukleotidnoj razini s GRLDaV od 76 % te je zbog identičnosti manje od 80 % pretpostavljeno da se radi o novom virusu. Filogenetska analiza potvrdila je genetsku različitost te se novootkriveni virus pozicionirao u zasebnu grupu na filogenetskom stablu, pri čemu je najveću sličnost pokazao s virusom žutog mozaika citrusa (eng. citrus yellow mosaic virus, CiYMV, AF347695), jasno se distancirajući od ostalih badnavirusa vinove loze – GVCV te GRLDaV (Slika 2.13).



Slika 2.13. Filogenetsko stablo pripadnika roda *Badnavirus*, konstruirano statističkom metodom najveće vjerojatnosti (ML) na temelju nukleotidnih sekvenci RT/RNaza H regije genoma, pokazuje pozicioniranje GBV-1 izolata VLJ-178 (MF81082) u zasebnu grupu od ostalih badnavirusa koji inficiraju vinovu lozu – posebno naznačen hrvatski GRLDaV izolat VLJ-178 (MF991952) utvrđen u istoj lozi u koinfekciji s GBV-1. Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu (prema Vončina i Almeida, 2018).

2.3. Metode detekcije virusa vinove loze

Istraživanja vezana uz viruse vinove loze te implementacija mjera kontrole virusnih bolesti ovise o preciznoj dijagnostici virusa u zaraženoj vinovoj lozi, ali i matičnim biljkama podloga i plemki namijenjenih proizvodnji sadnog materijala. Osjetljivost i/ili uspješnost odabrane/razvijene detekcijske metode, osim o dizajnu, ovisi i o odabiru odgovarajućeg termina uzorkovanja i biljnog tkiva, što je usko povezano s dokazanim sezonskim varijacijama titra virusa u vinovoj lozi i podlogama (Fiore i sur., 2009; Krebelj i sur., 2015; Gasparro i sur., 2019; Shabaniyan i sur., 2020). Metode detekcije virusa dijele se na biološke (cijepjenje, mehanička inokulacija), serološke (najčešće korištena imunoenzimska metoda na čvrstoj fazi, eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) te molekularne (PCR, HTS).

Biološki testovi smatraju se najstarijim primjenjivanim metodama detekcije virusa, a uključuju prijenos virusa s vinove loze na zeljaste ili drvenaste indikatore koji na virusnu infekciju u uvjetima plastenika reagiraju tipičnim simptomima i/ili u kraćem vremenskom razdoblju u usporedbi s vinovom lozom u nasadu (Rowhani i sur., 2017b). Poznati zeljasti indikatori su vrste iz roda *Nicotiana* i *Chenopodium*, poput *N. benthamiana* i *C. quinoa*, koje se koriste kao test biljke u postupku mehaničke inokulacije virusa vinove loze iz rodova *Nepovirus*, *Closterovirus* i *Vitivirus* (Nölke i sur., 2009; Liu i sur., 2009; Boscia i sur., 1993). Na infekciju virusima iz spomenutih rodova zeljasti indikatori mogu reagirati različitim lokalnim i/ili sistemskim simptomima već unutar 7 – 10 dana (Martelli, 1993c; Rowhani i sur., 2017). Nasuprot tome, za viruse iz porodica *Closteroviridae*, *Betaflexiviridae*, *Tymoviridae* i *Geminiviridae* utvrđeno je pojavljivanje dijagnostičkih simptoma na drvenastim indikatorima (vinova loza, američke vrste i hibridi) koji se mogu inokulirati metodama cijepjenja „na zrelo“ (rozgve), cijepjenja „na zeleno“ (mladice), cijepjenja „na zrelo“ pupovima u mirovanju (Rowhani i sur., 2017b) te cijepljenjem „zeleno na zrelo“, odnosno zelenim pupovima tehnikom inokuliranja na T-spoj pod koru (eng. *T-budding*). Ovisno o korištenoj metodi, vrsti indikatora i virusu, prvi se simptomi pojavljuju u razdoblju 2 – 6 tjedana, pa sve do 2 godine (Martelli, 1993d). Biološki testovi, za koje nije potrebno dugotrajno razvijanje metoda detekcije i velika financijska sredstva, koriste se za detekciju novootkrivenih virusa vinove loze, kao i za viruse koji uzrokuju slabije izražene simptome ili latentne zaraze (Gugerli, 2000; Saldarelli i sur., 2015). S druge strane, biološki testovi nisu pogodni za studije koje utvrđuju sanitarni status vinove loze, niti za detekciju virusa u velikom broju biljaka (Zherdev i sur., 2018), budući da njihova izvedba zahtijeva puno prostora i strogu higijenu u plasteniku, kao i fizičku odvojenost od neinokuliranih biljaka.

Izravna detekcija virusa vinove loze iz uzoraka tkiva prvi puta je korištena u studiji Clark i Adams (1977), pomoću nedugo prije razvijene imunoenzimske metode ELISA (Engvall i Perlmann, 1971). Princip detekcije metodom ELISA bazira se na sposobnosti imunokemijskog povezivanja jednog ili više tipova monoklonskih ili poliklonskih protutijela (ovisno o izvedbi) s virusnim antigenom (Ag) na čvrstoj fazi (Zherdev i sur., 2018). Komercijalni ELISA kompleti razvijeni su za detekciju tri ampelovirusa (GLRaV-1, GLRaV-3, GLRaV-4), jednog klosterovirusa (GLRaV-2), dva nepovirusa (GFLV i ArMV) i dva vitivirusa (GVA i GVB) (Blouin i sur., 2017) te se smatraju pristupačnim i dovoljno osjetljivim protokolima u istraživanjima rasprostranjenosti navedenih virusa (Rakhshandehroo i sur., 2005; Vončina i sur., 2019). Glavni nedostaci metode ELISA su nemogućnost dobivanja informacija o genomu virusa (sekvenciranje) te veliki troškovi razvoja metode, koji najviše ovise o purifikaciji virusa (Blouin i sur., 2017). Zbog navedenog, detekcija novootkrivenih virusa usmjerena je na razvoj molekularnih metoda baziranih na lančanoj reakciji polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) koje se smatraju pouzdanijim i barem 100 puta osjetljivijim metodama u usporedbi s metodom ELISA (Sefc i sur., 2000), a temelje se na umnažanju odabranog odsječka DNA, ili RNA prethodno prepisane u DNA (eng. *reverse transcription*, RT). Zajednički korak u detekciji virusa serološkim i molekularnim metodama je dobivanje homogenata biljnog materijala, no za razliku od metode ELISA, različite tvari u tkivu vinove loze mogu značajno utjecati na izvedbu molekularnih metoda (Zherdev i sur., 2018).

Molekularne metode detekcije smatraju se visoko sofisticiranim metodama čija osjetljivost ponajprije ovisi o kvaliteti izolirane nukleinske kiseline (Xiao i sur., 2015). Izolacija nukleinskih kiselina iz tkiva drvenastih domaćina, poput vinove loze, predstavlja izazov zbog velike koncentracije prisutnih polifenolnih i polisaharidnih spojeva koji mogu inhibirati PCR reakciju preko inhibicije enzima reverzne transkriptaze i *Taq* polimeraze (Nassuth i sur., 2000). Stoga je jedan od glavnih zadataka izolacijskih protokola ukloniti i/ili inaktivirati navedene spojeve iz konačnog produkta, što, ovisno o uspješnosti, kao posljedicu ima različitu učinkovitost detekcije (Osman i sur., 2012). Metode izolacije nukleinskih kiselina mogu se podijeliti na komercijalne komplete za izolaciju RNA i DNA (eng. *column-based methods*) te na konvencionalne metode. Komercijalno dostupni kompleti sadrže membrane (kolone) sa silicijevim dioksidom koje, pomoću pripremljenih pufera, filtriraju nečistoće iz uzorka omogućavajući visok prinos i čistoću nukleinskih kiselina bez upotrebe organskih otapala (Xiao i sur., 2015). Konvencionalne metode smatraju se jeftinijima, a sastoje od pufera i otopina koji se pripremaju prije izolacije, a obično sadrže surfaktante, poput natrijevog dodecil-sulfata (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) ili cetilmetilamonijevog bromida (eng. *cetyltrimethylammonium bromide*, CTAB), organske

komponente (kloroform ili fenol) te reducirajuće (npr. 2-merkaptoetanol ili ditiotreitol) ili denaturirajuće agense (npr. gvanidinijev izotiocijanat) (Gambino i sur., 2008). Osim konvencionalnih metoda koje koriste organske komponente za odvajanje nečistoća od nukleinskih kiselina, postoje i tzv. „grube“ metode izolacije (eng. *crude methods*) kojima se polifenolni i polisaharidni spojevi inaktiviraju u homogeniziranom ekstraktu, najčešće korištenjem vodotopivog polimera polivinilpirolidona (eng. *polyvinilpirolidone*, PVP). Jedna od takvih izvedbi izolacije ukupnih nukleinskih kiselina (eng. *total nucleic acids*, TNA) je metoda glicin-EDTA-natrij (eng. *glycin-EDTA-sodium*, GES) (Rowhani i sur., 2000). U dijagnostici biljnih bolesti molekularne su metode prvotno korištene u detekciji patogena s DNA genomom (Hanson i French, 1993), temeljem mogućnosti umnažanja DNA metodom PCR u uvjetima „*in vitro*“ (Mullis i sur., 1986). Međutim, prvotna dijagnostika virusa vinove loze odnosila se na ranije otkrivene i brojnije RNA viruse, koji su testirani lančanom reakcijom polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (eng. *reverse transcription-polymerase chain reaction*, RT-PCR) (Rowhani i sur., 1993). Izvedba navedene metode ovisi o enzimu reverzna transkriptaza koji se dodaje u reakcijsku smjesu te prevodi RNA u komplementarnu DNA (eng. *complementary DNA*, cDNA). Protokoli temeljeni na metodi PCR mogu se podijeliti na konvencionalne (koje zahtijevaju vizualizaciju amplificiranih PCR produkata na agaroznom gelu) te na kvantitativne PCR metode u stvarnom vremenu (eng. *real-time or quantitative PCR*, qPCR), u kojima se proizvodnja DNA prati fluorimetrijskim mjerenjem (*Taqman probe*) ili interkalarnim bojama (*Sybr green*) (Rowhani i sur., 2017c). *Taqman probe* oligonukleotidni su fragmenti koji su komplementarni DNA fragmentu koji se umnaža (poput početnica), a obilježene su fluorescentnom molekulom fluoroforom (eng. *reporter*). Molekula fluorofora počinje fluorescirati u trenutku stvaranja novih lanaca DNA, zbog egzonukleolitičkog svojstva *Taq* polimeraze koja ju odvaja od molekule fluorokroma (eng. *quencher*), pri čemu se onemogućava daljnje apsorbiranje svjetlosti od strane te molekule. S obzirom da se probe mogu obilježiti različitim bojama (VIC, NED, FAM, itd.), *Taqman* izvedba qPCR reakcije pogodna je za detekciju više virusa istovremeno, tzv. višestruki qPCR (eng. *multiplex qPCR*), zbog čega se ta metoda široko primjenjuje u detekciji virusa vinove loze (López-Fabuel i sur., 2013; Osman i sur., 2013; Thompson i sur., 2014).

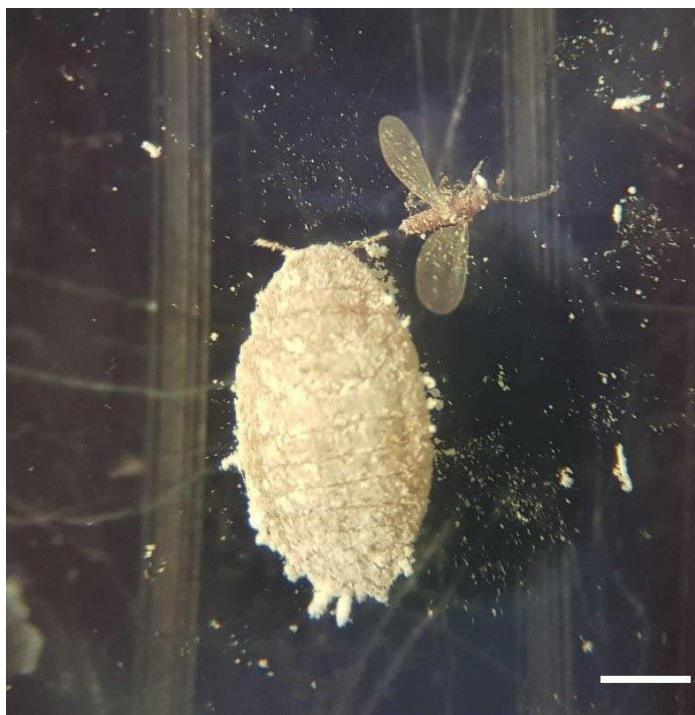
Za razliku od metode Sangerovog sekvenciranja (Sanger i sur., 1977), nove metode poput sekvenciranja visoke protočnosti (eng. *high-throughput sequencing*, HTS) daju uvid u kompletni fitosanitarni status biljke te se, u teoriji, mogu detektirati svi virusi u jednoj biljci (Maree i sur., 2018). Sekvenciranjem kompletne RNA biljke, malih virusnih RNA kao posljedica utišavanja gena ili virusnih dsRNA, moguće je detektirati viruse u simptomatičnim i asimptomatičnim biljkama, što je rezultiralo velikim brojem novootkrivenih virusa vinove

loze u ovom i posljednjem desetljeću (Zherdev i sur., 2018). S obzirom na potrebnu opremljenost, stručnost i visoke troškove sekvenciranja i obrade podataka, HTS metoda još uvijek nije primjenjiva u testiranju velikog broja uzoraka.

2.4. Mjere kontrole virusnih bolesti vinove loze

Preporuke ili obveze kontrole virusnih bolesti vinove loze donose se u skladu sa spoznajama o štetnim učincima virusa u biljci i biljnoj proizvodnji. Otprilike 30-ak svih otkrivenih virusa vinove loze smatra se ekonomski štetnim patogenima, a većinom su članovi porodica *Betaflexiviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae* i *Geminiviridae* (Fuchs, 2020). Temeljem njihovih bioloških i epidemioloških karakteristika koje se razlikuju s obzirom na tip prijenosa i krug domaćina, kontrola virusnih bolesti oslanja se na preventivne mjere kojima se nastoji spriječiti ili usporiti rasprostranjivanje virusa unutar vinograda, ali i između vinograda, zemalja itd. (Maliogka i sur., 2015a). Najučinkovitijom mjerom kontrole prijenosa virusa na velike udaljenosti smatra se proizvodnja i upotreba certificiranog sadnog materijala, budući se virusi učinkovito prenose vegetativnom propagacijom i cijepljenjem podloga američkih vrsta i hibrida te plemki vinove loze (Martelli, 1993a). Certificirani sadni materijal proizvodi se u skladu s certifikacijskim shemama koje su propisane od strane Europske i mediteranske organizacije za zaštitu bilja (EPPO), a koje nalažu osnivanje bezvirusnih baznih matičnjaka podloga i plemki (eng. *nuclear stock*), koji služe za osnivanje bezvirusnih propagacijskih nasada (eng. *propagation stock*) odakle se uzima materijal namijenjen proizvodnji certificiranog sadnog materijala (EPPO, 2008). S druge strane, najučinkovitiji prijenos virusa vinove loze na male udaljenosti odvija se posredstvom vektora, što je najbolje proučeno u slučaju GLRaV-3. Navedeni virus ima veliku sposobnost prijenosa s biljke na biljku te je utvrđeno da se zaraza širi na oko 10 % novih biljaka u vinogradu godišnje (Jordan, 1993; Habili i Nutter, 1997; Cabaleiro i Seguera 2006; Golino i sur., 2008). Odabir metode za učinkovito suzbijanje vektora (biološke, kemijske) ovise o tipu vektora: štitaste uši (ampelovirusi, vitivirusi, badnavirusi), eriofidne grinje (GPGV), nematode (nepovirusi), cvrčci (GRBV), lisne uši (GVCV) (Maliogka i sur., 2015a). Ipak, kemijske mjere se još uvijek smatraju najučinkovitijim metodama suzbijanja vektora. U studiji Wallingford i sur. (2015) provedenoj u saveznoj državi New York (SAD), korištenjem sistemskog insekticida na bazi djelatne tvari spirotetramat za 66 – 100 % smanjena je ljetna populacija štitaste uši vrste *Pseudococcus maritimus* u vinogradima inficiranim s GLRaV-3, pri čemu je približno upola smanjen prijenos GLRaV-3 u godini dana. S obzirom da su čak i kemijske mjere ograničeno učinkovite u suzbijanju populacija vektora, posebno štitastih uši koje su zaštićene različitim tvarima poput voskova (Slika 2.14), znatnijem usporavanju rasprostranjivanja GLRaV-3 u vinogradu doprinosi uklanjanje zaraženih biljaka (Pietersen i

sur., 2013). Također, alternativni domaćini virusa vinove loze ne smiju se zanemariti jer mogu biti izvor hrane za vektore, a time i potencijalno izvor inokuluma (Petersen i sur., 2019). Veliki broj alternativnih domaćina u vidu različitih rodova zeljastih i drvenastih biljaka izvan roda *Vitis* je utvrđen za GPGV u samo jednoj studiji u Mađarskoj, prilikom čega je virus detektiran među vrstama iz rodova *Ailanthus*, *Asclepias*, *Crataegus*, *Fraxinus*, *Rosa*, *Rubus* i *Sambucus* (Demian i sur., 2022). Novije studije pokazale su prijenos GPGV i GLRaV-2 sjemenom vinove loze, na što treba obratiti pažnju i istražiti kao mogući način prijenosa za druge viruse koji bi se mogli prenositi od majčinskih biljaka u novu generaciju kroz različite oplemenjivačke programe (Zhang i sur., 2022).



Slika 2.14. Stereomikroskopski prikaz (povećanje 150X) odrasle ženke (lijevo) i mužjaka (desno) lozine štitaste uši (*Planacoccus ficus* Sign.), dokazanog vektora virusa vinove loze iz rodova *Vitivirus*, *Ampelovirus* i *Badnavirus*. Oznaka označava veličinu 1 mm.

2.5. Istraživanja virusa vinove loze u Hrvatskoj

Istraživanja virusa vinove loze u Hrvatskoj uglavnom su do sada bila usmjerena na ekonomski značajne viruse. Najstarija istraživanja bila su vezana uz pojavnost infektivne degeneracije u vinogradima u Istri, pri čemu je ona označena kao ekonomski značajna bolest koja dovodi do propadanja vinograda (Šarić i Corte, 1959; Šarić Sabadoš i Corte, 1959; Šarić, 1960). Virus mozaika gušarke (ArMV) je kao uzročnik infektivne degeneracije prvi puta potvrđen u Hrvatskoj nakon provedene serološke analize uzoraka zaraženih sorata 'Graševina' i 'Kraljevina' (Panjan i Šarić, 1963). Kasnije je najrasprostranjenijim uzročnikom infektivne degeneracije u vinovoj lozi i podlogama priobalne i kontinentalne Hrvatske potvrđen GFLV (Šarić i Hranueli, 1977). Istraživanje provedeno 1990. godine u rasadniku u Jastrebarskom otkrilo je manji postotak infekcije s GFLV u podlogama (1,74 %) i sorti 'Rajnski rizling' (0,98 %) u odnosu na uzročnike GLD (2,14 % i 6,06 %) (Topolovec-Pintarić, 1990). Prvo opsežnije istraživanje virusa iz skupine GLD provedeno je naredne godine u sjeverozapadnoj Hrvatskoj i Sloveniji, pri čemu je utvrđena veća prisutnost GLRaV-1 u odnosu na GLRaV-3 (Šarić i Korošec-Koruza, 1991), što će se potvrditi u svim narednim istraživanjima na vinovoj lozi u kontinentalnoj Hrvatskoj (Karoglan Kontić i sur., 2009; Vončina i sur., 2019).

U novijoj Hrvatskoj povijesti su istraživanja ekonomskih značajnih virusa (serološkim i molekularnim metodama) bila uglavnom usmjerena na analizu zdravstvenog stanja vinove loze u komercijalnim vinogradima te kolekcijskim nasadima. U istraživanju Kontić i sur. (2009) provedenom u kontinentalnoj Hrvatskoj, testiranjem 511 uzoraka autohtonih sorata 'Graševina', 'Škrlet' i 'Kraljevina' na četiri virusa (GLRaV-1 i -3, GFLV i ArMV) metodom ELISA, utvrđeno je više od 50 % zaraženih biljaka. Najrasprostranjeniji virus bio je GLRaV-1 detektiran u oko 45 % uzoraka, slijedili su GLRaV-3 (manje od 10 % uzoraka) te GFLV i GLRaV-3 (0,4 %). Veća zaraženost utvrđena je u priobalnom području gdje se GLRaV-3 pokazao kao najdominantniji virus, prisutan u mješovitim infekcijama s drugim virusima (Hančević i sur., 2021). Istraživanja serološkim metodama u Istri (uglavnom na autohtonim sortama) otkrila su variranja u zaraženosti s GLRaV-3 s rezultatom 50,1 – 72,3 %; 4,3 – 24,3 % s GLRaV-1; 2,8 – 23,9 % s GFLV; 10,6 – 18,3 % s GVA; 7,8 – 13,3 % s virusom pjegavosti vinove loze (eng. *grapevine fleck virus*, GFkV); te 0 – 0,3 % s ArMV (Poljuha i sur., 2004; Poljuha i sur., 2010; Đurić-Stjepanović, 2021). U ostalim dijelovima priobalne Hrvatske provedena su istraživanja zdravstvenog stanja autohtonih sorata vinove loze za potrebe uključivanja istih u postupke klonske selekcije. Zajednička karakteristika tih istraživanja je bila vrlo visoka pojavnost ekonomski značajnih virusa. Testiranjem trsova na četiri virusa (GFLV, ArMV, GLRaV-1 i -3) na području Dalmacije, bezvirusno je bilo samo

11 % biljaka, a na području sjevernog Primorja 30 % biljaka (Karoglan Kontić i sur., 2009). Istraživanje pojavnosti osam virusa (GFLV, ArMV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB i GFkV) pokazalo je još veću zaraženost, pri čemu je na području Dalmacije bilo samo 8,33 % bezvirusnih biljaka (Vončina i sur., 2019). Kao i u Istri, GLRaV-3 je označen kao najučestaliji virus, detektiran u 79,6 % testiranih biljaka, slijedili su ga GVA (61,4 %), GLRaV-1 (40,8 %), GFkV (19,9 %), GFLV (19,6 %), GLRaV-2 (4,1 %), ArMV (3,2 %) i GVB (3,1 %). Najveća zaraženost zabilježena je u vinovoj lozi s područja Kaštela, gdje nije pronađena ni jedna bezvirusna biljka sorata 'Ljutun', 'Glavinuša', 'Ninčuša', 'Vlaška', 'Crljenak kaštelanski', 'Babica', 'Dobričić' i 'Mladenka' (Karoglan Kontić i sur., 2009; Vončina i sur., 2019). Također, uzorkovanjem na širem području utvrđena je velika zaraženost biljaka sorte 'Plavac mali', od kojih samo 5,7 % (Karoglan Kontić i sur., 2009), odnosno 7,4 % (Vončina i sur., 2019) nije bilo nezaraženo s istraživanim virusima. Na veliku zaraženost te hrvatske najvažnije crne sorte upozoreno je i ranije i to u istraživanju Zdunić i sur. (2007) provedenom u kolekcijskom nasadu u Splitu (Institut za jadranske kulture i melioraciju krša), u kojem je ustanovljeno 4,3 % nezaraženih biljaka, a dvije godine kasnije i upola manje (Zdunić i sur., 2009). U istom kolekcijskom nasadu je kasnije detektirano ukupno 16 različitih virusa vinove loze (Čarija i sur., 2022). U regiji Dalmacija je potvrđena i velika zaraženost autohtonih sorata 'Prč bijeli', 'Dobričić' i 'Babić' (Zdunić i sur., 2008; Vončina i sur., 2011a; Culjak, 2022). Dominatna pojavnost GLRaV-3 u regiji Dalmacija potvrđena je i u sorti 'Zlatarica vrgorska' s područja Vrgorca (59,79 %), međutim u sortama 'Trnjak crni' s područja Vrgorca i sorti 'Kujundžuša bijela' s područja Imotskog dominantnim je dokazan GLRaV-1 (47,5 % i 64,26 %) (Andabaka i sur., 2022). Sanitarni status autohtonih sorata podrijetlom iz Dalmacije najbolje je istražen u zbirci virusa vinove loze SZAF, koja je nastala kao rezultat testiranja autohtonih sorata vinove loze u priobalnoj Hrvatskoj, u svrhu njihovog uključivanja u postupke klonske selekcije (Vončina i sur., 2022). Izabrane 44 biljke iz tog kolekcijskog nasada (sorata 'Plavac mali', 'Babica', 'Dobričić', 'Ljutun', 'Mladenka' i 'Vlaška'), podrijetlom iz 20 lokacija/vinograda u Dalmaciji (Pelješac, otok Hvar, otok Korčula, otok Vis, otok Šolta, Kaštela), te 4 biljke (sorata 'Žlahtina', 'Jarbola' i 'Sansigot'), podrijetlom iz tri komercijalna vinograda (otok Krk, Poreč) testirane su metodom RT-qPCR na prisutnost 26 virusa. U tom je istraživanju potvrđena velika zaraženost s ekonomski značajnim virusima te je još sedam virusa detektirano po prvi puta u Hrvatskoj: uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 4 (eng. grapevine leafroll-associated virus 4, GLRaV-4), GVD, GVE, GVF, GRBV, virus Syraha 1 (eng. grapevine Syrah virus 1, GSyV-1) i virus rasperjanih žila vinove loze (eng. grapevine vein feathering virus, GVfV) (Vončina i sur., 2017). Nakon toga je na četiri biljke iz istog seta uzoraka primijenjena metoda HTS, pri čemu je GBV-1 otkriven te su još četiri virusa prvi puta detektirani u Hrvatskoj: GVG, GVK, GVT i GRLDaV (Vončina i Almeida, 2018). Širom primjenom metode HTS-a potvrđeni su virusi u 22 biljke, otprije

detektirani ELISA i RT-qPCR metodom, ali je zaraza utvrđena i u biljkama koje su smatrane nezaraženima (Vončina i sur., 2022). Testiranjima zdravstvenog stanja u Kolekcijskom nasadu klonova autohtonih sorata vinove loze – Jazbina (SZAF) potvrđena je najveća prisutnost GFkV (28 %), što se pripisuje čestom izostavljanju ovog virusa iz programa testiranja (Zrnić, 2021). U istom je kolekcijskom nasadu potvrđena prisutnost GVH u Hrvatskoj te je lozina štitaste uš (*Pl. ficus*) dokazana kao vektor (Jagunić i sur., 2021). Dokazan je i prijenos vektorom za GVA i GLRaV-3 na zeljaste test biljke i korove (Jagunić, 2019). Pored istraživanja pojavnosti i rasprostranjenosti, u Hrvatskoj su se provodili i biološki testovi u svrhu utvrđivanja štetnosti zaraze virusima. Istražen je učinak GLRaV-3 na filometrijske karakteristike, mehaničku strukturu i pH mošta sorte 'Grk', pri čemu su utvrđene signifikantno manje vrijednosti parametara peteljkovine lista i grozda te više vrijednosti pH mošta u zaraženim, u odnosu na nezaražene biljke (Preiner i sur., 2010). Učinak infekcije s GLRaV-3 valoriziran je i mjerenjima parametara nutritivnog statusa, oksidativnog stresa i primarnog metabolizma vinove loze, u odnosu na nezaražene biljke sorata 'Cabernet Franc', 'Merlot', 'Pinot crni' i 'Tribidrag'. U tom je istraživanju utvrđeno da se proteini, vodikov peroksid i enzim superoksid dismutaza (eng. *superoxide dismutase*, SOD) mogu koristiti kao stanični markeri infekcije s obzirom da su njihove vrijednosti bile značajno veće ili manje u inficiranim biljkama, neovisno o izolatu GLRaV-3, sorti i proteklom vremenu od infekcije do mjerenja (Hančević i sur., 2023). Štetan utjecaj GLRaV-3 i drugih virusa odrazio se i na lošiji rast i preživljavanje različitih autohtonih sorata u uvjetima „*in vitro*“, pri čemu je utvrđen veći porast mladica te broj nodija kod nezaraženih biljaka (Marković i sur., 2014). Provedeno je i istraživanje utjecaja GVB na zeljaste test biljke *Nicotiana occidentalis* i *N. cavicola*, pri čemu su utvrđene razlike u simptomima (klorotične i nekrotične pjege) ovisno o izolatu (Vončina i sur., 2011b), dok mehanički prijenos GLRaV-2 nije bio uspješan (Vončina i sur., 2010). Proučavana je i sposobnost eliminacije virusa u uvjetima „*in vitro*“ metodom somatske embriogeneze, pri čemu su u 30 % slučajeva GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 i GFkV uspješno eliminirani iz biljaka sorata 'Babica' i 'Plavac mali' (Malenica i sur., 2020). Ova metoda eliminacije virusa patentirana je od strane Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (PMF) i predstavlja veliki potencijal za proizvodnju bezvirusnog sadnog materijala hrvatskih autohtonih sorata, za koje je ustanovljeno loše zdravstveno stanje po pitanju ekonomskih virusa, ali i novootkrivenih virusa čiji utjecaj na vinovu lozu još nije istražen (Zdrava loza, 2022). U svrhu očuvanja autohtonih sorata i eliminacije virusa testirana je metoda krioprezervacije kulture tkiva, nakon provedbe koje je zabilježena puno slabija sposobnost regeneracije autohtonih (0 – 11 %) u odnosu na introducirane sorte (0 – 70 %) (Marković i sur., 2015).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izolacija nukleinskih kiselina

3.1.1. Izolacija nukleinskih kiselina korištenjem komercijalnih kompleta

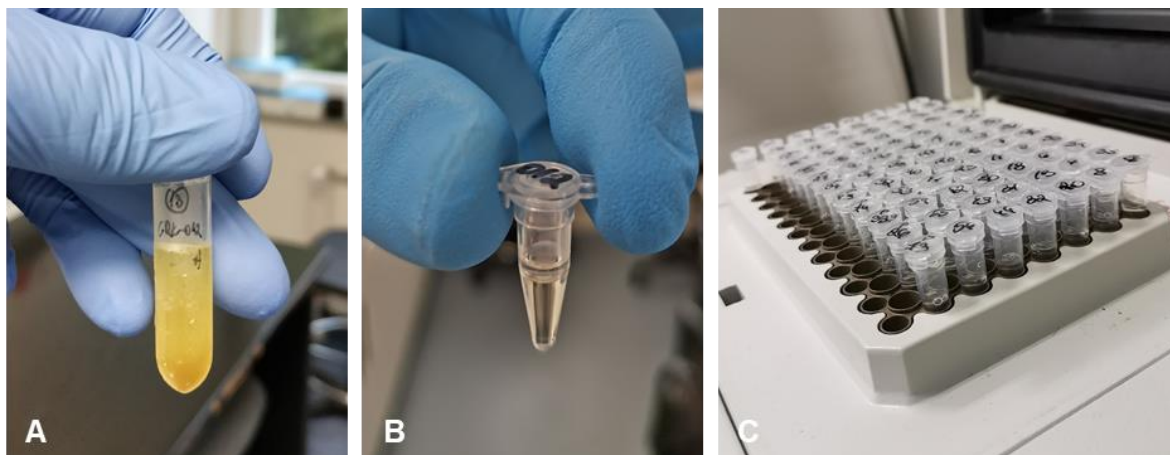
Za izolaciju RNA iz biljnog materijala korišten je komercijalni komplet RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Prema preporukama proizvođača, 0,1 g biljnog materijala (peteljke, strugotine floema rozgve ili mladice) smrvljeno je u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. Nakon toga je homogenizacija izvršena u mikroepreveti volumena 2 ml dodatkom 450 μ L RLT pufera i 1 % 2-merkaptetanola. Svi ostali koraci izolacije odrađeni su prema uputama proizvođača. Na kraju su talozi RNA otopljeni u 30 μ L vode slobodne od ribonukleaza te je RNA uskladištena na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do korištenja.

Za izolaciju DNA iz biljnog materijala korišten je komercijalni komplet DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka). Odvagnuto je 0,1 g biljnog materijala (peteljke, strugotine floema rozgve ili mladice) koji je smrvljen u tarioniku uz dodatak tekućeg dušika. Svi ostali koraci odrađeni su prema preporukama proizvođača uz ponavljanje koraka ispiranja dodavanjem 100 μ L AE pufera u dva navrata. Dobivena otopina DNA je do korištenja uskladištena na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2. Izolacija ukupnih nukleinskih kiselina metodom GES

Glicin-EDTA-natrij (eng. *glycin-EDTA-sodium*, GES) metoda korištena je u svrhu izolacije ukupne nukleinske kiseline (eng. *total nucleic acids*, TNA) iz biljnog materijala (Rowhani i sur., 2000). Masa od 0,1 g biljnog materijala (peteljke listova, strugotine floema rozgve ili mladice) usitnjena je u tarioniku uz pomoć tučka te dodatkom tekućeg dušika. Usitnjeni prah je prebačen u mikroeprevetu volumena 2 mL, u kojoj je homogeniziran dodatkom 1,8 mL ekstrakcijskog pufera (15 mM Na_2CO_3 , 34,88 mM NaHCO_3 , 0,5 mM PVP 40, 0,2 % goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA), 0,05 % tween 20, pH 9.6). Mikroeprevete su potom centrifugirane na 13 200 rpm u trajanju od 10 min te je zatim 1 mL supernatanta premješteno pipetiranjem u nove mikroeprevete volumena 2 mL koje su uskladištene na $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili je uzorak odmah korišten u testiranju. Prije testiranja protokolima temeljenim na metodi PCR, 8 μ L supernatanta prebačeno je u mikroeprevetu volumena 0,2 mL te je zajedno sa 100 μ L GES pufera (0,1 M glicina, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 % Triton X, 1 % 2-merkaptetanola, pH 9,0 podešen s otopinom NaOH) denaturiran u uređaju Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 10 min (Slika 3.1). Denaturirani uzorak korišten je u volumenu od 2 μ L (prema uputama

proizvođača) u reakcijskim smjesama (20 μ L) za RT-qPCR, dok je volumen denaturiranog uzorka korištenog u smjesama (10 μ L ili 25 μ L) za konvencionalni RT-PCR u detekciji GVG ili konvencionalni PCR u detekciji GBV-1 određen eksperimentalno.



Slika 3.1. Koraci u provedbi izolacije TNA pomoću metode GES: homogenizirani biljni materijal u ekstrakcijskom puferu u mikroepruveti volumena 2 mL (A); suspenzija supernatanta i GES pufera u mikroepruveti volumena 0,2 mL (B); mikroepruvete (0,2 mL) s uzorcima u uređaju Mastercycler neposredno prije denaturacije (C).

3.2. Razvoj molekularnih metoda detekcije

3.2.1. Detekcija izolata poznatim protokolima

U svrhu otkrivanja novih GVG i GBV-1 izolata s ciljem razvoja novih početnica i proba, istraživanje prisutnosti navedenih virusa provedeno je u zbirci virusa vinove loze SZAF, na ukupno 196 biljaka. RNA je izolirana iz strugotina floema rozgve (33 biljke) ili peteljki listova (163), a DNA iz peteljki listova pomoću RNeasy i DNeasy Plant Mini Kit (opisano u poglavlju 3.1.1). Koncentracija i čistoća RNA i DNA provjerena je spektrofotometrijski i to apsorbancijom pri valnim duljinama 260 nm i 280 nm iz kojih je dobiven omjer A260/A280 korištenjem uređaja NanoPhotometer P330 Spectrophotometer (Implen, München, Njemačka). U svrhu detekcije GVG pomoću metode RT-PCR i GBV-1 pomoću metode PCR korištene su otprije poznate početnice (Tablica 3.1).

Tablica 3.1. Početnice korištene za detekciju GVG i GBV-1 u svrhu otkrivanja novih izolata za razvoj novih i pouzdanijih molekularnih metoda detekcije.

Virus	Počelnica	Smjer početnice	Sekvenca (5' – 3')	Gen	pozicija (5' – 3')	Veličina produkta u baznim parovima (bp)	Literatura
GVG	GVG F12	uzvodna	AGCATCCGGCTCTAAAGTCA	kapsidni protein (CP)	6481 – 6500	646	Vončina i Almeida, 2018
	GVG R12	nizvodna	ACACCATACCGCTTAGCTCG		7126 – 7107 ^a		
	GVG F13	uzvodna	AAGGCGCCAAGGGTGTATTC	CP	6970 – 6989	500	D. Vončina – osobna komunikacija
	GVG R13	nizvodna	CGCACATGCACTGTGTGTTA		7469 – 7450 ^a		
	GVG-CP-F1	uzvodna	GTCATCAAGGATGGGAGAGGAA	CP	6438 – 6459	507	Diaz-Lara i sur., 2019
	GVG-CP-R2	nizvodna	GAACGGGTAAGCCTAGATATTGCG		6944 – 6921		
GBV-1	GBV-1 F2	uzvodna	TGAGGCGCTGAGAAGAAGTG	poliprotein	1197 – 1216	731	Vončina i Almeida, 2018
	GBV-1 R2	nizvodna	CTGGTGCTGAGTAGCGAACA		1908 – 1927 ^b		

^a prema referentnom GVG izolatu VID561 (NC_040616)

^b prema referentnom GBV-1 izolatu VLJ-178 (NC_055481)

U svrhu detekcije GVG metodom RT-PCR korišten je reakcijski volumen od 10 µL (25 µL u pripremi za sekvenciranje RT-PCR produkta Sangerovom metodom) sastavljen od komponenti komercijalnog kompleta One-step RT-PCR kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema preporukama proizvođača: 2 µL 5X pufera, 0,4 µL smjese dNTP, 0,4 µL smjese enzima, 0,4 µM svake početnice, 0,2 µL uzorka RNA (Qiagen) ili eksperimentalno utvrđenog volumena TNA (GES) te na kraju dopunjeno s vodom slobodnom od ribonukleaza do ukupnog volumena od 10 µL, odnosno 25 µL za potrebe sekvenciranja. Reakcije su provedene u uređaju Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), pri reakcijskim uvjetima: reverzna transkripcija na 50 °C u trajanju od 30 min, inicijalna aktivacija HotStarTaq DNA polimeraze te istovremena inaktivacija reverzne transkriptaze na 95 °C u trajanju od 15 min, 34 ciklusa: denaturacija na 94 °C u trajanju od 30 s, prilanjanje početnica na 53 °C u trajanju od 30 s i izduživanje na 72 °C u trajanju od 1 min te završno izduživanje na 72 °C u trajanju od 10 min (Diaz-Lara i sur., 2019).

U svrhu detekcije GBV-1 metodom PCR korišteni su isti reakcijski volumeni i uređaj kao za detekciju GVG, uz upotrebu reakcijskog kompleta HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema preporukama proizvođača: 1 µL 10X reakcijskog pufera, 2 µL Q-otopine, 0,2 µL smjese dNTP, 0,05 µL Hot start polimeraze, 0,5 µM svake početnice, 0,2 µL uzorka DNA te nadopunjeno s ultra čistom vodom do ukupnog volumena od 10, odnosno 25 µL. Uvjeti reakcije bili su sljedeći: početna aktivacija na 95 °C u trajanju

od 15 min; 35 ciklusa: denaturacija na 94 °C u trajanju od 30 s, prijanjanje početnica na 52 °C u trajanju od 30 s, izduživanje na 72 °C u trajanju od 1 min; te završno izduživanje na 72 °C u trajanju od 10 min (Vončina i Almeida, 2018).

Nakon provedenih reakcija, 1 µL PCR produkta je u omjeru 1:5 pomiješano s bojom za elektroforezu 6X Loading Buffer (Takara, Tokio, Japan). Smjesa je prebačena u pripremljene jažice u 1,5 % agaroznom gelu, složenoga od 1X-tris-borate-EDTA pufera (TBE; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) te od jedne kapi fluorescentnog bojila GelRed (CareDx AB, Stockholm, Švedska). Elektroforetsko razdvajanje PCR produkata provedeno je u 1XTBE puferu pomoću uređaja PowerPack 300 (Biorad Hercules, SAD), dok je vizualizacija PCR produkata provedena na uređaju UV-Transilluminator 2000 (Biorad, Hercules, SAD). Očekivana veličina PCR produkata vizualno je procijenjena u usporedbi s korištenom DNA ljestvicom (markerom): GelPilot Mid Range Ladder ili GelPilot 100 bp Plus Ladder (Qiagen, Hilden, Njemačka).

3.2.2. Dizajniranje novih početnica i proba

Nakon provedenih testiranja biljaka u zbirci virusa vinove loze SZAF ranije opisanim protokolima te utvrđivanja pozitivnih biljaka, peteljke istih su korištene za ponovnu izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina prema protokolu Al Rwahnih i sur. (2021) na Institutu Foundation Plant Services (Sveučilištu Davis, Kalifornija, SAD). Alikvoti izolirane TNA korišteni su za uklanjanje ribosomske RNA (rRNA) te konstruiranje knjižnice komplementarne DNA (cDNA) korištenjem komercijalnog kompleta TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plant (Illumina, San Diego, SAD). Konstruirane knjižnice su korištene u sekvenciranju metodom HTS pomoću sustava NextSeq 500 (Illumina, San Diego, SAD), pri UC-Davis Genome Center (Kalifornija, SAD). Iz dobivenih rezultata uklonjeni su adapteri i ponavljeni nukleotidni sljedovi (eng. *demultiplication*) korištenjem platforme bcl2fastq Conversion Software (Illumina, San Diego, SAD). Sastavljanje novih sekvenci provedeno je programom SPADes (Bankevich i sur., 2012). Dobivene sekvence (eng. *contigs*) su uspoređene s kompletnom neredundantnom bazom virusnih sekvenci preuzetih iz baze GenBank Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI) korištenjem osnovnih alata za pretraživanje poravnatih sekvenci i njihove usporedbe na nukleotidnoj i aminokiselinskoj razini (eng. *basic local alignment search tool – nucleotide/x*, BLASTn, BLASTx). Granične sekvence dulje od 500 nukleotida i s identičnošću iznad 80 % na nukleotidnoj ili aminokiselinskoj razini korištene su kao granice detekcije virusnih vrsta. Iz baze GenBank preuzeti su ranije poznati izolati (11 GVG izolata te jedan GBV-1 izolat) (Tablica 3.2), koji su zajedno s novootkrivenim

hrvatskim GVG i GBV-1 izolatima korišteni u dizajniranju novih početnica i proba za detekciju GVG metodom RT-PCR i GBV-1 metodom PCR ili oba virusa metodom RT-qPCR. Za poravnavanje sekvenci, traženje najmanje divergentnih regija genoma te dizajniranje početnica/proba korišteni su programi Primer 3 (Untergasser i sur., 2012) te Geneious 10.2.6 (Kearse i sur., 2012).

Tablica 3.2. GVG i GBV-1 izolati preuzeti iz baze GenBank te korišteni u dizajniranju novih početnica i proba za molekularne metode detekcije.

Virus	Izolat	Pristupni kod u bazi GenBank	Podrijetlo	Sorta vinove loze (<i>V. vinifera</i>)
GVG	VID561	NC_040616	Novi Zeland	Chardonnay
	VID567	MF405925	Novi Zeland	Chardonnay
	VID499	MF405924	Novi Zeland	Chardonnay
	VLJ-178	MF781081	Hrvatska	Ljutun
	VVL-101	MF993575	Hrvatska	Vlaška
	VD-102	MF993574	Hrvatska	Dobričić
	VB-108	MF993573	Hrvatska	Babica
	PI8938	MK017693	SAD	Pinot crni
	PI8936	MK017692	SAD	Pinot crni
	CH8935	MK017691	SAD	Chardonnay
	PI8932	MK017690	SAD	Pinot crni
	GBV-1	VLJ-178	NC_055481	Hrvatska

3.2.3. Optimizacija koncentracija početnica i proba za višestruki RT-qPCR

Reakcijske smjese za provedbu metode RT-qPCR pripremljene su u 20 μ L reakcijskim volumenima uz korištenje fiksnih volumena sljedećih komponenti: 5 μ L TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix – 4X (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Waltham, SAD), 10.6 μ L ultra čiste vode i 2 μ L izolirane RNA/DNA/TNA. Reakcije su odrađene u uređaju Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific, Waltham, SAD), uz korištenje reakcijskih uvjeta prema preporukama proizvođača: reverzna transkripcija na 50 °C u trajanju od 2 min, inicijalna aktivacija na 95 °C u trajanju od 10 min, 40 ciklusa denaturacije na 94 °C u trajanju od 15 s te elongacije na 60 °C u trajanju od 1 min.

Budući da je za testiranje velikog broja uzoraka s terena odabrana metoda RT-qPCR, bilo je potrebno provesti optimizaciju koncentracije početnica i proba s ciljem razvoja protokola koji bi omogućio istovremenu detekciju oba virusa. Optimiranje je najprije provedeno za pojedinačne (eng. *singleplex*) RT-qPCR reakcije za GVG, 18S rRNA (interna

kontrola izolirane RNA) i GBV-1, nakon čega su odabrane koncentracije početnica i proba provjerene u višestrukoj (eng. *multiplex*) RT-qPCR reakciji, prema uputama o optimiranju za pojedinačne i višestruke reakcije (Thermofisher 2019a i 2019b). Za detekciju GVG i GBV-1 korištene su početnice i probe dizajnirane za potrebe ovog istraživanja (prethodno poglavlje), dok su za 18S rRNA korišteni od ranije poznati parovi početnica 449f: 5'-GTGACGGAGAATTAGGGTTCTGA-3' i 498r: 5'-CTGCCTTCCTTGGATGTGGTA-3' te proba 475p: VIC 5'-CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG-3' TAMRA (Osman i Rowhani, 2006). Ukupna TNA izolirana je metodom GES iz biljke sorte 'Ljutun' (VLJ-178) podrijetlom iz zbirke virusa vinove loze SZAF, zaražene s GVG i GBV-1. U svim reakcijama korištene su i negativne kontrole, testiranjem uzoraka TNA dobivenih od nezaražene biljke sorte 'Plavac mali'. Za svaki od navedenih ciljeva (GVG, 18S rRNA i GBV-1) optimizacija koncentracija početnica (uzvodnih i nizvodnih), pri koncentraciji proba od 250 nM, uključivala je reakcije u tri repeticije za svaku od sljedećih koncentracija (u nM): 75, 150, 300, 450 i 900. Zatim je optimiranje koncentracija proba, pri odabranoj koncentraciji početnica, provedeno istim metodama u tri ponavljanja za svaku od sljedećih koncentracija (u nM): 50, 100, 150, 200, i 250. Također, uz odabranu koncentraciju proba, odabrana koncentracija uzvodnih početnica kombinirana je s koncentracijom nizvodnih početnica od 900 nM i obrnuto. Na kraju pojedinačnih testova za GVG, 18S rRNA i GBV-1 proveden je višestruki RT-qPCR test na temelju odabranih koncentracija početnica i proba te je uspoređen s pojedinačnim rezultatima detekcije istraživanih virusa metodom RT-qPCR.

3.2.4. Određivanje optimalnog volumena uzorka izoliranog metodom GES za detekciju metodama RT-PCR i PCR

U svrhu provjere uspješnosti i osjetljivosti protokola detekcije GVG i GBV-1 metodama RT-PCR i PCR, s obzirom na utjecaj nečistoća prisutnih u uzorku TNA izoliranog metodom GES (opisano u poglavlju 3.1.2), optimalni volumen GES uzorka u reakcijskim smjesama je eksperimentalno određen. Budući je metoda GES izvorno testirana na RNA virusima loze (Rowhani i sur. 2020), u slučaju GVG pripremljene su RT-PCR reakcije s rasponom volumena izoliranog uzorka 0,2 – 1,4 μ L uz stopu povećanja od 0,4 μ L, dok je raspon volumena uzorka za detekciju GBV-1 metodom PCR iznosio 0,2 – 1 μ L. Budući je GBV-1 DNA virus, testirane su manje promjene volumena uzorka uz porast od 0,2 μ L. Nakon provedenih reakcija, PCR produkti su vizualizirani na 1,5 % agaroznom gelu kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Optimalan volumen GES uzorka u reakcijskim smjesama za RT-PCR i PCR, utvrđen u ovom istraživanju, korišten je u svim narednim pokusima detekcije GVG i GBV-1 navedenim metodama.

3.2.5. Usporedba osjetljivosti i učinkovitosti novih protokola detekcije korištenjem različitih metoda izolacije nukleinskih kiselina

Osjetljivosti razvijenih protokola detekcije, temeljenih na metodama RT-PCR za GVG, PCR za GBV-1 te RT-qPCR za oba virusa, ispitane su deseterostrukim serijskim razrjeđenjima nukleinskih kiselina u rasponu od 1 do 1:100 000 za metode RT-PCR i PCR te 1:10 000 000 za metodu RT-qPCR. Za procjenu osjetljivosti i međusobne usporedbe navedenih protokola detekcije korištene su nukleinske kiseline izolirane korištenjem komercijalnih kompleta (RNeasy i DNeasy Plant Mini Kit) i korištenjem TNA izolirane pomoću metode GES (poglavljja 3.1.1. i 3.1.2). U slučaju GVG su RNA i TNA izolirane iz biljke sorte 'Vlaška' (VVL-123), za GBV-1 su DNA i TNA izolirane iz sorte 'Plavac mali' (PMC-313), dok su u slučaju negativnih kontrola RNA, DNA i TNA izolirane iz nezaraženih biljaka istih sorata. Efikasnosti RT-qPCR protokola procijenjene su metodom standardnih krivulja dobivenih pomoću programa Applied Biosystems 7500 Software ver. 2.3 (Life Technologies Corporation, South San Francisco, CA, SAD) te su uspoređene prema korištenim metodama izolacije nukleinskih kiselina. Rezultati provedenih protokola detekcije baziranih na metodama RT-PCR i PCR provjereni su na 1,5 % agaroznom gelu, na način kao što je opisano u poglavlju 3.2.1.

3.3. Istraživanje sezonske dinamike virusa u vinovoj lozi

Istraživanje sezonske dinamike GVG i GBV-1 u zaraženoj vinovoj lozi provedeno je tijekom 2019. godine, u svrhu određivanja sposobnosti detekcije virusa te odabira najpovoljnijeg termina i načina uzorkovanja. Kao izvor biljnog materijala odabrano je 10 zaraženih biljaka iz zbirke virusa vinove loze SZAF: pet biljaka sorte 'Vlaška' (VVL-112, VVL-113, VVL-114, VVL-122 i VVL-123) zaraženih s GVG, te pet biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC-022, PMC-235, PMC-245, PMC-282 i PMC-313) zaraženih s GBV-1. Biljke su uzorkovane 16 puta, na način da su u 12 navrata (svibanj – studeni) sakupljene po tri peteljke bazalnih listova na mladici, u 3 navrata po tri rozgve u mirovanju vegetacije (studeni – ožujak) te jednom izboji u kretanju vegetacije (travanj). Prikupljeno biljno tkivo od svake biljke obrađeno je metodom GES, nakon čega su izolirane TNA korištene u detekciji GVG i 18 S rRNA i GBV-1 pomoću novorazvijenog i optimiranog protokola za višestruki RT-qPCR.

Dobivene srednje vrijednosti aritmetičkih sredina ciklusa kvantifikacije (eng. *cycle quantification*, Cq) za GVG i kontrolnu 18S rRNA te za GBV-1 su statistički obrađene programskim paketom IBM SPSS Statistics, version 25 (IBM Corp, 2017). Statističke analize provedene su jednosmjernom analizom varijance (eng. *one way analysis of*

variance, ANOVA) te su razlike između srednjih Cq vrijednosti varijanata datuma uzorkovanja i uzorkovanih biljaka evaluirane Tukey testom ($p \leq 0,05$) (Tukey, 1949).

3.4. Istraživanje rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u Hrvatskoj

Utvrđivanje rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u Hrvatskoj provedeno je tijekom ljetnih mjeseci (lipanj, srpanj) 2020. i 2021. godine, prilikom čega je sakupljeno 4327 uzoraka vinove loze iz komercijalnih vinograda i kolekcijskih nasada u kontinentalnoj (vinogradarske regije Slavonija i hrvatsko Podunavlje te Središnja bregovita Hrvatska) i priobalnoj Hrvatskoj (Hrvatska Istra i Kvarner te Dalmacija) (Tablica 3.3, Slika 3.2). Jedan uzorak sačinjavao je tri peteljke starih listova sakupljenih s tri različite mladice na trsu autohtonih i introduciranih sorata. Iz sakupljenih uzoraka je metodom GES izolirana TNA te su uzorci testirani razvijenom metodom višestrukog RT-qPCR. Broj uzoraka pozitivnih na GVG i GBV-1 izražen je u postocima prema njihovom podrijetlu i sorti.

Tablica 3.3. Popis uzoraka vinove loze sakupljenih za potrebe istraživanja rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u Republici Hrvatskoj.

Regija	Županija	Mjesto	Lokacija	Koordinate	Broj testiranih biljaka	Testirane sorte (broj biljaka)
Slavonija i hrvatsko Podunavlje	Požeško-slavonska	Velika	Draga 1	45°26'38.8"N 17°37'40.8"E	42	Graševina**
			Draga 2	45°26'42.32"N 17°37'36.56"E	15	
			Draga 3	45°26'39.74"N 17°37'33.88"E	8	
			Draga 4	45°26'37.97"N 17°37'30.53"E	49	
		Kutjevo	Mitrovac 1	45°25'37.31"N 17°51'16.72"E	57	
			Mitrovac 2	45°25'34.37"N 17°51'16.35"E	13	
Središnja bregovita Hrvatska	Sisačko-moslavačka	Popovača	Palovine	45°34'56.62"N 16°37'25.69"E	30	Škrlet
	Krapinsko-zagorska	Sveti Križ Začretje	Komor Začretski	46°06'38.3"N 15°55'34.7"E	20	Belina starohrvatska
	Zagrebačka	Plešivica	Pečnjak	45°42'55.4"N 15°38'29.9"E	30	Rajnski rizling*
			Veliki Dol	45°42'55.2"N 15°38'50.7"E	30	Rizvanac* (10), Pinot crni* (10), Pinot sivi* (10)
			Ispod iže	45°43'20.9"N 15°39'15.6"E	30	Traminac crveni* (15), Portugizac* (15)
			Hrvojka 1	45°43'04.6"N 15°39'21.5"E	45	Različiti introducirane sorte (15), Chardonnay* (30)
		Hrvojka 2	45°43'01.9"N 15°39'16.8"E	15	Rajnski rizling*	
		Marija Gorica	Jarak 1	45°53'49.9"N 15°42'19.5"E	24	Različite introducirane sorte
			Jarak 2	45°54'10.5"N 15°42'38.8"E	16	
		Velika Gorica	Gudci	45°39'35.0"N 15°59'08.3"E	17	Centennial Seedless* (8), Rajnski rizling* (9)
	Grad Zagreb	Zagreb	Zbirka virusa vinove loze SZAF	45°49'25.1"N 16°01'43.4"E	196	Dobričić (8), Babica (11), Pošip (29), Ninčuša (8), Vugava (16), Babić (27), Grk (6), Plavac mali (41), Ljutun (6), Jarbola (1), Maraština (11), Plavina (4), Pušipel (5), Mladenka (4), Vlaška (16), Glavinuša (3)
			Kolekcija vinove loze i loznih podloga SZAF	45°49'39.0"N 16°01'44.4"E	91	110 R (<i>Vitis berlandieri</i> x <i>vitis rupestris</i>) (14), LN 33 (<i>Couderc 1613</i> x <i>Vitis berlandieri</i>) (13), Kober 5 BB (<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i>) (15), <i>V. rupestris</i> (13), <i>V. riparia</i> (12), Pinot crni* (17), Chardonnay* (7)
			Kolekcija klonova SZAF	45°51'28.4"N 16°00'18.9"E	478	9 autohtonih hrvatskih sorata (Pošip, Debit, Plavina, Plavac mali, Maraština, Babić, Kraljevina, Škrlet, Belina)
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata vinove loze SZAF			45°51'29.0"N 16°00'06.4"E	113	113 autohtonih hrvatskih sorata	
Ukupno – kontinent					1319	

* introducirana sorta

** sorta nerazjašnjenog podrijetla

Tablica 3.3. Nastavak

Regija	Županija	Mjesto	Lokacija	Koordinate	Broj testiranih biljaka	Testirane sorte (broj biljaka)			
Hrvatska Istra i Kvarner	Istarska	Poreč	Puderica	45°12'13.2"N 13°38'03.3"E	25	Malvazija istarska			
			Starići 1	45°11'27.9"N 13°39'22.6"E	25	Malvazija istarska			
			Starići 2	45°11'30.0"N 13°39'12.2"E	75	Chardonnay* (50), Malvazija istarska (25)			
			Lokvadić	45°10'11.7"N 13°37'00.7"E	50	Teran			
			Kršete	45°09'59.8"N 13°37'28.7"E	105	Borgonja			
			Kaligarići	45°09'51.4"N 13°38'45.3"E	75	Malvazija istarska (25) Merlot* (50)			
	Primorsko- goranska	otok Krk	Vrbnik	45°04'02.26"N 14°38'32.05"E	49				
			Pod Moču	45°04'42.9"N 14°39'01.4"E	123				
			Pod Zapoj	45°04'04.7"N 14°39'57.0"E	10	Žlahtina			
			Dno luga	45°03'52.1"N 14°40'03.8"E	10				
			Sveti Duh	45°04'37.3"N 14°39'05.9"E	10				
			Luki-Volarić	45°04'42.9"N 14°38'51.7"E	10				
			Ličko- senjska	otok Pag	Jakišnica		44°38'78.8"N 14°47'16.0"E	25	Muškat*
					Mala Rava		44°02'19.3"N 15°03'24.5"E	194	Plavina
otok Rava	Vela Rava	44°01'20.2"N 15°04'02.3"E		110	Plavina (107), Vranac* (3)				
	Zadar	Savarska ul.		44°06'45.2"N 15°14'19.7"E	1	Nepoznata introducirana sorta			
Poličnik	Suhovare 1	44°09'41.4"N 15°25'52.7"E		50	Cabernet Sauvignon*				
	Suhovare 2	44°09'36.4"N 15°24'49.9"E		50	Plavina (10), Cabernet Sauvignon* (40)				
Benkovac	Nadin	44°02'46.99"N 15°29'29.00"E		22	Plavac mali (20), Crljenak kaštelanski (2)				
Dalmacija	Zadarska	otok Pag		Pag 1	44°24'44.5"N 15°05'58.0"E	25	Merlot*		
				Pag 2	44°24'46.9"N 15°06'03.7"E	30	Muškatel		
				Pag 3	44°24'47.5"N 15°06'05.0"E	58	Gegić (22), Topol (3), Cipar (14), Debit (19)		
			Pag 4	44°24'46.7"N 15°06'05.3"E	30	Paška maraština			
			Pag 5	44°24'48.5"N 15°06'07.2"E	41	Plavina (20), Debit (21)			
			Pag 6	44°24'49.7"N 15°06'05.7"E	16	Merlot*			
		Nin	Kraljičina plaža	44°14'43.2"N 15°10'30.3"E	50	Maraština			
		Zemunik	Zemunik Donji	44°05'52.0"N 15°23'28.2"E	50	Plavina			
		Šibensko- kninska	Primošten	Vezac	43°34'46.5"N 15°59'52.3"E	10	Babić		
				Bucavac	43°34'04.0"N 15°56'35.1"E	30			

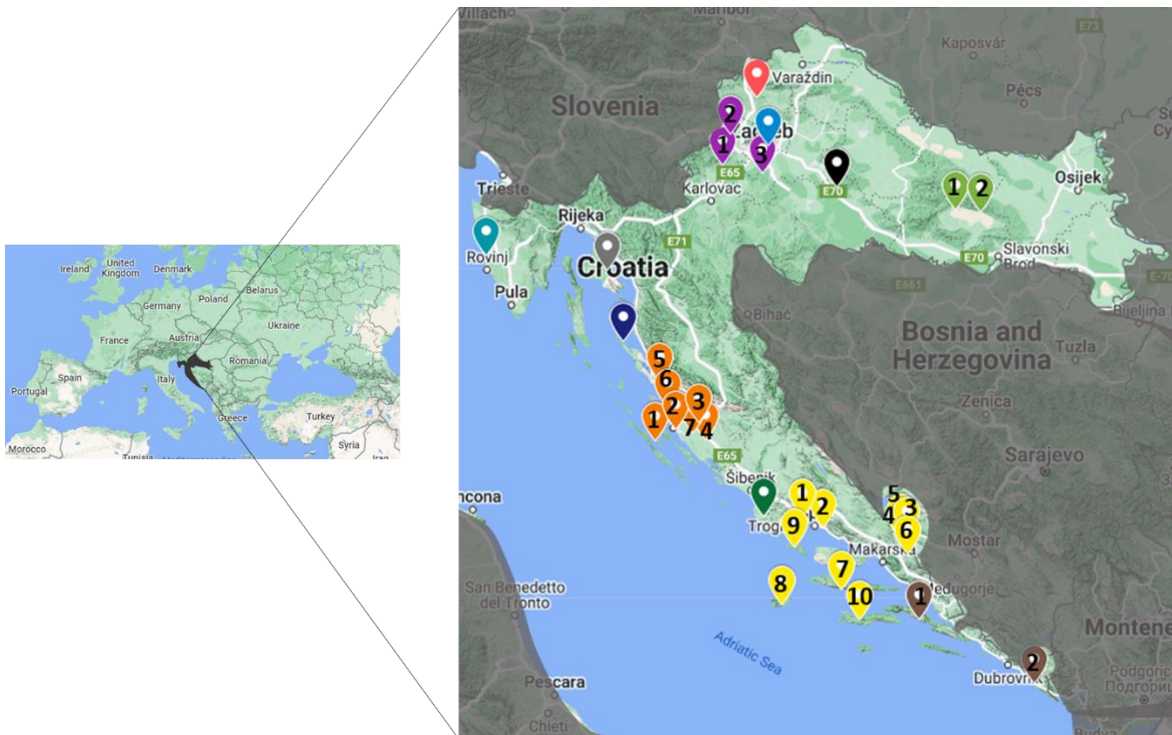
* introducirana sorta

Tablica 3.3. Nastavak

Regija	Županija	Mjesto	Lokacija	Koordinate	Broj testiranih biljaka	Testirane sorte (broj biljaka)	
Dalmacija	Splitsko-dalmatinska	Kaštela	Kaštel Sućurac	43°33'18.4"N 16°25'48.5"E	50	Mladenka	
			Radun	43°34'11.5"N 16°20'36.3"E	54	Ljutun	
			Kaštel Lukšić	43°34'00.5"N 16°21'07.0"E	50	Glavinuša	
			Furnaže	43°34'21.2"N 16°19'32.6"E	50	Mladenka	
			Marceline	43°34'23.3"N 16°19'26.9"E	54	Vlaška	
			Stomorija	43°34'11.0"N 16°19'15.2"E	50		
			Bristi 1	43°33'31.1"N 16°19'19.9"E	25	Babica	
			Bristi 2	43°33'34.0"N 16°19'20.6"E	25		
			Kaštel Stari 1	43°33'46.9"N 16°19'51.8"E	40	Ljutun (20), Babica (20)	
			Kaštel Stari 2	43°33'50.4"N 16°19'54.3"E	30	Crljenak kaštelanski	
			Split	Kolekcijski nasad	43°30'22.5"N 16°29'50.1"E	105	autohtone (94) i introducirane (11) sorte
			Imotski	Glavina Gornja	43°27'47.02"N 17°12'48.71"E	33	Trnjak
				Poljica-Kljenak	-	16	
				Poljica-Dubrava	-	18	Kujundžuša
	Blato	-		17			
	Banane	-		21	Kujundžuša (20), Trnjak (1)		
	Pešine njive	-		14	Kujundžuša		
	Gudelji	-		10			
	Račić	-		12	Kujundžuša (10), Trnjak (2)		
	Perići	-		12	Kujundžuša (6), Trnjak (6)		
	Divići	-		7	Kujundžuša		
	Seline	-		19	Trnjak		
	Podbablje	Drum		43°25'06.14"N 17°10'14.80"E	26	Kujundžuša	
		Hršćevani		43°24'48.56"N 17°11'26.37"E	19	Kujundžuša	
	Proložac	Vučija Draga		43°28'26.8"N 17°09'49.1"E	135	Kujundžuša (22), Trnjak (103), Pošip (10)	
		Bušanje		43°29'30.65"N 17°9'40.62"E	52	Kujundžuša (50), Trnjak (2)	
	Runovići	Runović	43°23'12.23"N 17°14'24.42"E	2	Trnjak		
		Slivno	43°20'16.89"N 17°13'53.46"E	12	Kujundžuša (5), Trnjak (7)		
	otok Hvar	Velo vijelo	43°09'48.1"N 16°39'48.7"E	50			
Ivan Dolac 1		43°07'32.9"N 16°39'08.6"E	50				
Ivan Dolac 2		43°07'32.9"N 16°39'08.6"E	50	Plavac mali			
Crkvenik		43°08'16.8"N 16°35'18.1"E	50				
otok Vis	Petričevo	43°01'34.0"N 16°08'51.2"E	231				
	otok Šolta						

Tablica 3.3. Nastavak

Regija	Županija	Mjesto	Lokacija	Koordinate	Broj testiranih biljaka	Testirane sorte (broj biljaka)
Dalmacija	Splitsko-dalmatinska	otok Šolta	Srednje Selo 1	43°23'39.7"N 16°16'00.6"E	60	Pošip (20), Plavac mali (20), Dobričić (20)
			Srednje Selo 2	43°23'42.4"N 16°15'51.3"E	20	Dobričić
			Srednje Selo 3	43°23'30.2"N 16°15'49.1"E	50	Plavac mali (10), Babić (10), Crljenak kaštelanski (10), Pošip (10), Dobričić (10)
			Gornje Selo 1	43°21'16.7"N 16°19'39.9"E	20	Dobričić
			Gornje Selo 2	43°21'26.9"N 16°19'36.8"E	10	
			Gornje Selo 3	43°21'28.3"N 16°19'39.0"E	10	
			Gornje Selo 4	43°21'37.3"N 16°20'34.1"E	10	
			Gornje Selo 5	43°21'00.1"N 16°21'19.9"E	1	
	Dubrovačko-neretvanska	Pelješac	Bioka	42°58'31.3"N 17°13'57.2"E	5	Plavac mali
			Dingač	42°56'16.4"N 17°19'36.6"E	2	
			Plandište	42°56'49.8"N 17°20'39.0"E	4	
		Drvenik	42°57'22.1"N 17°20'54.8"E	2		
		Kuna Pelješka	42°57'51.4"N 17°20'01.5"E	12		
		Konavle	Pridvorje	42°32'7.43"N 18°20'5.96"E	34	
			Komaji 1	42°32'8.13"N 18°18'9.90"E	5	
		Komaji 2	42°32'1.55"N 18°17'8.60"E	15		
Ukupno – priobalje					3008	
UKUPNO – kontinent i priobalje					4327	



Slika 3.2. Mjesta uzorkovanja po županijama u Hrvatskoj u blizini kojih su sakupljeni uzorci vinove loze za potrebe utvrđivanja rasprostranjenosti istraživanih virusa: zelene oznake – Požeško-slavonska: 1–Velika, 2–Kutjevo; crna oznaka – Sisačko-moslavačka: Popovača; crvena oznaka – Krapinsko-zagorska: Sveti Križ Začretje; ljubičaste oznake – Zagrebačka: 1–Plešivica, 2–Marija Gorica, 3–Velika Gorica; plava oznaka – Zagreb; tirkizna oznaka – Istarska: Poreč; siva oznaka – Primorsko-goranska: otok Krk; tamnoplava oznaka – Ličko-senjska: otok Pag; narančasta oznaka – Zadarska: 1–otok Rava, 2–Zadar, 3–Poličnik, 4–Benkovac, 5–otok Pag, 6–Nin, 7–Zemunik; tamno-zelena oznaka – Šibensko-kninska: Primošten; žute oznake – Splitsko-dalmatinska: 1–Kaštela, 2–Split, 3–Imotski, 4–Podbablje, 5–Proložac, 6–Runovići, 7–otok Hvar, 8–otok Vis, 9–otok Šolta; smeđe oznake – Dubrovačko-neretvanska: 1–Pelješac, 2–Konavle.

3.5. Sekvenciranje novootkrivenih izolata virusa i filogenetske analize

S većine lokacija/vinograda u Hrvatskoj u kojima je potvrđena prisutnost GVG i GBV-1 odabrane su zaražene biljke s ciljem utvrđivanja divergentnosti populacija virusa. Ukupno je s 19 lokacija sakupljeno 35 uzoraka peteljki listova od biljaka inficiranih s GVG, pri čemu je s devet lokacija (Mala Rava, Vela Rava, Kaštel Sućurac, Radun, Marceline, Stomorija, Bristi 2, zbirka virusa vinove loze SZAF i koleksijski vinograd u Splitu) odabrano više biljaka (dvije ili tri), kako bi se dobio uvid u divergentnost GVG unutar pojedinih vinograda/lokacija. S preostalih 10 lokacija (Gornje Selo 2, Srednje Selo 2, Furnaže, Kaštel Stari 2, Pod Moču, Nin, Bucavac, Nacionalna kolekcija autohtonih sorata vinove loze SZAF, Pag 3 i Zemunik) odabrana je po jedna zaražena biljka s ciljem utvrđivanja divergentnosti između vinograda/lokacija. U istraživanju GBV-1 odabrano je ukupno 50 biljaka podrijetlom s 23

lokacije: s 9 lokacija (Mala Rava, Vela Rava, Imotski, Kaštel Sućurac, Ivan Dolac 1, Ivan Dolac 2, Kaštel Lukšić, Velo Vijelo, Vis) po tri ili četiri zaražene biljke, iz kolekcijskog nasada u Splitu šest biljaka, te iz ostalih 13 lokacija (Kršete, Furnaže, Stomorija, Radun, Nacionalna kolekcija autohtonih sorata vinove loze SZAF, Pag 4, Srednje Selo 2, Gornje Selo 2, Kraljičina plaža, Zemunik Donji, Kaštel Stari 2, Bucavac i zbirka virusa vinove loze SZAF) po jedna biljka.

Izolirana TNA iz ukupno 85 uzoraka peteljki listova je korištena kao kalup u RT-PCR reakcijama u slučaju GVG, odnosno u PCR reakcijama u slučaju GBV-1, koje su pripremljene u reakcijskim volumenima od 25 μ L. U detekciji virusa navedenim metodama korištene su novodizajnirane početnice u CP regiji genoma za GVG i RT regiji za GBV-1. Uspješnost reakcija provjerena je vizualizacijom PCR produkata na agaroznom gelu nakon provedene horizontalne elektroforeze (opisano u poglavlju 3.2.1.). PCR produkti su potom dvosmjerno sekvencirani Sangerovom metodom u tvrtci Macrogen Europe (Amsterdam, Nizozemska), a nakon toga su sekvence pregledane u programu Bioedit 7.2. (Hall, 1999). Od dobivenih uzvodnih i nizvodnih sekvenci za svaki izolat kreirane su konsenzusne sekvence u programu MEGA 11 (Tamura i sur., 2021), pri čemu su uklonjene regije komplementarne početnicama. Dobivene sekvence su zatim uspoređene sa sekvencama iz baze GenBank korištenjem alata BLASTn i BLASTx. U istraživanju ukupne divergentnosti GVG izolata korištena su dva izolata sekvencirana metodom HTS u ovom istraživanju (VVL-150 i VM-160), 35 izolata sekvenciranih Sangerovom metodom te 11 izolata iz baze GenBank. U slučaju GBV-1, divergentnost je procijenjena na temelju četiri izolata sekvenciranih metodom HTS u ovom istraživanju (PMC-235, PMC-282, PMC-313 i VG-102), 50 izolata sekvenciranih Sangerovom metodom i jednog izolata iz baze GenBank (VLJ-178) (Tablica 3.2). U programu MEGA 11 su sve sekvence najprije poravnate metodom clustal W te su kreirane matrice udaljenosti (eng. *distance matrix*) korištenjem modela p-udaljenosti (eng. *p-distance*), pri čemu je utvrđena divergentnost unutar populacija na nukleotidnoj (nt) i aminokiselinskoj (aa) razini. U istom programu kreirana su filogenetska stabla korištenjem statističke metode najveće vjerojatnosti (eng. *maximum likelihood*, ML), uz najpogodniji model nukleotidne supstitucije koji je odabran prema najmanjoj vrijednosti Bayesovog informacijskog kriterija (eng. *Bayesian information criterium*, BIC). Za ukorjenjivanje filogenetskog stabla sastavljenog od GBV-1 izolata u RT regiji genoma korišten je GRLDaV izolat w4 (HG940503) preuzet iz baze GenBank.

3.6. Utvrđivanje načina prijenosa

3.6.1. Testovi prijenosa ličinkama lozine štitaste uši (*Planococcus ficus* Sign.)

Istraživanje prijenosa GVG i GBV-1 provedeno je u uvjetima plastenika korištenjem prvog i drugog stadija ličinki lozine štitaste uši (*Planococcus ficus*), kao potencijalnog vektora. U tu je svrhu osnovana kolonija štitastih uši na muškatoj tikvi (*Cucurbita moschata* Duch.), na koju je naseljena jedna odrasla ženka. Determinacija vrste štitaste uši provedena je metodom PCR prema protokolu Daane i sur. (2011). Kao izvor inokuluma virusa korištene su dvije biljke iz zbirke virusa vinove loze SZAF: biljka sorte 'Vlaška' (VVL-112) inficirana s GVG i GLRaV-3 te biljka sorte 'Plavac mali' inficirana s GBV-1. Sanitarni status navedenih biljaka, u pogledu zaraze s drugim virusima, je prethodno potvrđen metodom RT-qPCR po protokolima za GVA i GVB (Osman i Rowhani, 2008), GFkV (Osman i sur., 2008), GLRaV-1 (Osman i sur., 2007) te GLRaV-3 (Diaz-Lara i sur., 2018b), dok su za potrebe detekcije ArMV i GFLV korištene početnice dizajnirane na Sveučilištu Davis (Plant Service, SAD, Al Rwahnih – osobna komunikacija)

Test biljke korištene u ovom istraživanju bile su sjemenjaci vinove loze uzgojeni na Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo (SZAF) od bezvirusnih biljaka sorata 'Grk' x 'Panonia' i 'Žlahtina'. Prethodno testirane neinficirane biljke služile su kao izvor sjemena koje je sakupljeno u fiziološkoj zrelosti (krajem rujna). Sjeme je najprije površinski sterilizirano s 5 %-tnom otopinom Izosan G (Pliva, Zagreb, Hrvatska) te zatim stratificirano u vlažnom pijesku u hladnjaku na 5 °C u trajanju od 72 dana. Sjeme je potom stavljeno na vlažan filter papir u Petrijeve zdjelice, nakon čega je uslijedilo naklijavanje u komori rasta na 25 °C uz 16 sati svjetla. Proklijalo sjeme dezinficirano je 5 %-tnom otopinom Izosan G u trajanju od 15 minuta te namočeno u otopinu (5 %) Plant preservative mixture (PPM; Plant Cell Technology, Washington, SAD) u trajanju od četiri sata. Sjeme je zatim posijano u poliesterske kontejnere napunjene supstratom TS-2 medium (Klasmann-Deilmann, Geeste, Njemačka). U fazi 3 – 5 razvijenih listova sjemenjaci su presađeni u tegle volumena 3 L (napunjene supstratom) te su korišteni u testovima prijenosa.

Osim sjemenjaka vinove loze, u testovima prijenosa vektorom korištene su zeljaste test biljke česte u eksperimentalnim prijenosima virusa vinove loze: *Chenopodium murale* L. i *Nicotiana benthamiana* D. Korištene su i jednogodišnje korovne vrste česte u vinogradima u Hrvatskoj: oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus* L.), ambrozija (*Ambrosia artemisifolia* L.), bijela loboda (*Chenopodium album* L.) i sitnocvijetna konica (*Galinsoga parviflora* Cav.). Biljke su uzgojene u plasteniku iz sjemena nezaraženih majčinskih biljaka, koje su prethodno testirane na GVG i GBV-1. U svrhu prekidanja dormantnosti sjemena

prije sjetve u tegle sa supstratom, sjeme biljaka *A. retroflexus*, *A. artemisifolia* i *C. album* je tretirano 2 %-tnom otopinom KNO_3 u trajanju od 24 sata. Slika 3.3 prikazuje test biljke u različitim fazama prijenosa GVG i GBV-1 ličinkama lozine štitaste uši.



Slika 3.3. Test biljke snimljene u stadiju 3 – 5 pravih listova u fazi akvizicije vektora (lijevo) i u odraslom stadiju u fazi inkubacije (desno): sjemenjak vinove loze sorte 'Grk' x 'Panonia' (A); zeljaste test biljke *Chenopodium murale* (B) i *Nicotiana benthamiana* (C); korovne vrste *Amaranthus retroflexus* (D) *Ambrosia artemisifolia* (E), *Chenopodium album* (F) i *Galinsoga parviflora* (G).

Dvogodišnji (2020. i 2021.) testovi prijenosa vektorom za oba virusa provedeni su korištenjem akvizicijskog razdoblja (eng. *acquisition access period*, AAP) na zaraženim lozama u trajanju od 48 sati, a u slučaju negativnih kontrola akvizicijsko razdoblje odvijalo se na nezaraženim biljkama vinove loze sorte 'Plavac mali', prethodno testiranim na GVG i GBV-1. Inokulacijsko razdoblje (eng. *inoculation access period*, IAP) provedeno je na testnim sjemenjacima vinove loze, zeljastim biljkama i korovima u trajanju od 48 sati, uz korištenje 10 ličinki lozine štitaste uši (*Pl. ficus*) po biljci (Slika 3.4). Po završetku inokulacijskog razdoblja test biljke su tretirane insekticidom na bazi djelatne tvari imidakloprid (Confidor SL 200 – Bayer AG, Leverkusen, Njemačka) te su čuvane u plasteniku tijekom dvomjesečnog razdoblja. Po isteku navedenog razdoblja peteljke listova test biljaka su korištene za izolaciju TNA pomoću metode GES te su izolirane TNA testirane na istraživane viruse metodom višestrukog RT-qPCR. Sljedeće vegetacijske sezone, odnosno devet mjeseci nakon inokulacije, ponovno su sakupljene peteljke listova korištenih biljaka vinove loze te su obrađene i testirane navedenim metodama, u svrhu još preciznijeg utvrđivanja sposobnosti prijenosa istraživanih virusa vektorom.

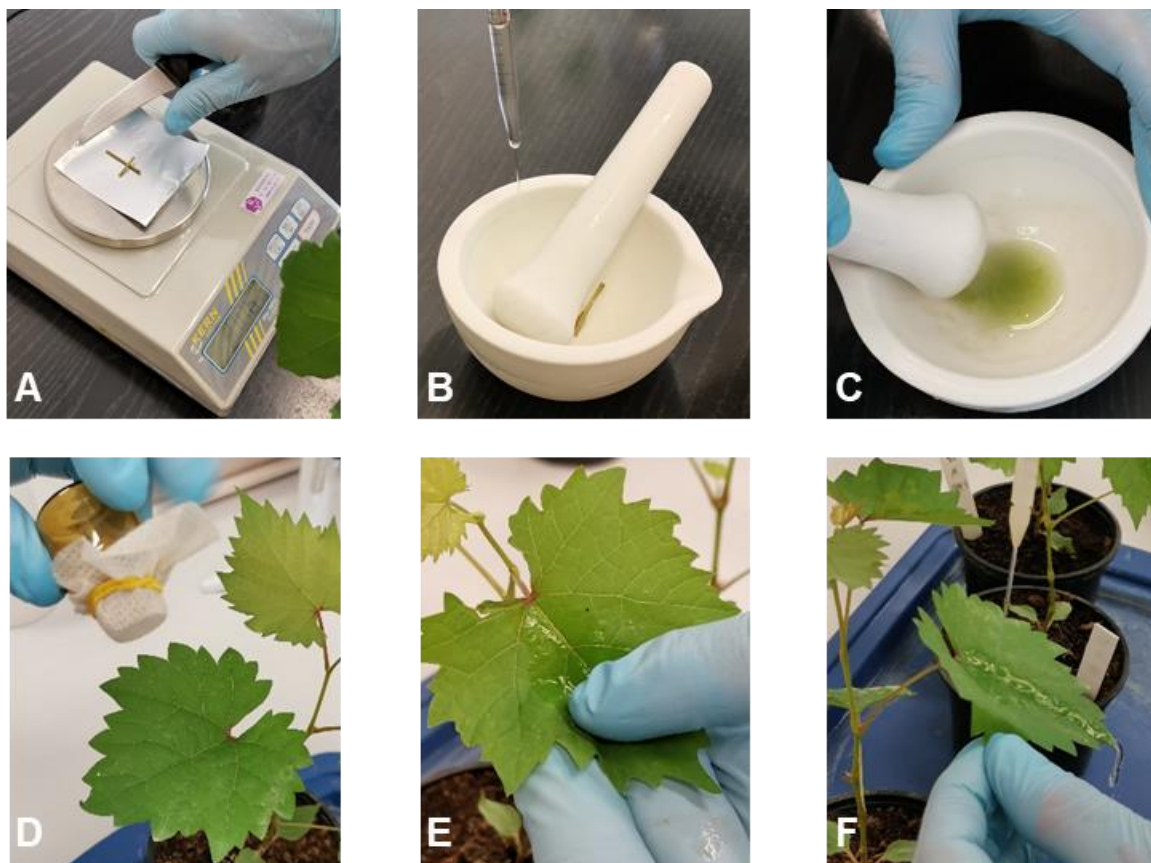


Slika 3.4. Prikaz ličinke lozine štitaste uši (*Planococcus ficus*) u različitim fazama testova prijenosa: ličinka prvog stadija u usporedbi s dlačicama kista snimljena pod stereomikroskopom (povećanje 200X) prije akvizicijskog razdoblja (A); ličinka prvog stadija snimljena pod stereomikroskopom (povećanje 250X) u fazi akvizicije na naličju lista vinove loze uz glavnu žilu (B); ličinke prvog i drugog stadija tijekom inokulacijskog razdoblja na licu lista vrste *Ambrosia artemisifolia* (C).

3.6.2. Testovi prijenosa mehaničkom inokulacijom

U istraživanju prijenosa GVG i GBV-1 mehaničkom inokulacijom korištene su sljedeće test biljke: sjemenjaci vinove loze sorte 'Grk' x 'Panonia', zeljaste test biljke *C. murale* i *N. benthamiana* te korovi *A. retroflexus*, *A. artemisifolia*, *C. album*, *G. parviflora* i europski mračnjak (*Abuthilon theophrasti* Medik.). Biljke su uzgojene iz sjemena neinficiranih majčinskih biljaka prema metodologiji opisanoj pod 3.6.1. Uzgojene biljke su u fazi 3 – 5 razvijenih listova korištene u testovima mehaničkog prijenosa, pri čemu je njihov broj ovisio je o broju dobro razvijenih i zdravih biljaka nakon sjetve.

Biljke korištene kao izvori inokuluma u dvogodišnjim testovima prijenosa mehaničkom inokulacijom (2020. i 2021.) bile su iste kao i za potrebe prijenosa vektorom (poglavlje 3.6.1.). Peteljke zaraženih biljaka sakupljene su u ukupnoj masi od 1 g i homogenizirane u tarioniku uz pomoć tučka te korištenjem tri različita inokulacijska pufera u omjeru 1:10 (masa biljnog materijala : volumen pufera). Korišteni su sljedeći puferi: (a) 0,1 M fosfatni pufer (0,039 M KH_2PO_4 i 0,061 M Na_2HPO_4 ; pH 7) (Martelli, 1993c); (b) 2,5 % nikotinski pufer (-Nicotine – Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) (Martelli, 1993c); te (c) fosfat-nikotin-cistein pufer (3 % (-) Nicotine, 0,01 M KH_2PO_4 i 0,01 M L-cysteine hydrochloride – Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) (Boscia i sur., 1993). Kao negativne kontrole homogenizirane su peteljke nezaraženih biljaka sorte 'Plavac mali'. Dobiveni homogenizati biljnog materijala i pufera utrljani su prstom na lice lista testnih biljaka i biljaka negativnih kontrola, koje su prethodno posipane abrazivnim prahom (karborundum) od 600-mesh (Bioz, Los-Altos, SAD). Prema Martelli (1993c), inokulirani listovi isprani su destiliranom vodom odmah nakon provedene inokulacije (Slika 3.5). Inokulirane biljke čuvane su tri mjeseca u plasteniku, nakon čega su sakupljene peteljke listova te su obrađene metodom GES, a dobivene TNA testirane razvijenom metodom višestrukog RT-qPCR.



Slika 3.5. Prikaz provedbe prijenosa virusa mehaničkom inokulacijom: određivanje mase zaraženog biljnog materijala na analitičkoj vagi (A); dodatak inokulacijskog pufera u tarionik s odvaganim biljnim materijalom (B); homogenizacija biljnog materijala uz pomoć tučka (C); nanošenje abrazivnog praha na lice lista bezvirusnog sjemenjaka vinove loze (D); utrljavanje homogenata na plojku lista (E); ispiranje lista s destiliranom vodom (F).

3.6.3. Testovi prijenosa sjemenom vinove loze

Biljke autohtonih hrvatskih sorata vinove loze zaražene s GBV-1 ('Stara brajda', 'Galac crni', 'Gustopupica', 'Soić crni', 'Mekuja' i 'Krstičevica' – Nacionalna kolekcija autohtonih sorata vinove loze SZAF) korištene su kao izvor sjemena za proizvodnju sjemenjaka (Slika 3.6). U istu svrhu korišteno je pet biljaka sorte 'Žlahtina' s lokacije Pod Moću (otok Krk) zaraženih s GVG. Protokol proizvodnje sjemenjaka od inficiranih majčinskih biljaka bio je isti kao protokol proizvodnje sjemenjaka od bezvirusnih majčinskih biljaka opisan u poglavlju 3.6.1. Kao negativne kontrole proizvedeni su sjemenjaci od nezaraženih biljaka sorte 'Plavac mali'. Broj korištenih biljaka ovisio je o broju zdravih biljaka koje su dospjele u fazu 3 – 5 razvijenih listova (bez kotiledona). U toj fazi rasta sjemenjaka sakupljene su njihove peteljke te su korištene za izolaciju TNA metodom GES. Dobiveni uzorci izolirane TNA testirani su novorazvijenom metodom višestrukog RT-qPCR, kao potvrda prijenosa GVG i GBV-1 sjemenom vinove loze.



Slika 3.6. Prikaz postupka uzgoja sjemenjaka iz sjemena sakupljenog od biljke vinove loze zaražene s GVG: grozd sorte 'Žlahtina' u fiziološkoj zrelosti (A); izdvojeno i osušeno sjeme (B); sjemenke potopljene u otopinu PPM neposredno prije sjetve (C); sjetva sjemena u poliesterske kontejnere napunjene supstratom (D); sjemenjak vinove loze u optimalnoj fazi za testiranje (3 – 5 razvijenih listova).

3.6.4. Testovi prijenosa cijepljenjem „na zrelo“

Rozgve biljaka zaraženih s GVG, s GBV-1, s mješovitom infekcijom (GVG + GBV-1) te rozgve neinficiranih biljaka (za potrebe negativnih kontrola) prikupljene su u fenofazi zimskog mirovanja iz komercijalnih vinograda priobalne Hrvatske. Prije cijepljenja s nezaraženim podlogama iste su potopljene u otopinu fungicida na bazi djelatne tvari fenheksamid (0,15 % pripravak Teldor SC 500 – Bayer AG, Leverkusen, Njemačka) i propamokarb (0,2 % pripravak Proplant – Agriphar S.A, Ougrée, Belgija). Zaražene i nezaražene rozgve su zatim cijepljene s rozgvama bezvirusnih indikatora koje su sakupljene iz kolekcijanskog nasada vinove loze i loznih podloga/indikatora SZAF, redom: *V. rupestris*, *V. riparia*, Kober 5BB (*V. berlandieri* × *V. riparia*) i LN 33 (Couderc 1613 × *V. berlandieri*). Stratifikacija cijepova provedena je u piljevini u trajanju od 30 dana, nakon čega su cijepovi posađeni u tegle volumena 3 L napunjene s mješavinom supstrata Steckmedium i TS-2 (KlasmannDeilmann, Geeste, Njemačka) (Slika 3.9). Posađeni cijepovi su čuvani u plasteniku u trajanju od 14 mjeseci, prilikom čega su odbacivani oni kod kojih plemka nije

srasla s podlogom. Peteljke listova s nacijepljenih indikatora sakupljene su po završetku navedenog razdoblja te su testirane na GVG i GBV-1 novorazvijenom metodom višestrukog RT-qPCR, uz prethodnu izolaciju TNA metodom GES.

3.6.5. Testovi prijenosa cijepljenjem „zeleno na zrelo“

Prijenos GVG i GBV-1 cijepljenjem „zeleno na zrelo“ odrađen je metodom cijepljenja zelenih pupova na indikatorske biljke tehnikom okuliranja na T-spoj (eng. *T-budding*). Kao najčišći izvori GVG i GBV-1 odabrani su sjemenjaci vinove loze, u kojima su virusi detektirani metodom višestrukog RT-qPCR nakon provedenih eksperimenata prijenosa vektorom. Sjemenjaci zaraženi s GBV-1 sadržavali su samo navedeni virus, dok su sjemenjaci zaraženi s GVG u isto vrijeme bili pozitivni i na GLRaV-3. U svibnju su s jednogodišnjih mladica zaraženih i nezaraženih sjemenjaka (prethodno uzgajanih u plasteniku) uzeti zeleni pupovi te su cijepljeni (u tri ili četiri repeticije) u T-izrez pod koru (Slika 3.7) dvogodišnjih ukorijenjenih reznica sljedećih indikatora: Kober 5BB, LN 33, 110 Richter (*V. berlandieri* × *V. rupestris*), *V. rupestris*, *V. riparia* i biljaka vinove loze sorata 'Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon'. Cijepljeni indikatori su čuvani u plasteniku u trajanju od 5 mjeseci. Primitak cijepljenih pupova i folijarni simptomi na indikatorskim biljkama praćeni su jednom tjedno. Po isteku navedenog razdoblja sakupljene su peteljke listova indikatorskih biljaka te su korištene za izolaciju TNA metodom GES, nakon čega je metodom višestrukog RT-qPCR provjerena njihova zaraženost istraživanim virusima. Po završetku razdoblja od 5 mjeseci vizualno je pregledano i drvo (centralni cilindar) indikatora nakon skidanja kore, radi utvrđivanja promjena uslijed infekcije s GVG i GBV-1.



Slika 3.7. Postupak provedbe metode cijepljenja „zeleno na zrelo“: umetanje zaraženog pupa vinove loze pod koru ukorijenjenog indikatora tehnikom okuliranja na T-spoj (A); omatanje cijepljenog mjesta parafilmom (B); izboj izrastao iz nacijepljenog pupa 30 dana nakon cijepljenja (C).

4. REZULTATI

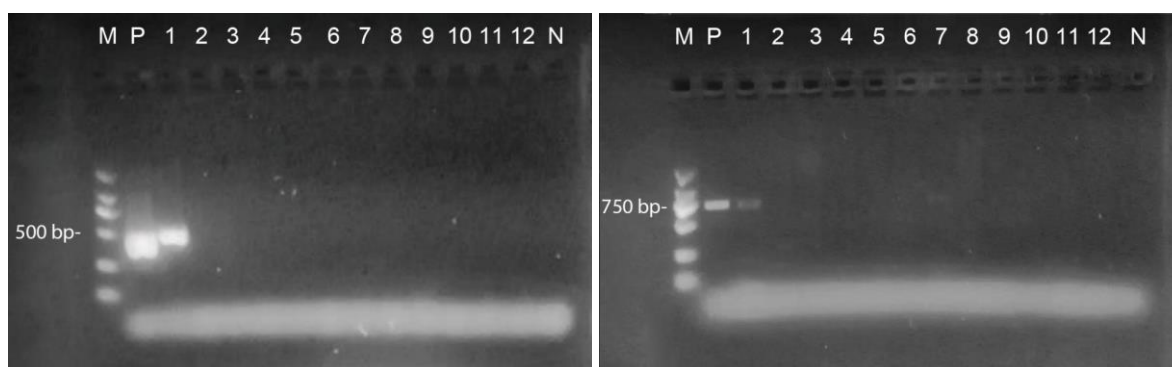
4.1. Izolacija nukleinskih kiselina

Provedbom spektrofotometrijskog mjerenja DNA i RNA izoliranih komercijalnim kompletima DNeasy i RNeasy Plant Mini Kit, dobivene su vrijednosti koncentracije i čistoće za sve 196 biljke iz zbirke virusa vinove loze SZAF. Koncentracije RNA izoliranih iz rozgve kretale su se u rasponu 2,00 – 83,20 ng/μL, a iz peteljke 4,00 – 7,60 ng/μL, pri čemu su srednje vrijednosti iznosile 12,55 ng/μL za rozgvu i 7,19 ng/μL za peteljke listova. Raspon koncentracija DNA dobivenih izolacijom iz peteljki listova iznosio je 3,00 – 43,50 ng/μL, pri čemu je prosjek iznosio 12,55 ng/μL. Omjeri apsorbancije određeni pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm pokazali su srednju vrijednost čistoće RNA izolirane iz rozgve od 1,65, a iz peteljki listova od 2,12. Nasuprot tome, isti omjer apsorbancije imali su srednju vrijednost čistoće DNA izolirane iz peteljke od 1,81 (Prilog 1).

4.2. Razvoj molekularnih metoda detekcije

4.2.1. Detekcija izolata poznatim protokolima

Testiranjem izoliranih RNA i DNA otprije poznatim protokolima za RT-PCR (GVG), odnosno PCR (GBV-1), potvrđeni su novi izolati GVG i GBV-1 u zbirci virusa vinove loze SZAF. Korištenjem para početnica F13/R13 u CP regiji potvrđena je zaraženost s GVG u biljci sorte 'Vlaška' (VVL-150) (Slika 4.1 A) i 'Mladenka' (VM-160), dok je GBV-1, primjenom para početnica F2/R2 u genu za poliprotein, detektiran u tri biljke sorte 'Plavac mali' (PMC-235, PMC.282, PMC-313) i jednoj biljci sorte 'Glavinuša' (VG-102) (Slika 4.1 B).



Slika 4.1. Vizualizacija PCR produkata na agaroznom gelu umnoženih metodom RT-PCR korištenjem parova početnica F13/R13 (500 baznih parova) za GVG u regiji genoma kapsidnog proteina (CP) (A) te metodom PCR korištenjem para početnica F2/R2 (731 baznih parova) za GBV-1 u regiji genoma poliproteina (B). Oznake: M–DNA ljestvica (GelPilot Mid Range Ladder); P–pozitivna kontrola; 1–izolat VVL-150 (A) i VG-102 (B); 2–12–uzorci negativni na istraživane viruse; N–negativna kontrola.

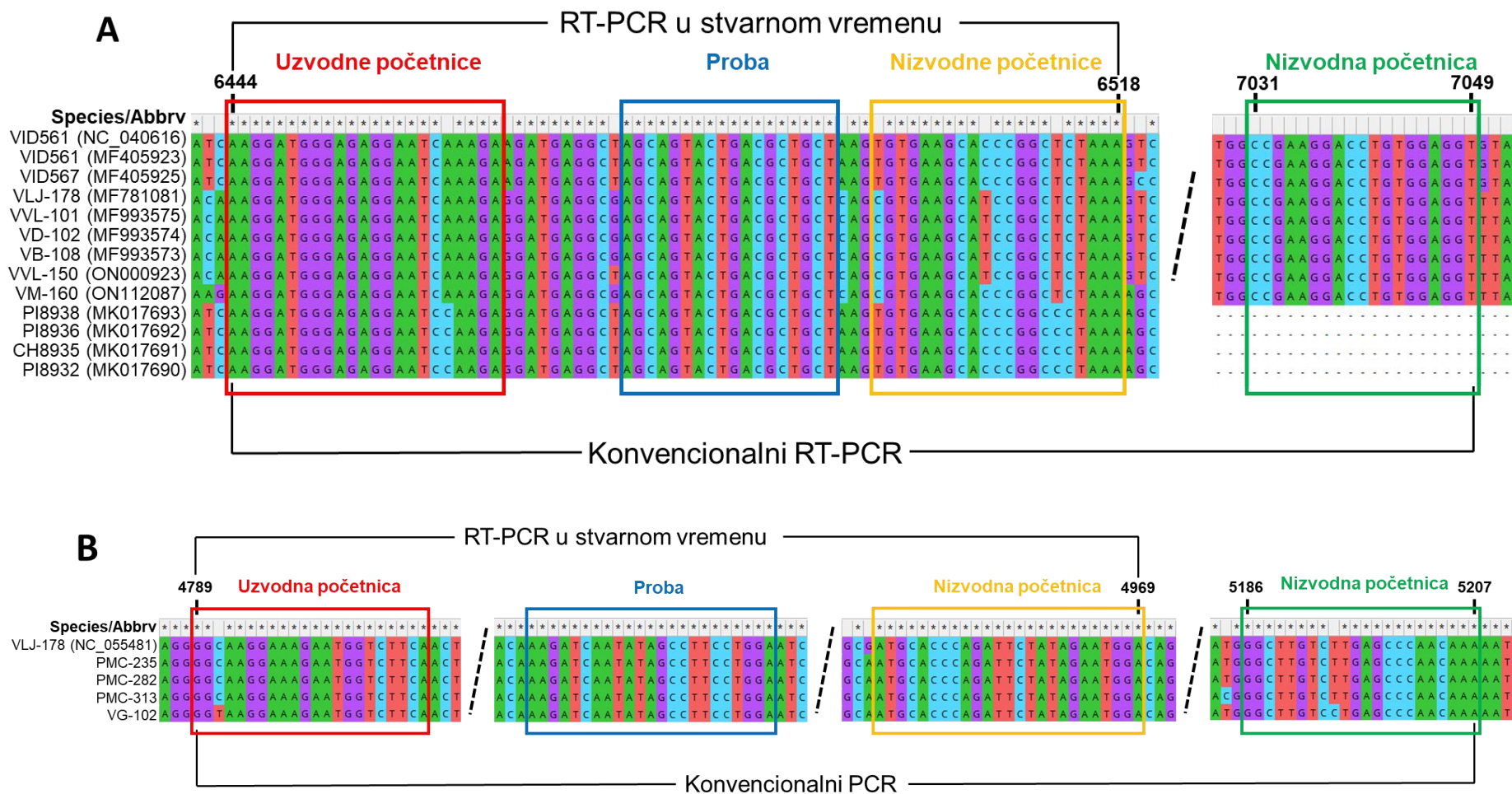
4.2.2. Dizajniranje novih početnica i proba

Novootkriveni izolati GVG (2) i GBV-1 (4) dodatno su analizirani metodom HTS kako bi se dobio uvid u što veći dio genoma. Sekvence novih GVG izolata VVL-150 i VM-160 (Prilog 2) poravnate su zajedno sa sekvencama 11 otprije poznatih izolata preuzetih iz baze GenBank (Tablica 3.2), pri čemu je CP regija genoma utvrđena kao najmanje divergentna. Nasuprot tome, kao najkonzerviraniji dio genoma GBV-1 utvrđena je RT regija i to nakon usporedbe četiri novootkrivena izolata PMC-235, PMC-282, PMC-313 i VG-102 (Prilog 3) s izolatom VLJ-178 iz baze GenBank. Unutar CP i RT regije genoma dizajnirane su nove početnice i probe za protokole detekcije temeljene na metodi PCR (Tablica 4.1). Položaj novodizajniranih početnica i proba za detekciju GVG i GBV-1 u CP, odnosno RT regiji genoma virusa prikazan je na Slici 4.2.

Tablica 4.1. Sekvence novodizajniranih početnica i proba korištene u različitim izvedbama metode PCR za detekciju istraživanih virusa.

Virus	Početnica/ proba	Smjer	PCR izvedba / gen	Sekvenca (5' – 3')	Veličina produkta u baznim parovima (bp)
GVG	GVG F1	uzvodna početnica	RT-qPCR / kapsidni protein (CP)	AAGGATGGGAGAGGAATCAAAGA	73 – 75
	GVG F2	uzvodna početnica		AAGGATGGGAGAGGAATCCAAG	
	GVG R1	nizvodna početnica		TTTAGAGCCGGGTGCTTCAC	
	GVG R2	nizvodna početnica		TAGAGCCGGATGCTTCACG	
	GVG R3	nizvodna početnica		TTTAGGGCCGGGTGCTTC	
	GVG P	TaqMan proba		NED-AGCAGTACTGACGCTGCT-MGB	
GVG	GVG F1	uzvodna početnica	Konvencionalni RT- PCR / CP	AAGGATGGGAGAGGAATCAAAGA	606
	GVG F2	uzvodna početnica		AAGGATGGGAGAGGAATCCAAG	
	GVG Rev- PCRcon	nizvodna početnica		ACCTCCACAGGTCCTTCGG	
GBV-1	GBV-1-F	uzvodna početnica	RT-qPCR / reverzna transkriptaza (RT)	GGYAAGGAAAGAATGGTCTTCA	181
	GBV-1-R	nizvodna početnica		TCCATTCTATAGAATCTGGGTGCAT	
	GBV-1-P	TaqMan proba		FAM-AAGATCAATATAGCCTTCCTGGA-MGB	
	GBV-1-F	uzvodna početnica		GGYAAGGAAAGAATGGTCTTCA	
	GBV-1- R_con	Nizvodna početnica		TTTGTTGGGCTCARGACAAGCC	

Y–C ili T; R–A ili G



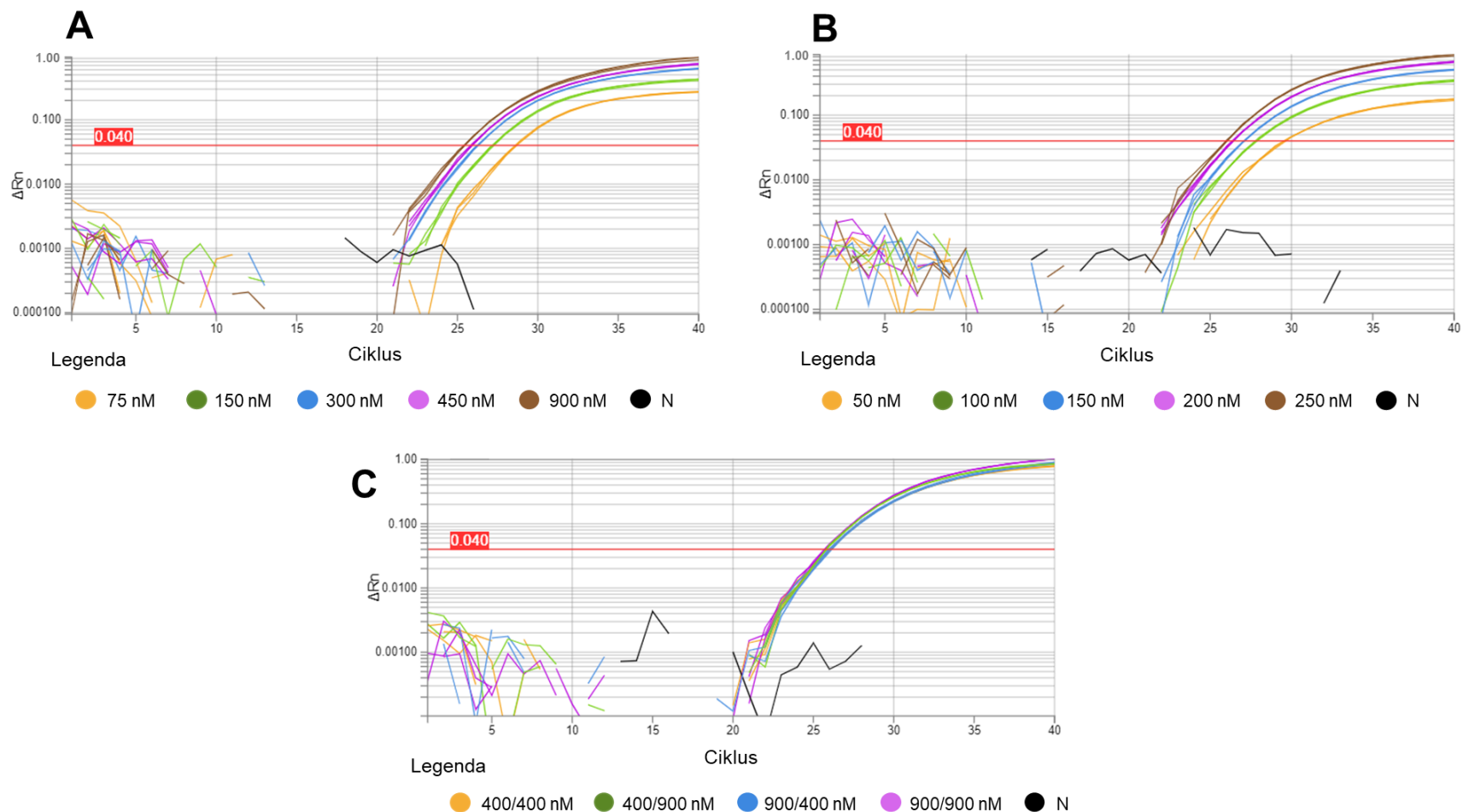
Slika 4.2. Odabrane regije genoma za sintezu početnica i proba na osnovu CP regije za GVG (A) te RT regije za GBV-1 (B). Grafički prikaz je pripremljen korištenjem MEGA 11 programa. Isprekidana linija predstavlja izrezani dio CP, odnosno RT regije genoma.

4.2.3. Optimiranje koncentracije početnica i proba za višestruki RT-qPCR

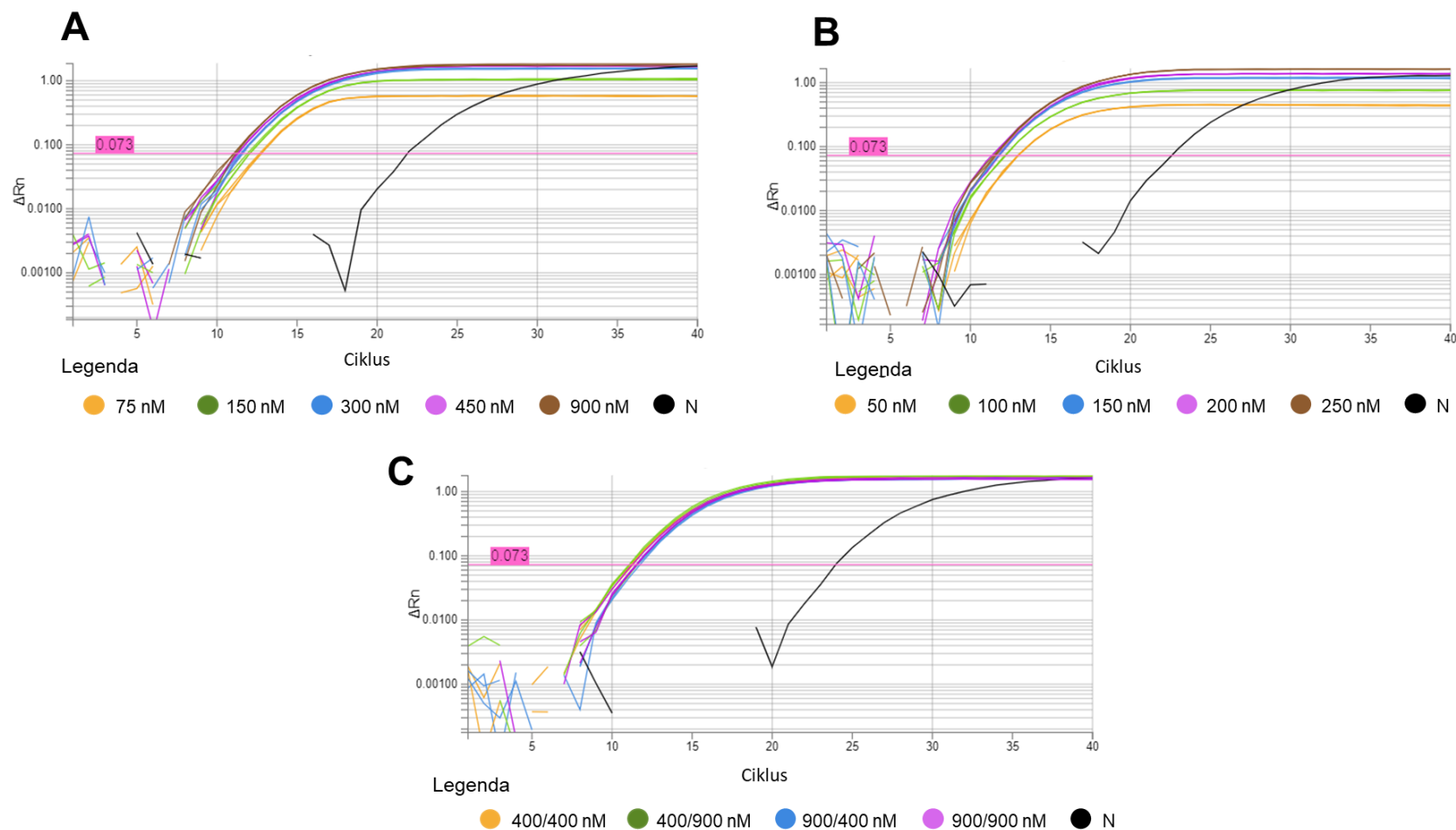
Optimiranje koncentracija početnica i proba za višestruki RT-qPCR provedeno je korištenjem peteljki listova biljke VLJ-178 sakupljenim iz zbirke virusa vinove loze SZAF. Navedena biljka bila je istovremeno zaražena s GVG i GBV-1, dok su kao negativne kontrole korišteni uzorci dobiveni od nezaraženih biljaka sorte 'Plavac mali'. Korištenjem raspona koncentracija početnica od 75 do 900 nM, pri koncentraciji proba od 250 nM u RT-qPCR reakcijskoj smjesi za GVG, dobiven je raspon u srednjim Cq vrijednostima (aritmetička sredina) od 28,61 (75 nM) do 25,40 (900 nM). Zabilježen je i raspon u srednjim amplifikacijskim vrijednostima, s obzirom na povećanje fluorescencije (ΔR_n), od 0,89 (75 nM) do 1,08 (900 nM). Raspon u srednjim Cq vrijednostima testiranjem različitih koncentracija proba (50 – 250 nM), pri odabranoj koncentraciji svake početnice od 400 nM, iznosio je od 29,58 (50 nM) do 25,99 (250 nM), a raspon u srednjim amplifikacijskim vrijednostima od 0,75 (50 nM) do 1,08 (250 nM). Testiranje različitih omjera uzvodnih i nizvodnih početnica (400 nM i 900 nM), pri odabranoj koncentraciji proba od 150 nM, nije rezultiralo razlikama u srednjim Cq ni srednjim amplifikacijskim vrijednostima (Slika 4.3).

U slučaju detekcije 18S rRNA metodom RT-qPCR, korištenjem navedenog raspona koncentracija početnica dobiven je raspon srednjih Cq vrijednosti (aritmetičke sredine) u iznosu od 12,70 (75 nM) do 11,11 (900 nM) te raspon u srednjim amplifikacijskim vrijednostima od 0,58 (75 nM) do 1,77 (900 nM). Korištenjem raspona koncentracija proba, pri odabranoj koncentraciji svake početnice od 400 nM, dobiven je raspon srednjih Cq vrijednosti u iznosu od 12,29 (50 nM) do 10,96 (250 nM) te raspon u srednjim amplifikacijskim vrijednostima od 0,44 (50 nM) do 1,63 (250 nM). Kao i u detekciji GVG, testiranje različitih omjera uzvodnih i nizvodnih početnica (400 nM i 900 nM), pri odabranoj koncentraciji proba od 150 nM, nije rezultiralo razlikama u srednjim Cq vrijednostima ni srednjim amplifikacijskim vrijednostima za 18 S rRNA (Slika 4.4).

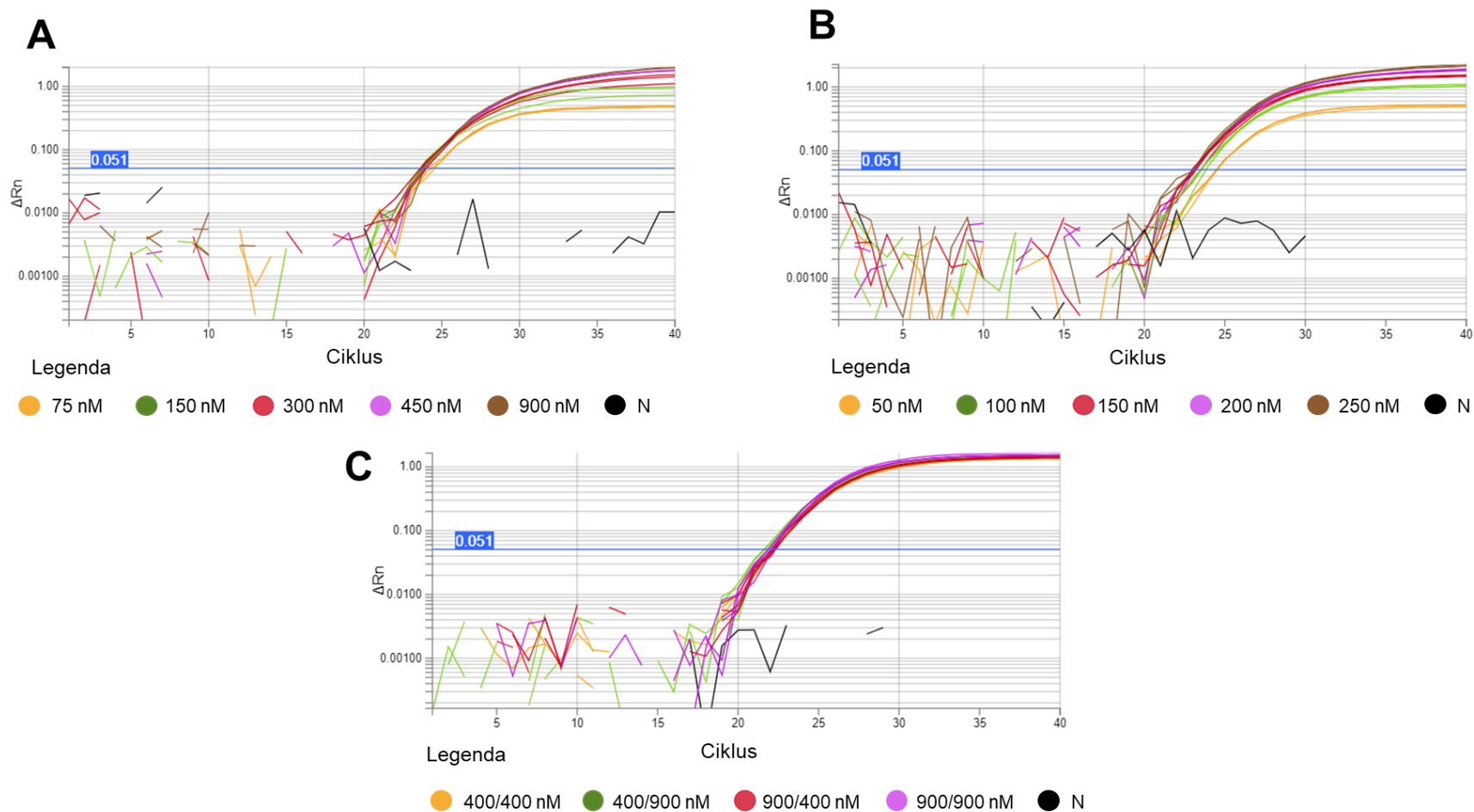
Korištenjem raspona koncentracija početnica za GBV-1 dobiven je raspon srednjih Cq vrijednosti (aritmetičke sredine) u iznosu od 24,370 (75 nM) do 23,907 (900 nM) te raspon u srednjim amplifikacijskim vrijednostima od 0,47 (75 nM) do 1,98 (900 nM). Korištenjem raspona koncentracija proba, pri odabranoj koncentraciji svake početnice od 400 nM, dobiven je raspon srednjih Cq vrijednosti u iznosu od 24,45 (50 nM) do 22,92 (250 nM) te raspon u srednjim amplifikacijskim vrijednostima od 0,52 (50 nM) do 2,19 (250 nM). Kao i u detekciji GVG i 18S rRNA, testiranje različitih omjera uzvodnih i nizvodnih početnica (400 nM i 900 nM), pri odabranoj koncentraciji proba od 150 nM, nije rezultiralo razlikama u srednjim Cq vrijednostima ni srednjim amplifikacijskim vrijednostima za GBV-1 (Slika 4.5).



Slika 4.3. Prikaz raspona amplifikacijskih krivulja u tri repeticije u odnosu na granicu detekcije (eng. *threshold*) – 0,040, u postupku optimiranja koncentracija početnica i probe u detekciji GVG metodom RT-qPCR. Detekcija uz promjenu koncentracija početnica (uzvodnih i nizvodnih) u odnosu na konstantnu koncentraciju probe od 250 nM (A), detekcija uz promjenu koncentracija probe u odnosu na konstantu koncentraciju početnica od 400 nM (uzvodnih i nizvodnih) (B) te detekcija uz promjenu koncentracije uzvodnih i nizvodnih početnica u odnosu na 150 nM koncentracije probe (C). Oznake: ΔR_n –povećanje fluorescencije; N–negativna kontrola.

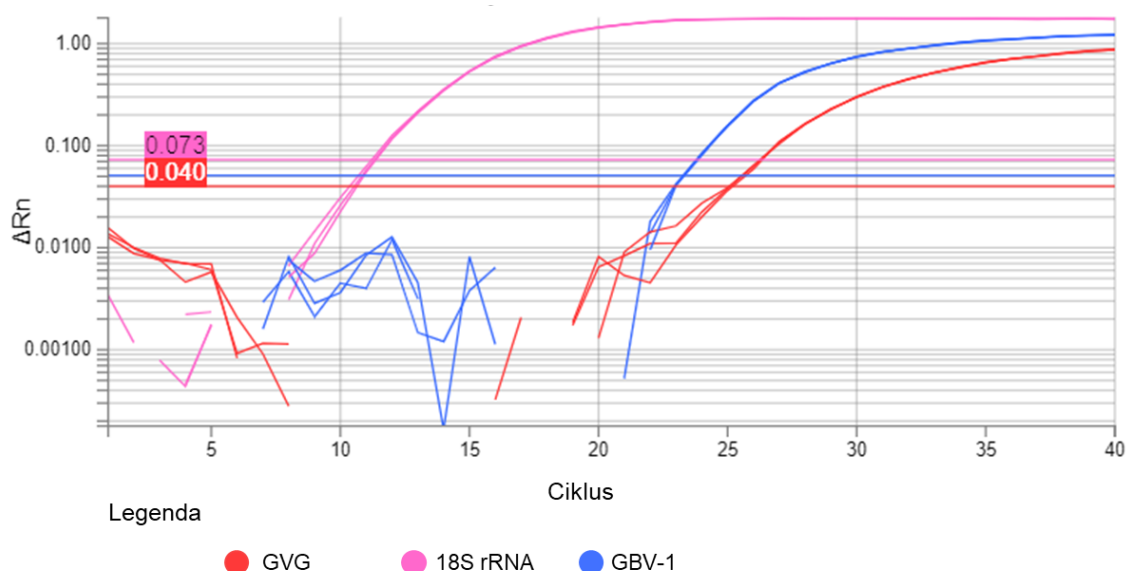


Slika 4.4. Prikaz raspona amplifikacijskih krivulja u tri repeticije u odnosu na granicu detekcije (eng. *threshold*) – 0,073, u postupku optimiranja koncentracija početnica i probe u detekciji 18S rRNA metodom RT-qPCR. Detekcija uz promjenu koncentracija početnica (uzvodnih i nizvodnih) u odnosu na konstantnu koncentraciju probe od 250 nM (A), detekcija uz promjenu koncentracija probe u odnosu na konstantnu koncentraciju početnica od 400 nM (uzvodnih i nizvodnih) (B) te detekcija uz promjenu koncentracije uzvodnih i nizvodnih početnica u odnosu na 150 nM koncentracije probe (C). Oznake: ΔR_n –povećanje fluorescencije; N–negativna kontrola.



Slika 4.5. Prikaz raspona amplifikacijskih krivulja u tri repeticije u odnosu na granicu detekcije (eng. *threshold*) – 0,051, u postupku optimiranja koncentracija početnica i probe u detekciji GBV-1 metodom RT-qPCR. Detekcija uz promjenu koncentracija početnica (uzvodnih i nizvodnih) u odnosu na konstantnu koncentraciju probe od 250 nM (A), detekcija uz promjenu koncentracija probe u odnosu na konstantnu koncentraciju početnica od 400 nM (uzvodnih i nizvodnih) (B) te detekcija uz promjenu koncentracije uzvodnih i nizvodnih početnica u odnosu na 150 nM koncentracije probe (C). Oznake: ΔRn –povećanje fluorescencije; N–negativna kontrola.

Na temelju dobivenih rezultata pojedinačnih detekcija GVG, GBV-1 i kontrolne 18S rRNA metodom RT-qPCR, odabrane su koncentracije svake početnice od 400 nM te probe od 150 nM. Tim je koncentracijama početnica i proba testirana mogućnost istovremene detekcije oba virusa, uz korištenje 18S rRNA kao kontrole uspješnosti izolacije nukleinskih kiselina, primjenom protokola za višestruki RT-qPCR, pri čemu je dobivena uspješna detekcija oba virusa prisutnih u mješovitoj infekciji (Slika 4.6).

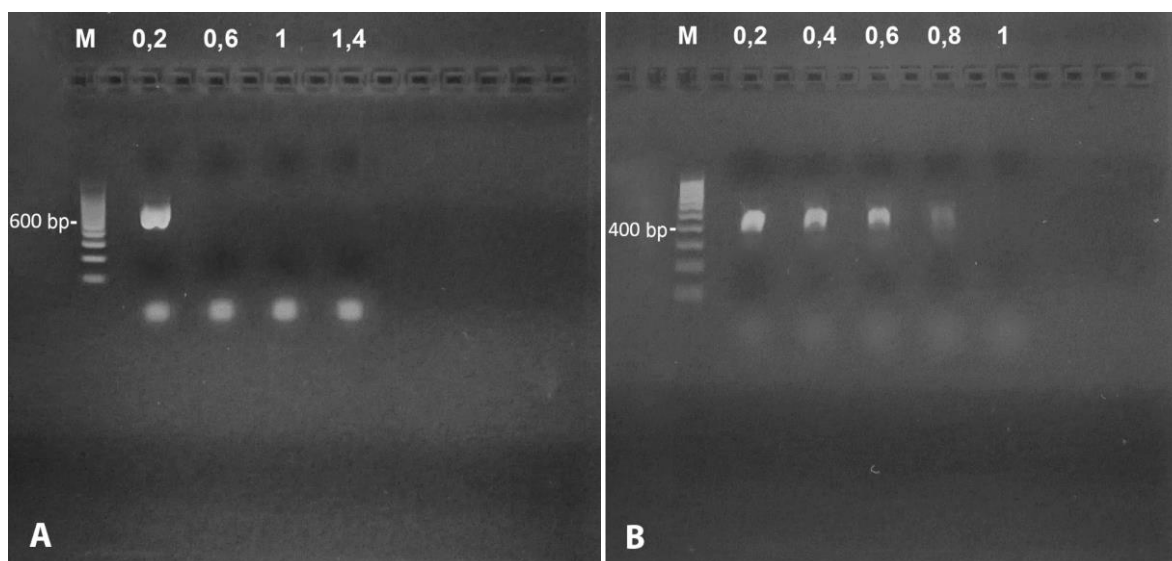


Slika 4.6. Amplifikacijske krivulje dobivene detekcijom GVG, 18S rRNA i GBV-1 primjenom optimiranog protokola za višestruki RT-PCR u stvarnom vremenu (višestruki RT-qPCR). Pokus je izvedbe u tri repeticije. Oznaka: ΔR_n – povećanje fluorescencije.

4.2.4. Određivanje optimalnog volumena uzorka izoliranog metodom GES za detekciju metodama RT-PCR i PCR

Kako bi se izbjegli eventualni problemi s inhibitorima prisutnima u uzorku TNA izoliranog metodom GES, provedeni su testovi korištenja različitih volumena uzorka u RT-PCR i PCR reakcijskim smjesama. U detekciji GVG metodom RT-PCR, korištenjem TNA u volumenu raspona od 0,2 μL do 1,4 μL , uspješna detekcija utvrđena je samo korištenjem volumena od 0,2 μL , dok pri volumenima od 0,6 μL , 1 μL i 1,4 μL nije dobiven PCR produkt (Slika 4.7 A). S druge strane, detekcijom GBV-1 metodom PCR, pripremljenom na bazi uzorka TNA koji je izoliran metodom GES i korišten u rasponu volumena od 0,2 do 1 μL , dobiveni su produkti kod svih istraživanih volumena, osim pri volumenu od 1 μL . Bez obzira na navedeno, zabilježen je pad u jačini signala dobivenih PCR produkata od varijante 0,2 do 0,8 (Slika 4.7 B).

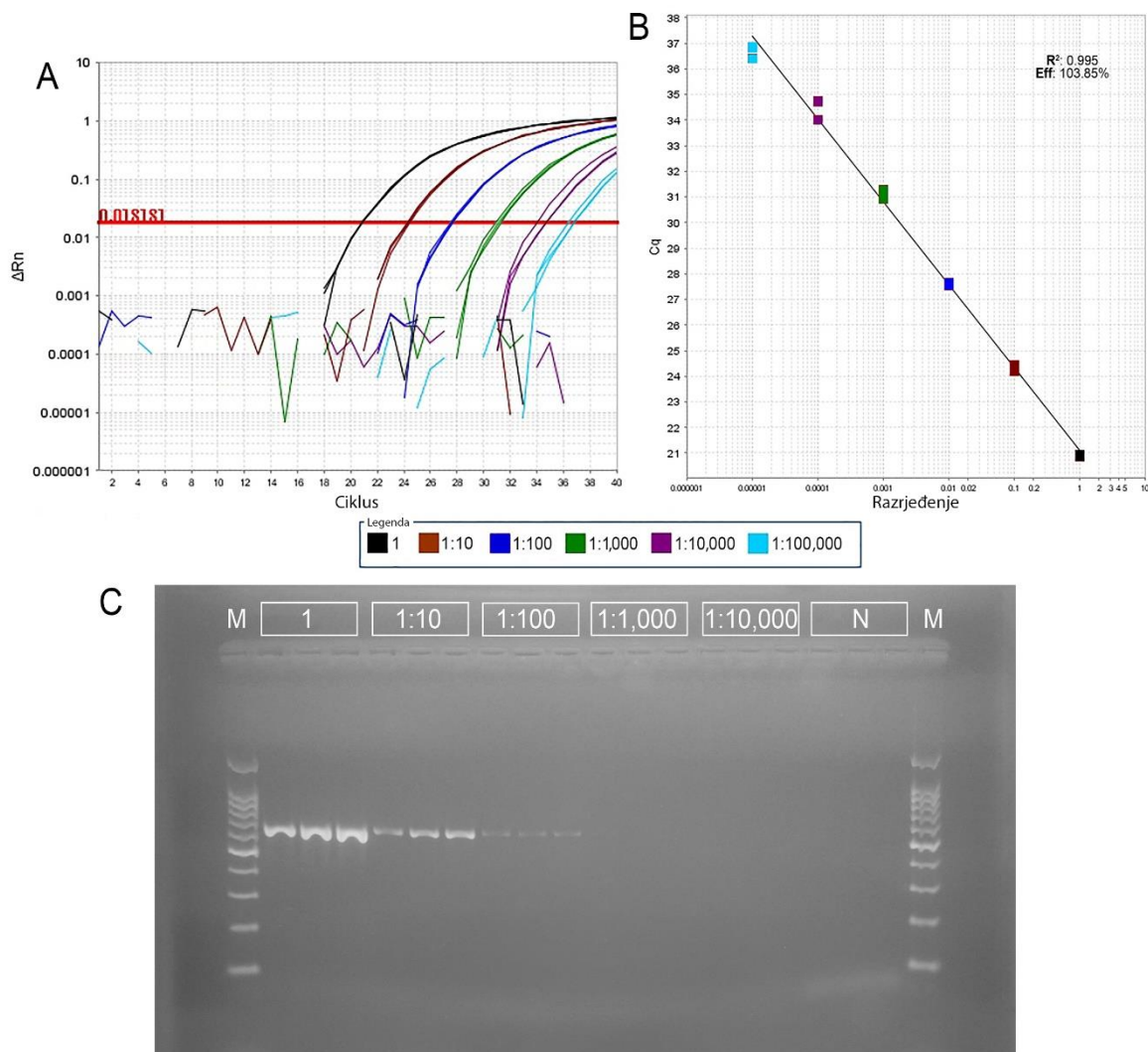
Sukladno dobivenim rezultatima, odlučeno je da će se u svim daljnjim protokolima detekcije, koji se temelje na metodama RT-PCR i PCR, koristiti 0,2 μ L izolirane TNA dobivene metodom GES.



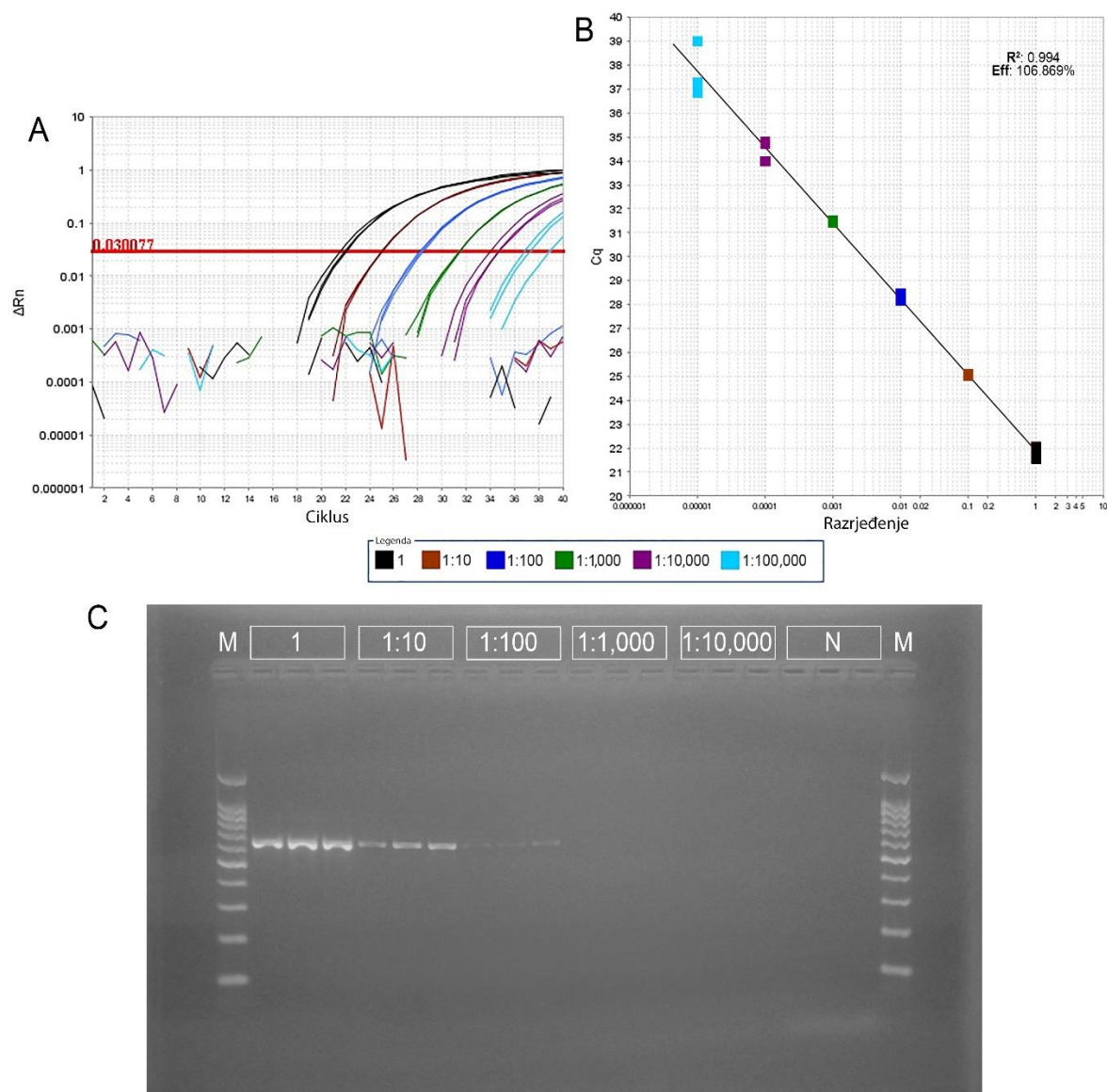
Slika 4.7. Produkti detekcije GVG metodom RT-PCR u regiji genoma kapsidnog proteina (CP; 606 baznih parova) (A) i detekcije GBV-1 metodom PCR u regiji genoma reverzne transkriptaze (RT; 419 baznih parova) (B), pri korištenju raspona volumena uzorka TNA dobivenog metodom GES. Oznake: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); 0,2 – 1,4 – volumen TNA (u μ L) u reakcijskoj smjesi od 10 μ L.

4.2.5. Osjetljivost i efikasnost razvijenih protokola detekcije s obzirom na različite metode izolacije nukleinskih kiselina

S ciljem razvoja metode koja bi omogućila dovoljno osjetljivu i pouzdanu te ekonomski prihvatljivu detekciju oba virusa u testiranju velikog broja uzoraka, provedena je usporedba osjetljivosti novorazvijenih metoda RT-PCR i RT-qPCR za GVG te PCR i RT-qPCR za GBV-1, uz korištenjem dva različita pristupa izolacije nukleinskih kiselina: Rneasy/DNeasy Plant Mini kit te metode GES. Usporedba osjetljivosti PCR protokola za detekciju GVG pokazala je da je metoda RT-qPCR 1000 puta osjetljivija od RT-PCR protokola, neovisno o metodi izolacije RNA/TNA (Rneasy Plant Mini Kit ili GES). Pri tome je RT-PCR u stvarnom vremenu mogao detektirati GVG do razrjeđenja RNA/TNA od 1:100 000, dok je RT-PCR detektirao GVG do razrjeđenja od 1:100. Bez obzira što osjetljivost protokola RT-qPCR nije ovisila o metodi izolacije RNA/TNA, različite metode izolacije RNA odrazile su se na efikasnost te metode. RT-qPCR baziran na RNA izoliranoj pomoću Rneasy Plant Mini Kit pokazao je efikasnost od 103,85 % (uz koeficijent determinacije od 0,995), dok je u slučaju izolacije TNA metodom GES efikasnost iznosila 106,87 % (uz koeficijent determinacije od 0,994) (Slike 4.8 i 4.9).



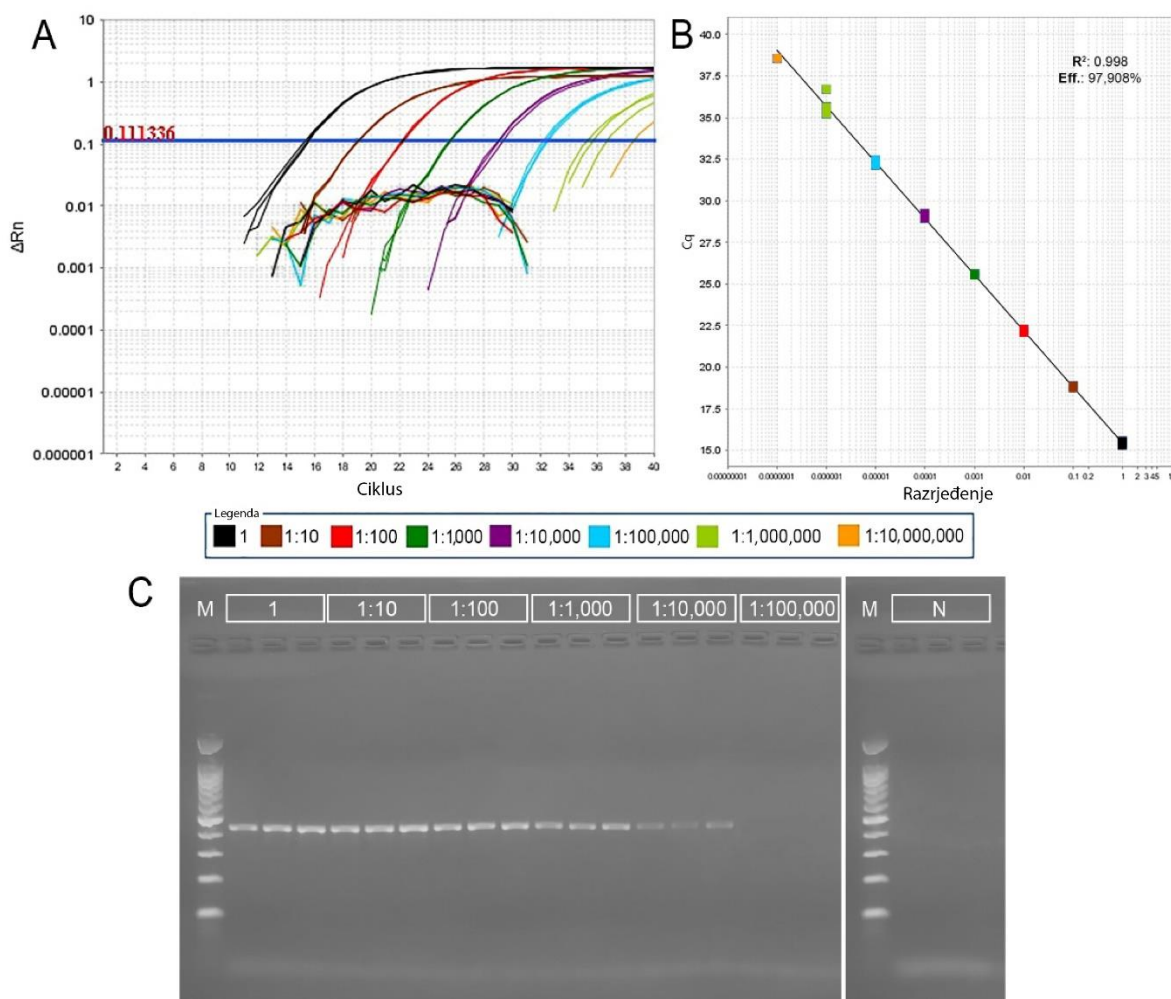
Slika 4.8. Usporedba osjetljivosti metoda RT-qPCR i RT-PCR u detekciji GVG temeljenim na RNA izoliranoj korištenjem kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen): 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:100 000–deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja RNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshold*-crvena linija, 0,018181) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔRn –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost RT-qPCR protokola: C_q –ciklus kvantifikacije; R^2 –determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (606 baznih parova) dobiveni metodom RT-PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu; M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.



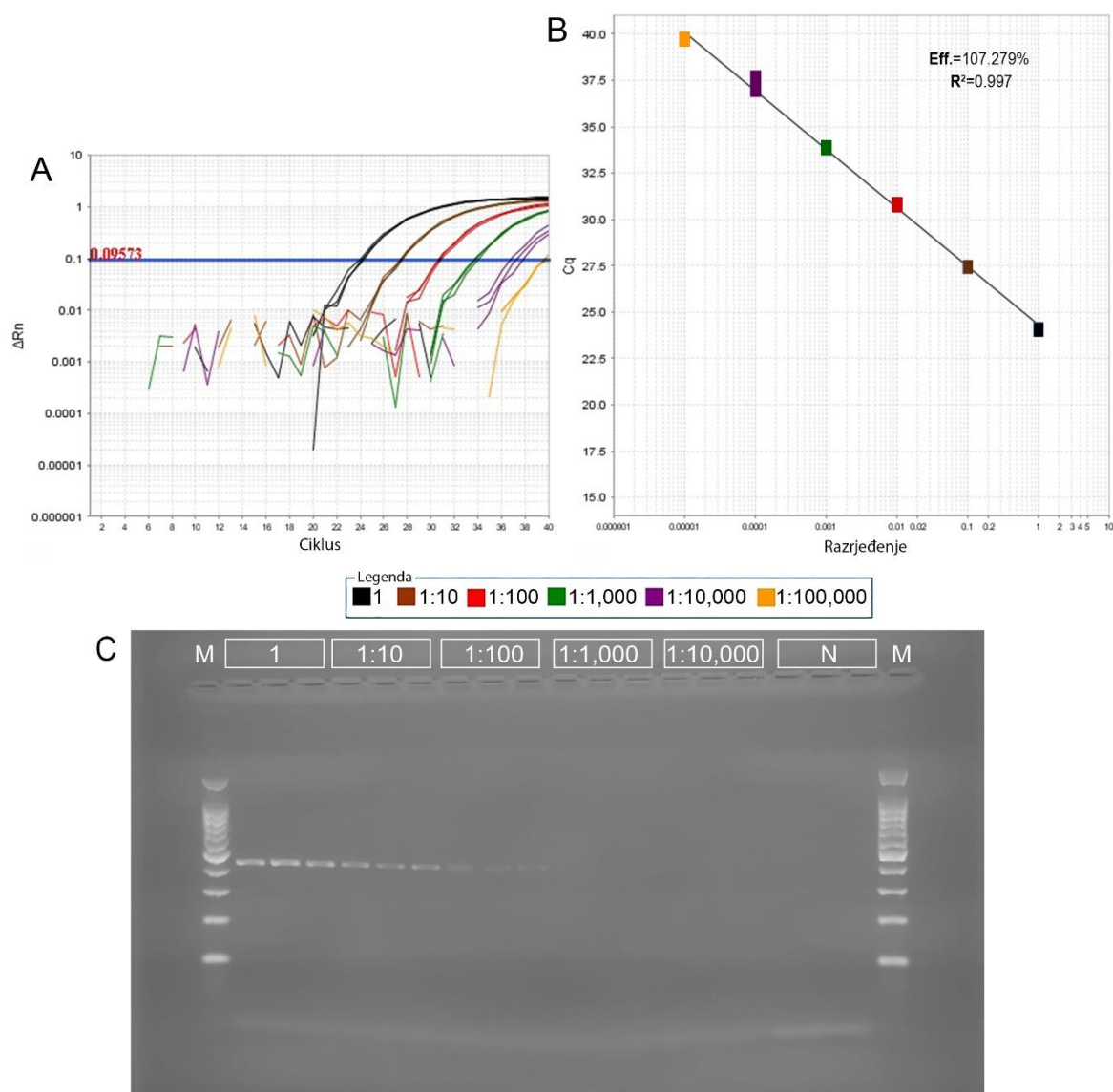
Slika 4.9. Usporedba osjetljivosti metoda RT-qPCR i RT-PCR u detekciji GVG temeljenim na TNA izoliranoj korištenjem metode GES: 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:100 000–deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja TNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshold*-crvena linija, 0,030077) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔRn –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost RT-qPCR protokola: C_q –ciklus kvantifikacije; R^2 –determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (606 baznih parova) dobiveni metodom RT-PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.

Kao i u slučaju detekcije GVG, provedbom osjetljivosti protokola detekcije GBV-1 dobivena je 1000 puta veća osjetljivost metode RT-qPCR za obje metode izolacije DNA/TNA (DNeasy Plant Mini Kit i GES), naspram metode PCR. Međutim, obje su metode u detekciji GBV-1 pokazale 100 puta veću osjetljivost kada je korištena DNA izolirana s kompletno DNeasy Plant Mini Kit, u odnosu na TNA izoliranu metodom GES. Usporedbom

efikasnosti PCR protokola u stvarnom vremenu u odnosu na metodu izolacije nukleinskih kiselina, dobivena je bolja efikasnost protokola s DNA izoliranom pomoću kompleta DNeasy Plant Mini Kit u iznosu od 97,908 % (uz koeficijent determinacije vrijednosti 0,998), naspram 107,279 % efikasnosti (uz koeficijent determinacije vrijednosti 0,997) dobivene protokolom s TNA izoliranom metodom GES (Slika 4.10 i 4.11).



Slika 4.10. Usporedba osjetljivosti metoda qPCR i PCR u detekciji GBV-1 temeljenim na DNA izoliranoj korištenjem kompleta DNeasy Plant Mini Kit: 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:10 000 000–deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja DNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshold*-plava linija, 0,111336) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔRn –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost qPCR protokola: C_q –ciklus kvantifikacije; R²–determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (419 baznih parova) dobiveni metodom konvencionalnog PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.

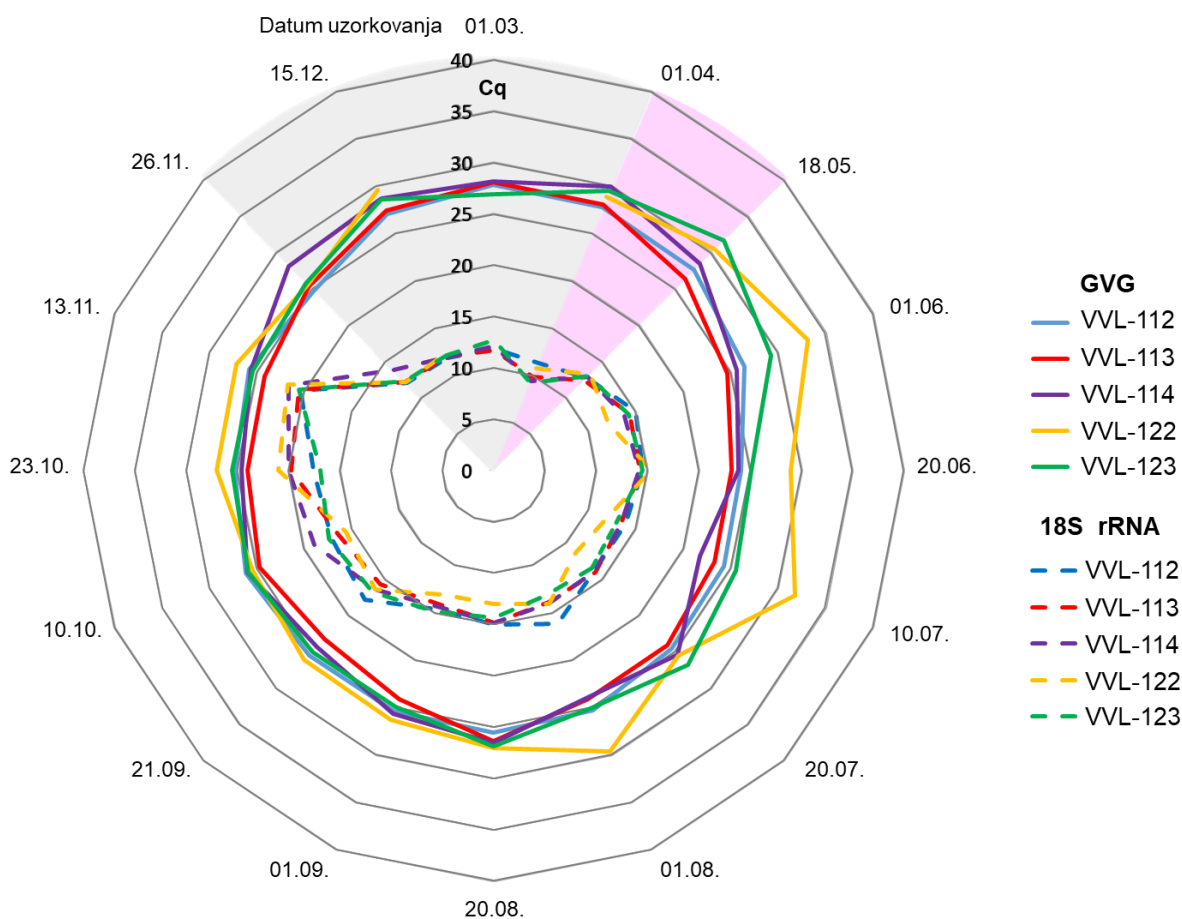


Slika 4.11. Usporedba osjetljivosti metoda qPCR i PCR u detekciji GBV-1 temeljenim na TNA izoliranoj korištenjem metode GES: 1–nerazrijeđeni ekstrakt; 1:10 – 1:100 000–deseterostruko serijsko razrjeđenje u tri repeticije. (A) Prikaz serije razrjeđenja TNA pomoću krivulja amplifikacije dobivenih provedbom metode RT-qPCR; linije ispod granice detekcije (*threshold*-plava linija, 0,09573) prikazuju negativne kontrole za svako razrjeđenje. ΔRn –povećanje fluorescencije. (B) Efikasnost qPCR protokola: Cq –ciklus kvantifikacije; R^2 –determinacijski koeficijent; Eff.–efikasnost. (C) PCR produkti (419 baznih parova) dobiveni metodom PCR na 1,5 %-tnom TBE agaroznom gelu: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus Ladder); N–negativna kontrola za nerazrijeđeni uzorak.

S obzirom na rezultate, metoda RT-PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR), uz korištenje TNA izoliranih metodom GES, pokazala se kao dovoljno pouzdana i osjetljiva za detekciju GVG i GBV-1 u velikom broju uzoraka. Pri tome se detekcija oba virusa pokazala mogućom pri razrjeđenju TNA i do 1:100 000. Također, dobivene su zadovoljavajuće efikasnosti navedenog protokola detekcije za oba virusa, koje su bile u preporučenim granicama (90 – 110 %).

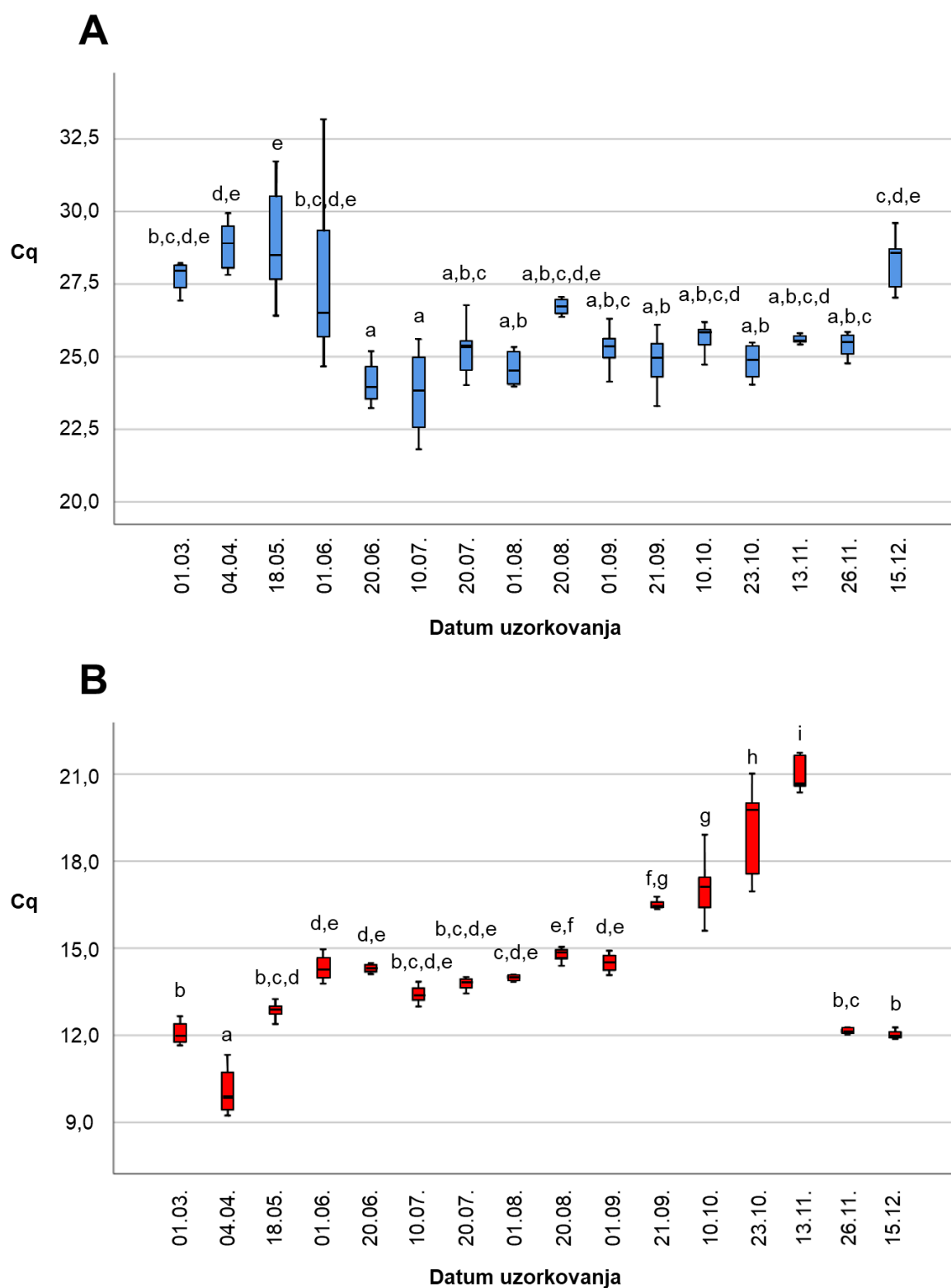
4.3. Sezonska dinamika virusa u zaraženoj vinovoj lozi

Metodom višestrukog RT-qPCR baziranim na TNA izoliranima metodom GES, GVG i 18S rRNA uspješno su detektirani u svih 16 termina uzorkovanja biljnog materijala od pet biljaka sorte 'Vlaška' (VVL-112, VVL-113, VVL-114, VVL-122, VVL-123), tijekom vegetacijske sezone 2019. godine. Izuzetak je bila biljka VVL-122 čije rozgve sakupljene 1. ožujka (zimsko mirovanje) nisu testirane zbog degradacije uslijed neadekvatnog skladištenja. Najmanja izmjerena Cq vrijednost za GVG iznosila je 21,81, a dobivena je testiranjem peteljki lista biljke VVL-114 sakupljenih 10. srpnja, dok je najveća Cq vrijednost iznosila 33,18, a dobivena je testiranjem peteljki lista biljke VVL-122 sakupljenih 1. lipnja. Za 18S rRNA najmanja Cq vrijednost od 9,43 izmjerena je uzorkovanjem 4. travnja u uzorcima mladica biljke VVL-114, dok je najveća Cq vrijednost od 21,73 zabilježena iz uzoraka peteljki lista biljke VVL-122 sakupljenih 13. studenog (Grafikon 4.1, Prilog 4).



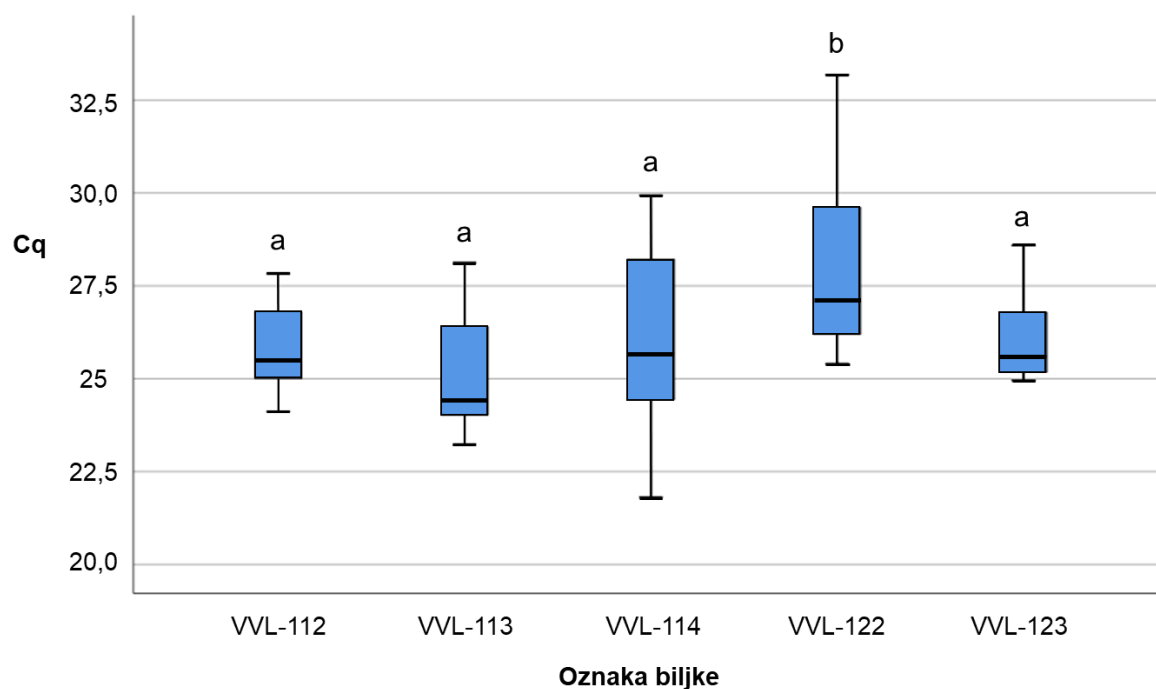
Grafikon 4.1. Sezonska dinamika GVG (puna linija) i 18S rRNA (isprekidana linija) iskazana kroz vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet zaraženih biljaka sorte 'Vlaška' (VVL) tijekom 16 datuma uzorkovanja u 2019. godini. Različiti datumi predstavljaju 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala korištenog za izolaciju TNA: mladice–ružičasto područje, peteljke bazalnih listova–neobojeno područje, rozgva–sivo područje.

Provedbom statističke metode ANOVA i Tukey testom na varijantama različitih termina uzorkovanja biljnog materijala dokazano je da se najveće srednje Cq vrijednosti (aritmetičke sredine) za GVG od 28,84 i 28,97, dobivene u terminima uzorkovanja 4. travnja (mladice) i 18. svibnja (peteljke listova), statistički razlikuju od termina uzorkovanja između 20. lipnja i 1. kolovoza te od varijanata 1. rujna (25,28), 21. rujna (24,83), 23. listopada (24,84) i 26. studenoga (25,41). S druge strane, nisu uočene statistički značajne razlike u uzorkovanju između 20. lipnja (24,09), kada je zabilježena najmanja srednja Cq vrijednost za GVG te 26. studenoga. Također, nisu zabilježene statistički značajne razlike za GVG ni za 18S rRNA između srednjih Cq vrijednosti u varijantama tijekom mirovanja vegetacije (26. studenoga, 15. prosinca i 1. ožujka). U suprotnosti s GVG, 4. travnja utvrđena je signifikantno najmanja srednja Cq vrijednost za 18S rRNA (10,11) u usporedbi sa svim ostalim terminima uzorkovanja. S druge strane, najveća zabilježena srednja Cq vrijednost za 18S rRNA iz peteljki listova varijante 13. studenoga (20,98) statistički se značajno razlikovala od svih ostalih 15 termina uzorkovanja/varijanata. Također, druga se najveća srednja Cq vrijednost signifikantno razlikovala od svih drugih termina, a dobivena je testiranjem 23. listopada, kao i treća najveća srednja Cq vrijednost za 18S rRNA koja je također zabilježena termin ranije, odnosno 10. listopada. Slično kao i kod GVG, srednje Cq vrijednosti za 18S rRNA dobivene testiranjem biljnog materijala uzorkovanog između 1. lipnja i 1. rujna nisu se značajno razlikovale (Grafikon 4.2).



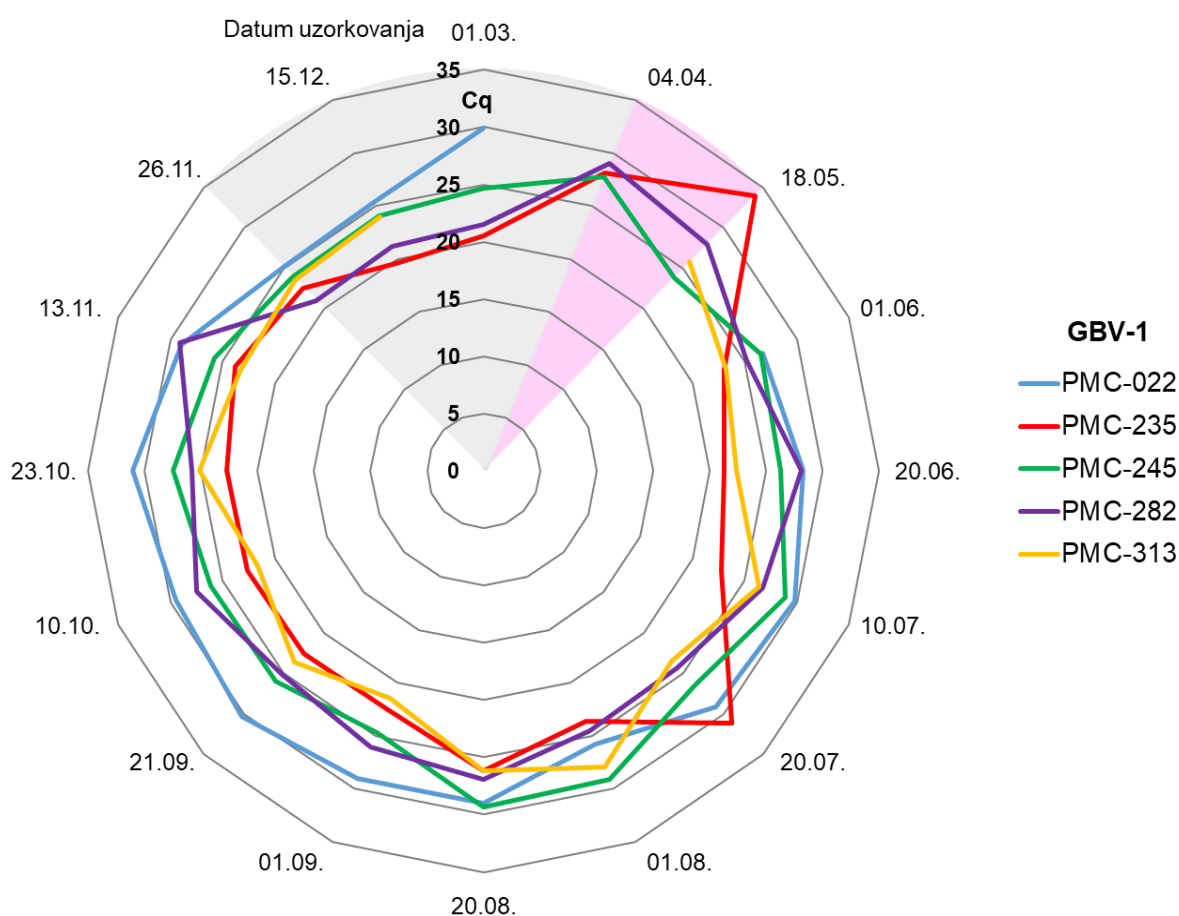
Grafikon 4.2. Box-plot dijagrami vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) za GVG (A) i 18S rRNA (B) dobivene metodom RT-qPCR u 16 različitih datuma uzorkovanja biljaka sorte 'Vlaška' (VVL) u 2019. godini. Prikazane su najmanje i najveće Cq vrijednosti (okomite linije), prva i treća kvartila Cq vrijednosti (pravokutnici) te njihove medijane (vodoravne linije). Statistički signifikantne srednje (aritmetička sredina) Cq vrijednosti za GVG i 18S rRNA prema varijantama datuma uzorkovanja označene su različitim slovima (a, b, c, d, e, f, g, h, i), a utvrđene su analizom varijance (ANOVA) i Tukey testom na razini $p < 0,05$.

Analiza varijance (ANOVA) i Tukey test, provedeni na srednjim Cq vrijednostima aritmetičkih sredina za GVG prema varijantama uzorkovanih biljaka sorte 'Vlaška' (VVL), pokazali su da je srednja Cq vrijednost za biljku VVL-122 od 28,19, dobivena kroz cijelu sezonu (16 termina uzorkovanja), signifikantno veća od srednjih Cq vrijednosti ostalih biljaka koje su se kretale u rasponu od 25,09 (VVL-113) do 26,06 (VVL-114) (Grafikon 4.3). Suprotno tome, signifikantna razlika nije zabilježena između srednjih Cq vrijednosti za 18S rRNA, koje su se kretale u rasponu od 13,16 (VVL-122) do 14,72 (VVL-112).



Grafikon 4.3. Box-plot dijagram vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) za GVG dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet biljaka sorte 'Vlaška' (VVL) u 16 različitih datuma uzorkovanja u 2019. godini. Prikazane su najmanje i najveće Cq vrijednosti (okomite linije), prva i treća kvartila Cq vrijednosti (pravokutnici) te njihove medijane (vodoravne linije). Statistički signifikantne srednje (aritmetička sredina) Cq vrijednosti za GVG prema varijantama testiranih biljaka označene su različitim slovima (a, b), a utvrđene su analizom varijance (ANOVA) i Tukey testom na razini $p < 0,05$.

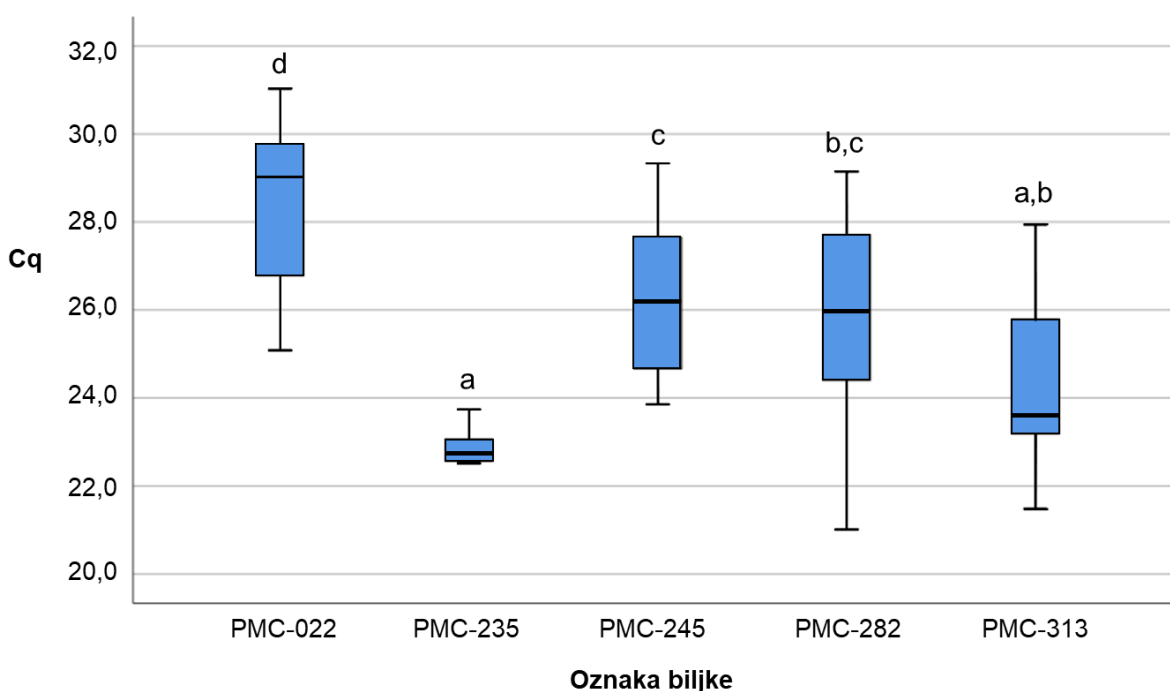
U slučaju detekcije GBV-1 istom metodom tijekom vegetacijske sezone 2019. godine u biljkama sorte 'Plavac mali' (PMC-022, PMC-235, PMC-245, PMC-282, PMC-313), navedeni virus uspješno je detektiran u svih 16 termina uzorkovanja u tri biljke: PMC-235, PMC-245 i PMC-282. Virus nije detektiran u biljci PMC-022 u uzorkovanju 4. travnja (uzorak mladica) i 18. svibnja (peteljke listova) te u biljci PMC-313 u uzorkovanju 4. travnja (mladice). Uzorci biljke PMC-313 nisu testirani nakon uzorkovanja 1. ožujka (zimsko mirovanje), zbog propadanja sakupljenih rozgvi uslijed neadekvatnog skladištenja. Najveća Cq vrijednost od 33,99 izmjerena je iz peteljki listova biljke PMC-235 u terminu uzorkovanja 18. svibnja, dok je najmanja srednja Cq vrijednost iznosila 19,70, a izmjerena je iz rozgvi biljke PMC-235 sakupljenih 15. prosinca (Grafikon 4.4, Prilog 5).



Grafikon 4.4. Sezonska dinamika GBV-1 iskazana kroz vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet zaraženih biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC) tijekom 16 datuma uzorkovanja u 2019. godini. Različiti datumi predstavljaju 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala za izolaciju TNA: mladice–ružičasto područje, peteljke bazalnih listova–neobojeno područje, rozgva–sivo područje.

Statističkom analizom ustanovljeno je da se srednje Cq vrijednosti za GBV-1, dobivene u varijantama 16 termina uzorkovanja biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC), ne razlikuju značajno, pri čemu je najmanja srednja vrijednosti iznosila 22,88 (dobivena testiranjem uzoraka rozgvi sakupljenih 15. prosinca), a najveća 28,31 (4. travnja – mladice).

Statističkom analizom na srednjim Cq vrijednostima prema varijantama uzorkovanih biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC) tijekom 16 termina uzorkovanja 2019. godine, ustanovljeno je da se najmanja srednja Cq vrijednost dobivena za varijantu PMC-235 u iznosu od 22,91 signifikantno razlikuje od varijanti PMC-022 (28,42), PMC-245 (26,31) i PMC-282 (25,63), dok se statistički ne razlikuje od varijante PMC-313 (24,25). Najveća srednja Cq vrijednost utvrđena za varijantu PMC-022 signifikantno se razlikovala od srednjih Cq vrijednosti svih ostalih varijanti. Grafikon 4.4 prikazuje rezultate statističke analize primijenjene na srednjim Cq vrijednostima za GBV-1 prema varijantama uzorkovanih biljaka sorte Plavac mali (PMC).



Grafikon 4.5. Box-plot dijagram vrijednosti ciklusa kvantifikacije (Cq) za GBV-1 dobivene metodom RT-qPCR u testiranju pet biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC) u 16 različitih datuma uzorkovanja u 2019. godini. Prikazane su najmanje i najveće Cq vrijednosti (okomite linije), prva i treća kvartila Cq vrijednosti (pravokutnici) te njihove medijane (vodoravne linije). Statistički signifikantne srednje (aritmetička sredina) Cq vrijednosti za GBV-1 prema varijantama testiranih biljaka označene su različitim slovima (a, b, c, d), a utvrđene su analizom varijance (ANOVA) i Tukey testom na razini $p < 0,05$.

4.4. Rasprostranjenost u Hrvatskoj

Testiranjem 878 uzoraka vinove loze podrijetlom iz četiri kolekcijska vinograda na području grada Zagreba (zbirka virusa vinove loze, nasad vinove loze i loznih podloga, Nacionalna kolekcija i kolekcija klonova SZAF), 30 (3,42 %) uzoraka je bilo inficirano s GVG te 25 (2,85 %) uzoraka s GBV-1. Virus su detektirani u dvije kolekcije, pri čemu je u zbirci virusa vinove loze bilo zaraženo 11,22 % (22/196) trsova s GVG te 5,10 % (10/196) s GBV-1. U Nacionalnoj kolekciji autohtonih sorata potvrđeno je 7,08 % (8/113) trsova zaraženih s GVG te 13,27 % (15/113) zaraženih s GBV-1. Testiranjem biljaka u kolekcijskom nasadu u Splitu utvrđeno je 4,76 % (5/105) biljaka zaraženih s GVG i 15,24 % (16/105) biljaka zaraženih s GBV-1. Zaključno, ukupna pojavnost u kolekcijskim nasadima u Hrvatskoj (kontinent i priobalje) iznosila je 3,56 % (35/983) za GVG te 4,17 % (41/983) za GBV-1.

Testiranjem 257 uzoraka iz komercijalnih vinograda u regiji Središnja bregovita Hrvatska nije potvrđena zaraza s istraživanim virusima, stoga su postoci zaraženosti u toj regiji, uzimajući u obzir u tom djelu smještenu zbirku virusa vinove loze SZAF te Nacionalnu kolekciju autohtonih sorata vinove loze SZAF iznosili 2,64 % (30/1135) za GVG i 2,20 % (25/1135) za GBV-1. S obzirom da virusi nisu potvrđeni ni u 184 uzoraka iz 16 komercijalnih vinograda u regiji Slavonija i hrvatsko Podunavlje, ti se vinogradi smatraju slobodnima od GVG i GBV-1. Uzimajući u obzir kolekcijske nasade u Zagrebu u kojima su virusi potvrđeni, ukupna zaraženost u kontinentalnoj Hrvatskoj iznosila je 2,27 % (30/1319) za GVG i 1,90 % (25/1319) za GBV-1.

U suprotnosti s komercijalnim vinogradima kontinentalnog dijela, GVG je u priobalnoj Hrvatskoj utvrđen u komercijalnim vinogradima na 22 lokacije (od 76 uključenih u istraživanje – 28,95 %), pri čemu je 14,50 % (421/2903) uzoraka bilo pozitivno. S druge strane, GBV-1 je utvrđen u ukupno 30 (39,47 %) komercijalnih vinograda/lokacija, gdje je ukupno potvrđeno 18,53 % (538/2903) pozitivnih trsova. U regiji Hrvatska Istra i Kvarner je testirano 567 uzoraka s 12 lokacija, pri čemu su oba virusa utvrđena samo na po jednoj lokaciji (8,33 %) i to GVG s pojavnošću od 4,1 % na lokaciji Pod Moću (otok Krk) te GBV-1 od 1,9 % na lokaciji Kršete (Poreč). Ukupna stopa infekcije za tu regiju iznosila je 0,88 % (5/567) za GVG i 0,35 % (2/567) za GBV-1. U regiji Dalmacija je iz 65 komercijalnih vinograda testirano 2336 uzoraka, od kojih je 17,81 % (416/2336) bilo pozitivno na GVG i 22,95 % (536/2336) na GBV-1. Uzimajući u obzir i pozitivne uzorke iz Kolekcijskog nasada u Splitu, ukupni postotak zaraženosti s GVG u regiji Dalmacija je iznosio 17,25 % (421/2441), a s GBV-1 22,61 % (552/2441) te je ukupna stopa infekcije za priobalnu Hrvatsku iznosila 14,16 % (426/3008) za GVG i 18,42 % (554/3008) za GBV-1. U tablicama 4.2 i 4.3 nalazi se pregled rezultata istraživanja rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u Hrvatskoj.

Tablica 4.2 Rezultati istraživanja rasprostranjenosti GVG u Hrvatskoj prema lokacijama uzorkovanja, tipu nasada (komercijalni vinograd–V, kolekcijski nasad–K) i sortama.

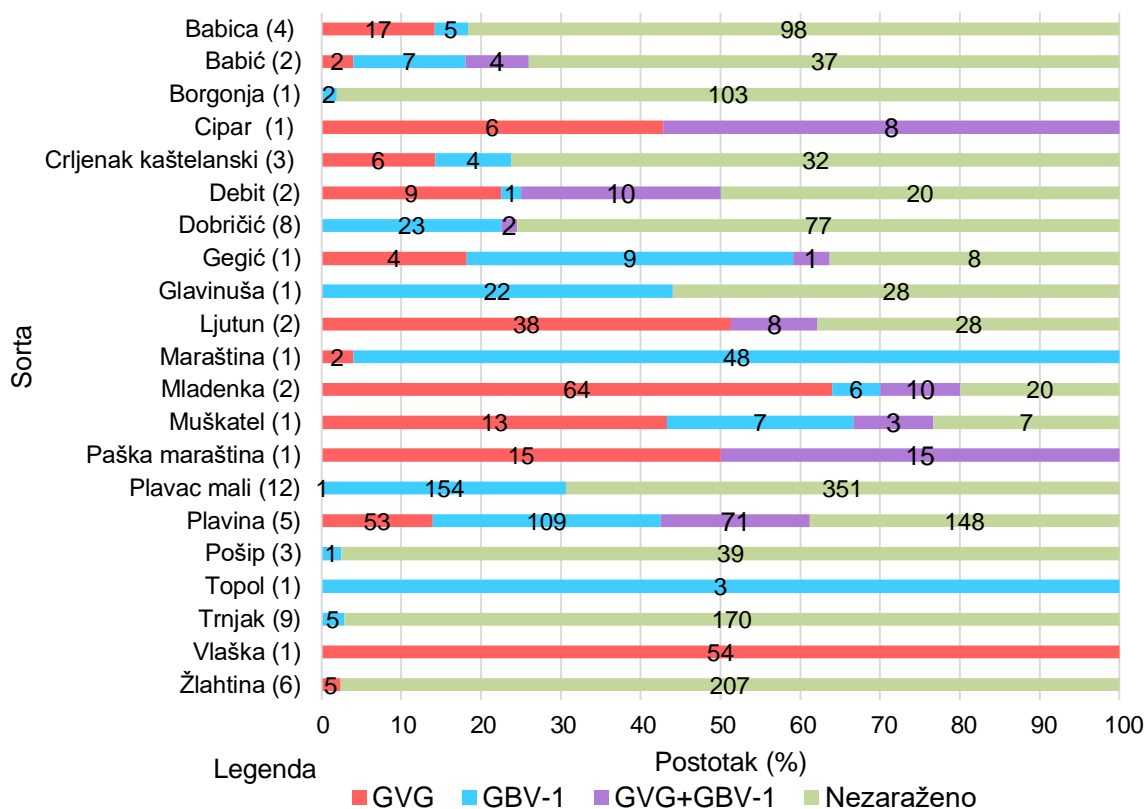
Regija	Županija	Mjesto	Lokacija	Broj GVG pozitivnih/broj testiranih biljaka (%)	Inficirane sorte (broj biljaka)	
Središnja bregovita Hrvatska	Grad Zagreb	Zagreb	Zbirka virusa vinove loze SZAF (K)	22/196 (11,22 %)	Vlaška (16), Mladenka (3), Ljutun (3)	
			Nacionalna kolekcija autohtonih sorata vinove loze SZAF (K)	8/113 (7,08 %)	Muškatel, Cipar, Silbijanac, Topol, Petovka, Gegić, Bljuzgavac, Kozjak	
Hrvatska Istra i Kvarner	Primorsko-goranska	otok Krk	Pod Moču (V)	5/123 (4,07 %)	Žlahtina	
Dalmacija	Zadarska	otok Rava	Mala Rava (V)	64/194 (32,99 %)	Plavina	
			Vela Rava (V)	48/110 (43,64 %)		
			Pag 2 (V)	16/30 (53,33 %)		
		otok Pag	Pag 3 (V)	35/58 (60,34 %)	Gegić (5), Cipar (14), Debit (16)	
			Pag 4 (V)	30/30 (100 %)	Paška maraština	
			Pag 5 (V)	14/41 (34,15 %)	Plavina (11), Debit (3)	
	Nin		Kraljičina plaža (V)	2/50 (4 %)	Maraština	
	Zemunik Donji	Zemunik Donji (V)	1/50 (2 %)	Plavina		
	Šibensko-kninska	Primošten	Vezac (V)	5/10 (50 %)	Babić	
			Bucavac (V)	1/30 (3,33 %)		
	Dalmacija	Kaštela	Kaštel Sućurac	(V)	24/50 (48 %)	Mladenka
				Radun (V)	46/54 (85,19 %)	Ljutun
				Furnaže (V)	50/50 (100 %)	Mladenka
				Marceline (V)	54/54 (100 %)	Vlaška
				Stomorija (V)	14/50 (28 %)	Babica
Bristi 2 (V)				2/25 (8 %)	Babica	
Kaštel Stari 1 (V)				1/40 (2,5 %)	Babica	
Splitsko-dalmatinska		Split	Kaštel Stari 2 (V)	6/30 (20 %)	Crljenak kaštelanski	
			Kolekcijski nasad autohtonih i introduciranih sorata vinove loze (K)	5/105 (4,76 %)	Cipar, Silbijanac, Gegić, Vlaška, Mladenka	
			otok Šolta	Srednje selo 2 (V)	1/20 (5 %)	Dobričić
Gornje selo 2 (V)	1/10 (10 %)					
Dobrovačko-neretvanska	Pelješac	Bioka (V)	1/5 (20 %)	Plavac mali		

Tablica 4.3. Rezultati istraživanja rasprostranjenosti GBV-1 u Hrvatskoj prema lokacijama uzorkovanja, tipu nasada (komercijalni vinograd–V, kolekcijski nasad–K) i sortama.

Regija	Županija	Mjesto	Lokacija	Broj GBV-1 pozitivnih/broj testiranih biljaka (%)	Inficirane sorte (broj biljaka)		
Središnja bregovita Hrvatska	grad Zagreb	Zagreb	Zbirka virusa vinove loze SZAF (K)	10/196 (5,10 %)	Ljutun (2), Plavac mali (5), Vugava (2), Dobričić (1)		
			Nacionalna kolekcija autohtonih sorata vinove loze SZAF (K)	15/113 (13,27 %)	Pavčić, Gustopupica, Galac, Stara brajda, Ninska crvena, Šarica trišnjeвица, Muškotel, Krstičevića, Mekuja, Topol, Gegić, Oskorušica, Tanetova loza, Bljuzgavac		
Hrvatska Istra i Kvarner	Istarska	Poreč	Kršete (V)	2/105 (1,90 %)	Borgonja		
Dalmacija	Zadarska	otok Rava	Mala Rava (V)	66/194 (34,02 %)	Plavina		
			Vela Rava (V)	85/110 (77,27 %)			
		otok Pag	Pag 2 (V)	10/30 (33,33 %)	Muškatel		
			Pag 3 (V)	32/58 (55,17 %)	Gegić (10), Topol (3), Cipar (8), Debit (11)		
			Pag 4 (V) (V)	15/30 (50 %)	Paška maraština		
			Nin	Kraljičina plaža (V)	48/50 (96 %)	Maraština	
	Šibensko-kninska	Primošten	Zemunik Donji	Zemunik Donji (V)	29/50 (58 %)	Plavina	
			Vezac (V)	4/10 (40 %)			
	Split	Kaštela	Bucavac (V)	7/30 (23,33 %)	Babić		
			Kaštel Sućurac (V)	6/50 (12 %)	Mladenka		
			Radun	8/54 (14,81 %)	Ljutun		
			Kaštel Lukšić (V)	22/50 (44 %)	Glavinuša		
			Furnaže (V)	10/50 (20 %)	Mladenka		
			Stomorija (V)	2/50 (4 %)	Babica		
			Kaštel stari 1 (V)	3/40 (7,5 %)	Babica		
			Kaštel stari 2 (V)	4/30 (13,33 %)	Crljenak kaštelanski Gnjatonja, Plavina, Plavac mali, Bak, Gegić, Maraština, Crna brajda, Gustopupica ninska, Dobričić, Drnekuša vela, Tanetova loza, Pavčić, Terin, Krstičevića, Šarica trišnjeвица, Pribidrag		
			Split	Kolekcijski nasad autohtonih i introduciranih sorata (K)		16/105 (15,24 %)	
	Splitsko-dalmatinska	Proložac	Vučija Draga (V)	5/135 (3,70 %)	Trnjak		
			Velo vijelo (V)	12/50 (24 %)			
otok Hvar		Ivan Dolac 1 (V)	48/50 (96 %)	Plavac mali			
		Ivan Dolac 2 (V)	34/50 (68 %)				
otok Vis		Crkvenik (V)	24/50 (48 %)				
		Petričevo (V)	32/231 (13,85 %)	Plavac mali			
otok Šolta		Srednje Selo 1 (V)	9/60 (15 %)	Pošip (1), Dobričić (8)			
		Srednje Selo 2 (V)	5/20 (25 %)	Dobričić			
		Srednje Selo 3 (V)	5/50 (10 %)	Plavac mali (2), Dobričić (3)			
		Gornje Selo 2 (V)	2/10 (20 %)				
		Gornje Selo 3 (V)	2/10 (20 %)	Dobričić			
		Gornje Selo 4 (V)	5/10 (50 %)				
Dubrovačko-neretvanska	Pelješac	Bioka (V)	1/5 (20 %)				
		Dingač (V)	1/2 (50 %)	Plavac mali			

Uzimajući u obzir testirane uzorke iz sve četiri vinogradarske regije u kontinentalnoj i priobalnoj Hrvatskoj, uključujući komercijalne vinograde i kolekcijske nasade, ukupna stopa infekcije za GVG je iznosila 10,54 % (456/4327), a za GBV-1 13,38 % (579/4327). Pritom su istraživani virusi potvrđeni samo u autohtonim hrvatskim sortama vinove loze i to u stopi infekcije od 12,76 % (456/3575), odnosno 16,20 % (579/3575) od svih testiranih biljaka autohtonih sorata. Prema tome, virusi nisu utvrđeni ni u jednom uzorku introduciranih vrsta/sorata (752), koji su uključivali 67 uzoraka loznih podloga 110 Richter (14), LN 33 (13), Kober 5BB (15), *V. riparia* (12) i *V. rupestris* (13) i 24 uzoraka vinove loze sorata 'Chardonnay' (7) i 'Pinot crni' (17) iz Kolekcijskog nasada vinove loze i loznih podloga SZAF te 11 uzoraka introduciranih sorata iz Kolekcijskog nasada autohtonih i introduciranih sorata u Splitu. Preostalih 650 uzoraka introduciranih sorata odnosilo se na one iz komercijalnih vinograda, od sorata: 'Cabernet Sauvignon' (90), 'Chardonnay' (80), 'Centennial Seedless' (8), 'Graševina' (nerazjašnjeno podrijetlo, 184), 'Merlot' (91), 'Muškat' (25), 'Pinot crni' (10), 'Pinot sivi' (10), 'Portugizac' (15), 'Rajnski rizling' (54), 'Rizvanac' (10), 'Traminac' (15) i 'Vranac' (3) te 55 uzorka nepoznatih introduciranih sorata. Pored 97 autohtonih hrvatskih sorata iz kolekcijskih vinograda u Hrvatskoj u kojima virusi nisu detektirani, u ukupno 6 autohtonih sorata iz komercijalnih vinograda pojavnost virusa nije zabilježena, redom: 'Graševina' (184), 'Kujundžuša' (248), 'Malvasija dubrovačka' (54), 'Malvazija istarska' (100), 'Škret' (30) i 'Teran' (50).

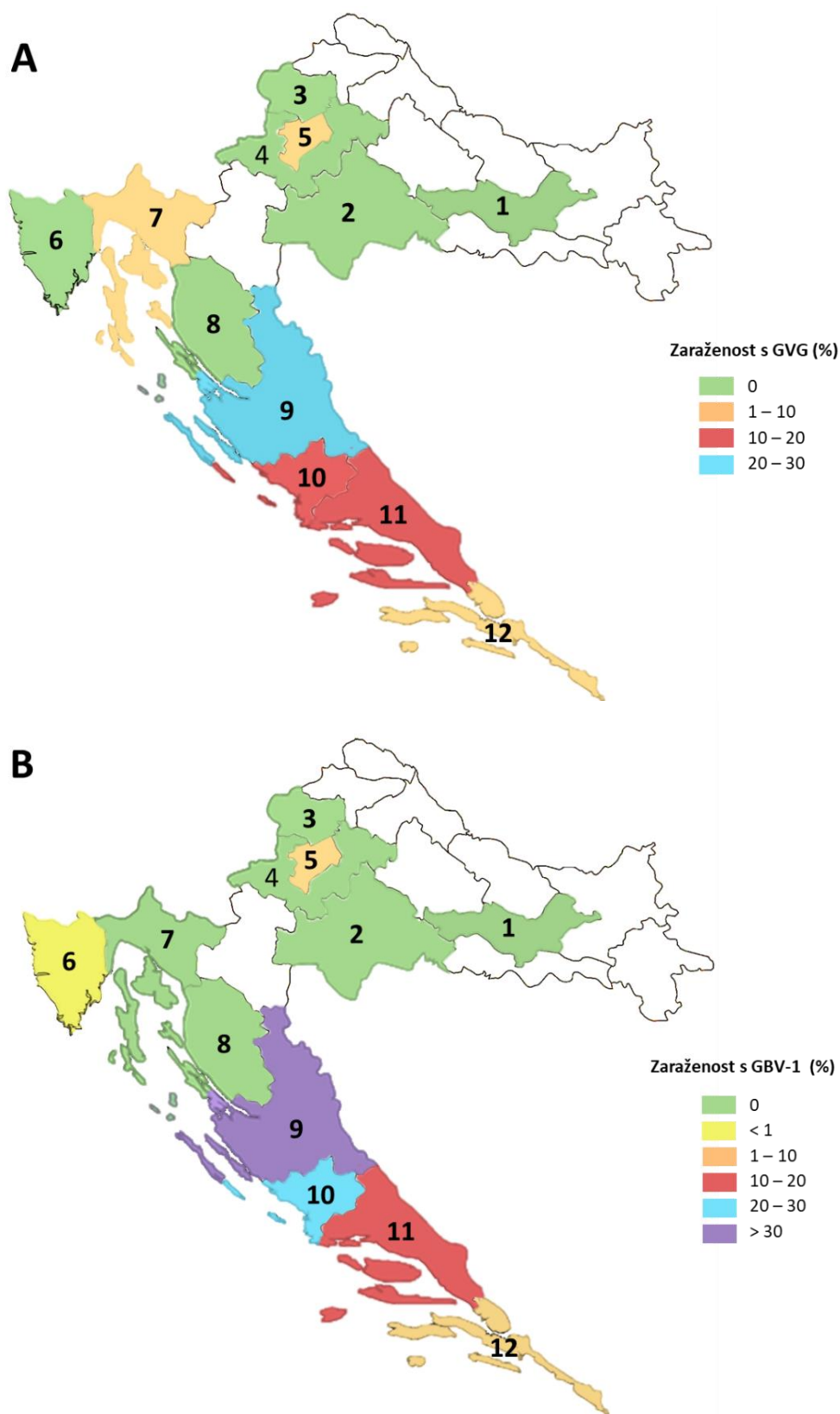
U istraživanju rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u komercijalnim vinogradima, iz istih je sakupljeno i testirano najviše uzoraka sorte 'Plavac mali' (506), te je utvrđeno 0,20 % (1/506) zaraženosti s GVG, dok je zaraženost s GBV-1 iznosila 30,43 % (154/506). Najveća zaraženost s GVG od 100 % (3/3) potvrđena je u sortama 'Cipar' na lokaciji Pag 3 (otok Pag), 'Paške maraštine' (30/30) na lokaciji Pag 4 (otok Pag) i 'Vlaške' (54/54) na lokaciji Marceline (Kaštela). Više od 50 % zaraženosti s GVG zabilježeno je u biljkama sorata 'Mladenka' (74 %), 'Ljutun' (62,16 %) i 'Muškotel' (53,33 %), dok je najmanja zaraženost zabilježena kod sorte 'Plavac mali' (0,20 %). Zaraženost s GBV-1 u svim testiranim biljkama utvrđena je u sorti 'Topol' (3/3) na lokaciji Pag 3 (otok Pag), dok je više od 50 % zaraženosti tim virusom utvrđeno u uzorcima od sorata 'Maraština' (96 %) te 'Cipar' (57,14 %), dok je najmanja zaraženost utvrđena u sorti 'Borgonja' (1,94 %). Zabilježene su također i istovremene infekcije s GVG i GBV-1, pri čemu je najveći njihov postotak od 57,14 % (8/14) zabilježen u sorti 'Cipar' na lokaciji Pag 3 (otok Pag), a najveći broj takvih infekcija (71) zabilježen je u uzorcima sorte 'Plavina' sakupljenim na lokacijama Mala Rava i Vela Rava (otok Rava). Bez obzira na to, mješovita infekcija s GVG i GBV-1 u istoj sorti na lokaciji Zemunik Donji nije utvrđena. Detaljan prikaz zaraženosti s GVG i GBV-1 po sortama, utvrđen u komercijalnim vinogradima priobalnog područja, nalazi se na grafikonu 4.6.



Grafikon 4.6. Broj biljaka autohtonih sorata zaraženih s GVG i GBV-1 te onih bez virusa uzorkovanih u komercijalnim vinogradima priobalne Hrvatske. U zagradama je naznačen broj različitih lokacija/vinograda s kojih su sakupljeni uzorci peteljki listova za testiranje metodom višestrukog RT-qPCR.

U istraživanje rasprostranjenosti GVG i GBV-1 u Hrvatskoj bilo je ukupno uključeno 12 županija. GVG je detektiran u uzorcima iz vinograda smještenih unutar 6 županija (50 %), pri čemu je najveća pojavnost od 28,89 % (210/727) zabilježena u Zadarskoj županiji, zatim u Šibensko-kninskoj od 15 % (6/40), Splitsko-dalmatinskoj od 12,99 % (204/1570), Gradu Zagrebu od 3,42 % (30/878), Primorsko-goranskoj županiji od 2,36 % (5/212) te u Dubrovačko-neretvanskoj županiji od 1,27 % (1/79). GVG nije detektiran u županijama: Požeško-slavonskoj, Sisačko-moslavačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Zagrebačkoj, Istarskoj i Ličko-senjskoj (Slika 4.12 A).

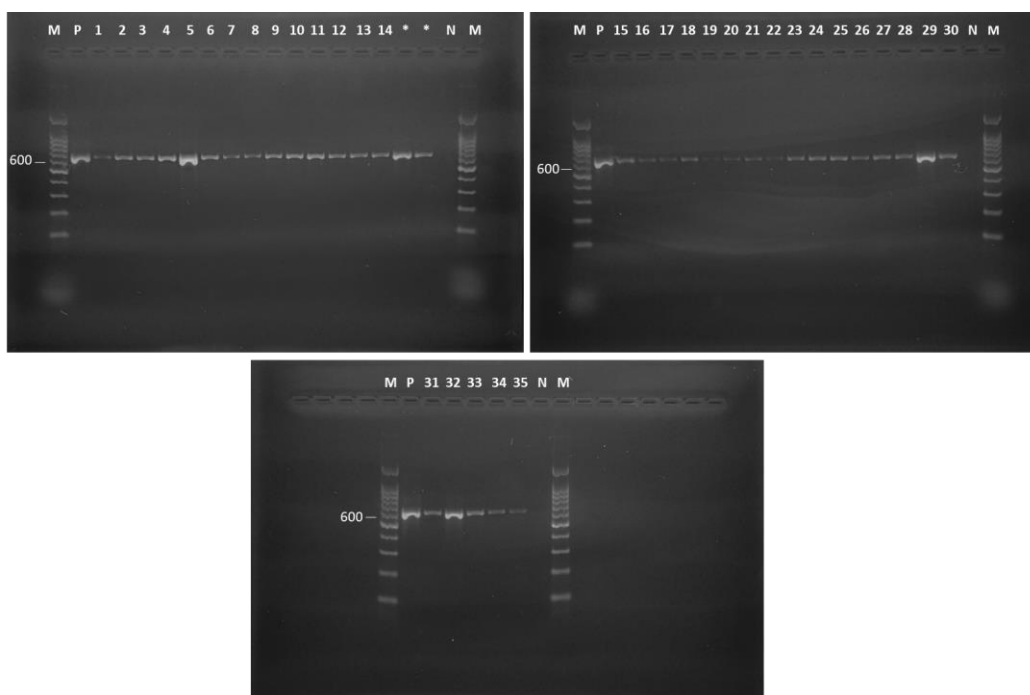
U šest županija utvrđena je i prisutnost GBV-1, s najvećom pojavnosti u Zadarskoj županiji od 39,20 % (285/727), zatim u Šibensko-kninskoj od 27,50 % (11/40), Splitsko-dalmatinskoj od 16,18 % (254/1570), u gradu Zagrebu od 2,85 % (25/878), Dubrovačko-neretvanskoj od 2,53 % (2/79) te Istarskoj županiji od 0,56 % (2/355). GBV-1 nije detektiran u Požeško-slavonskoj, Sisačko-moslavačkoj, Krapinsko-zagorskoj, Zagrebačkoj, Primorsko-goranskoj i Ličko-senjskoj županiji (Slika 4.12 B)



Slika 4.12. Rasprostranjenost GVG (A) i GBV-1 (B) prikazana prema pojavnosti po županijama u Hrvatskoj; 1–Požeško-slavonska; 2–Sisačko-moslavačka; 3–Krapinsko-zagorska, 4–Zagrebačka; 5–Grad Zagreb; 6–Istarska; 7–Primorsko-goranska; 8–Ličko-senjska; 9–Zadarska; 10–Šibensko-kninska; 11–Splitsko-dalmatinska; 12–Dubrovačko-neretvanska. Županije označene bijelom bojom nisu bile uključene u istraživanje.

4.5. Sekvenciranje i filogenetske analize

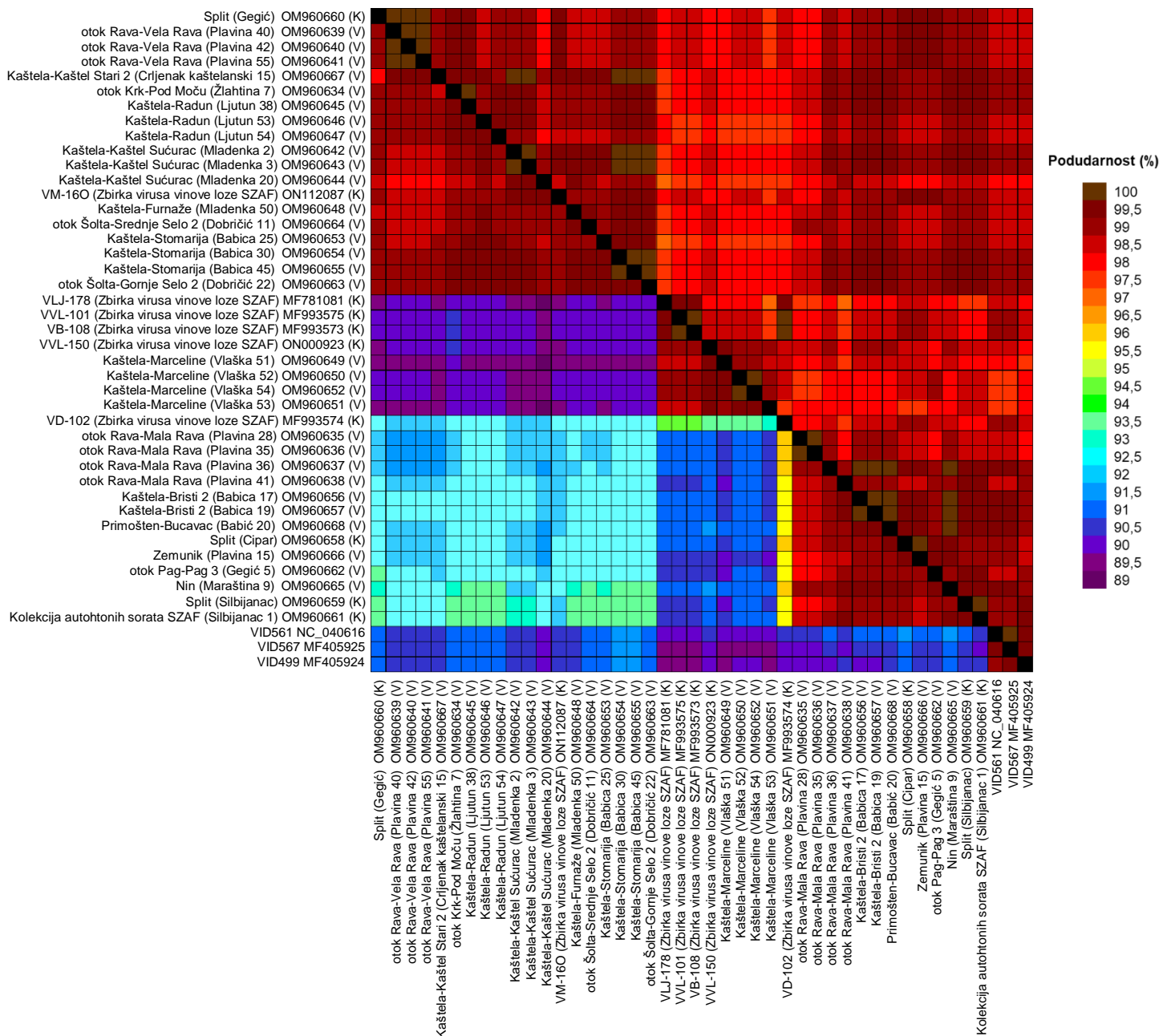
S ciljem utvrđivanja genetičke varijabilnosti istraživanih virusa izdvojeno je više zaraženih biljaka (35 s GVG i 50 s GBV-1) s više različitih lokacija. Testiranjem 35 biljaka zaraženih s GVG metodom RT-PCR u CP regiji genoma dobiveni su produkti veličine 606 baznih parova (bp), koji su vizualizirani na agaroznom gelu nakon provedene horizontalne elektroforeze (Slika 4.13). Nakon provedenog dvosmjernog sekvenciranja Sangerovom metodom, uklanjanja regija početnica te kreiranja konsenzus sekvenci, dobivene su sekvence veličine 564 bp. Usporedba navedenih izolata (35 dobivenih Sangerovom metodom i dva utvrđena metodom HTS – VVL-150 i VM-160) sa 7 izolata preuzetih iz baze GenBank koji su podrijetlom iz Novog Zelanda i Hrvatske (nisu uzeti u obzir izolati iz SAD zbog kraćih sekvenci), utvrđeno je 79,61 % (449/564) konzerviranih, 20,39 % (115/564) varijabilnih i 17,73 (100/564) parsimonijski-informativnih mjesta (Prilog 6). Usporedba pripadajućih aminokiselinskih sljedova potvrdila je 95,19 % (178/187) konzerviranih, 4,81 % (9/187) varijabilnih i 4,28 % (8/187) parsimonijski-informativnih mjesta (Prilog 7).



Slika 4.13. Vizualizacija RT-PCR produkata (606 baznih parova) na 1,5 % agaroznom gelu od 35 GVG izolata odabranih za sekvenciranje u regiji genoma kapsidnog proteina (CP). Oznake: M–DNA marker (GelPilot 100 bp Plus DNA Ladder, Qiagen, Hilden, Njemačka); 1 – 35–GVG izolati; P–pozitivna kontrola; N–negativna kontrola; *–nesekvencirani izolat.

Kreirana matrica udaljenosti potvrdila je najveći raspon podudarnosti na nukleotidnoj razini između hrvatskih izolata u iznosu od 89,01 % do 100 % (Slika 4.14). Također, najveći raspon podudarnosti na aminokiselinskoj razini od 96,79 % do 100 % potvrđen je u

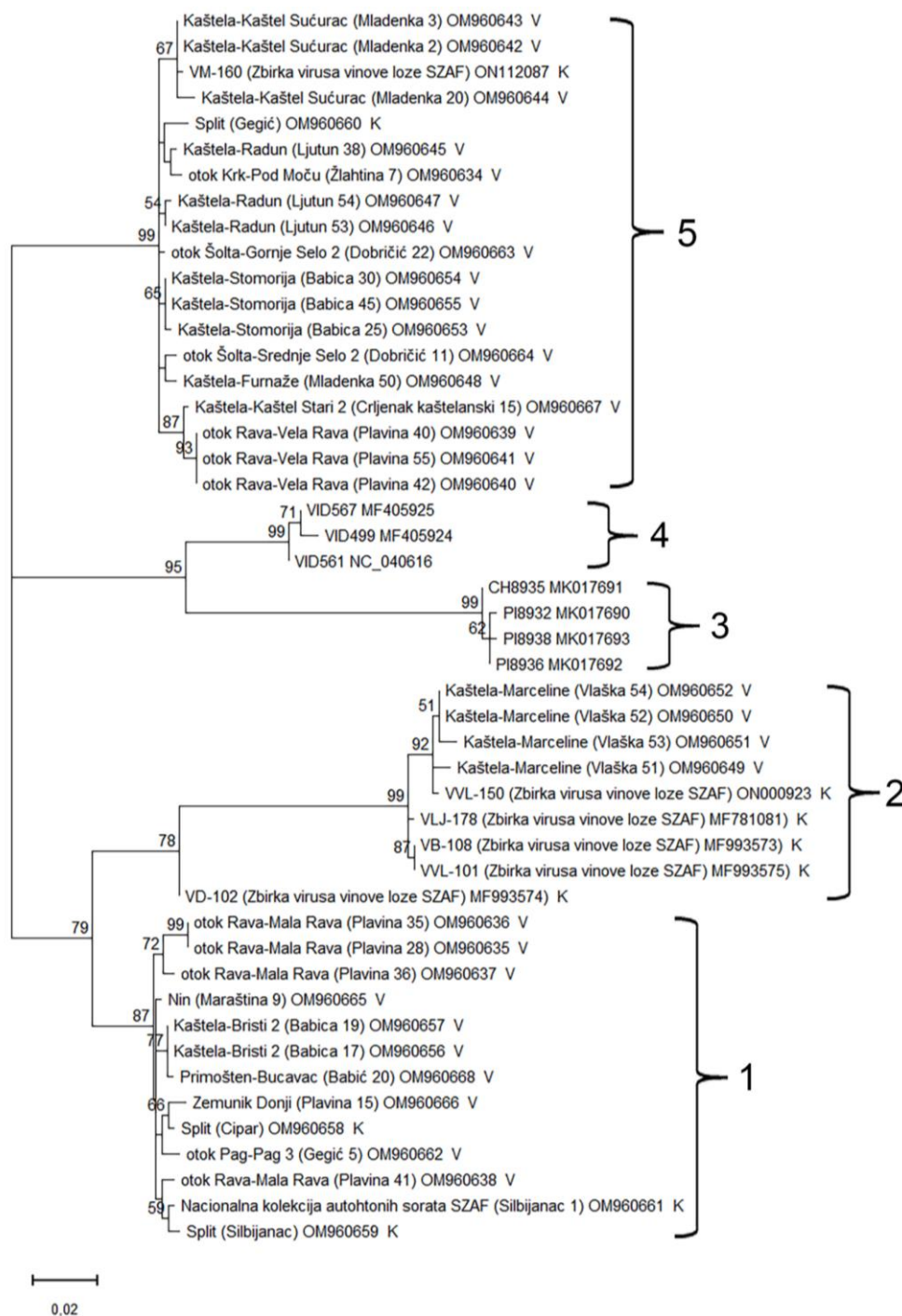
međusobnoj usporedbi hrvatskih GVG izolata. Najmanji raspon podudarnosti na nukleotidnoj i aminokiselinskoj razini zabilježen je u međusobnoj usporedbi novozelandskih izolata, u rasponu 99,11 – 99,65 % (nt) i 99,47 – 100 % (aa). Podudarnost između hrvatskih i novozelandskih GVG izolata iznosila je 89,36 – 91,13 % (nt) i 97,33 – 99,47 % (aa).



Slika 4.14. Matrica procjene evolucijske udaljenosti, po modelu p-udaljenosti na osnovi nukleotidnih sekvenci unutar regije gena kapsidnog proteina (564 nukleotida), između 37 hrvatskih GVG izolata utvrđenih ovim istraživanjem i sedam izolata preuzetih iz baze GenBank. Podudaranje na razini nukleotida – ispod dijagonale; podudaranje na razini aminokiselina – iznad dijagonale. Izolati podrijetlom iz Novog Zelanda označeni su imenom izolata i pripadajućim pristupnim brojem u bazi GenBank, dok su hrvatski izolati označeni mjestom, položajem, sortom i rednim brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.

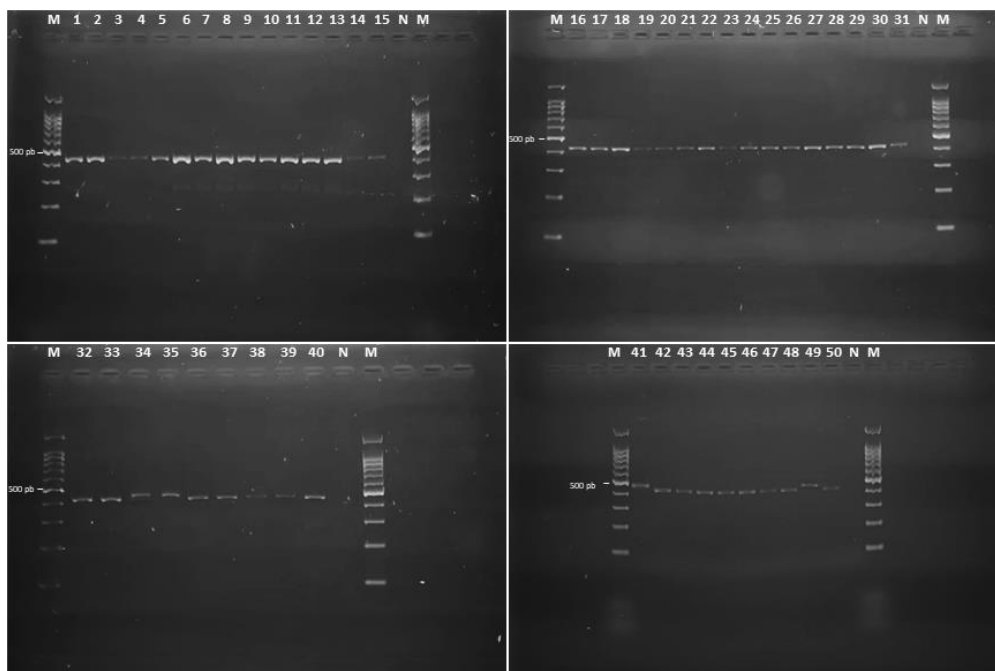
Filogenetska analiza 37 novootkrivenih hrvatskih GVG izolata i 11 izolata preuzetih iz baze GenBank (Tablica 3.2) otkrila je grupiranje izolata u pet filogenetskih grupa podržanosti 78 – 99 % (Slika 4.15). Grupa 3 se u potpunosti sastoji od otprije poznata četiri GVG izolata iz SAD-a, dok je grupa 4 sastavljena od izolata podrijetlom iz Novog Zelanda. Filogenetska grupa 2 objedinjuje otprije poznata četiri izolata iz Hrvatske, preuzeta iz baze GenBank (VLJ-178–MF781081, VVL-101–MF993575, VD-102–MF993574, te VB-108–MF993573), kao i novootkriveni izolat korišten u razvoju protokola detekcije – VVL-150 (ON000923) te četiri novootkrivena GVG izolata podrijetlom iz lokacije Marceline (Kaštela, Vlaška 51, 52, 53 i 54). Za razliku od spomenutih filogenetskih grupa, grupe 1 i 5 predstavljaju dosad nepoznati spektar genetske raznolikosti u CP regiji genoma, budući da se u potpunosti sastoje od novootkrivenih GVG izolata sekvenciranih i filogenetski obrađenih u ovom istraživanju.

Filogenetska analiza potvrdila je filogenetsku sličnost ili podudarnost GVG izolata podrijetlom iz istih lokacija, budući da su se oni grupirali blizu jedan drugome i na iste ogranke podržanosti veće od 50 % unutar istih filogenetskih grupa. Pri tome su se svi analizirani izolati sakupljeni sa šest lokacija grupirali unutar istih ogranaka, redom Kaštel Sućurac (Kaštela, Mladenka 2, 3 i 20), Stomorija (Kaštela, Babica 25, 30 i 45), Vela Rava (otok Rava, Plavina 40, 42 i 55), Marceline (Kaštela, Vlaška 51, 52, 53 i 54), Mala Rava (otok Rava, Plavina 28, 35 i 36) te Bristi 2 (Kaštela, Babica 17 i 19). Pritom je na lokacijama Marceline (Kaštela) te Mala Rava (otok Rava) zabilježeno formiranje podogranaka, sugerirajući veću genetsku divergentnost izolata na tim lokacijama u usporedbi s lokacijama Kaštel Sućurac i Stomorija (Kaštela), gdje također nisu svi izolati bili identični u analiziranom fragmentu. Najveća divergentnost izolata iz iste lokacije/vinograda zabilježena je na lokaciji Radun (Kaštela), pri čemu su se dva izolata grupirala zajedno na isti ogranak (Ljutun 53 i Ljutun 54), dok se izolat podrijetlom od udaljene biljke u istom vinogradu (Ljutun 38) pozicionirao zasebno u odnosu navedena dva izolata. Bez obzira na to, nije zabilježeno grupiranje izolata iz različitih lokacija na iste ogranke podržanosti veće od 50 %, osim u slučaju izolata s lokacije zbirke virusa vinove loze SZAF (VM-160 i VVL-150) s izolatima iz lokacija Kaštel Sućurac i Marceline (Kaštela), međutim treba uzeti u obzir da navedeni izolati iz zbirke virusa potječu od biljaka podrijetlom iz Kaštela. Sve navedeno ukazuje na međusobnu značajnu filogenetsku različitost GVG izolata podrijetlom iz različitih lokacija te identičnost ili sličnost izolata s istih lokacija u CP regiji genoma, što bi mogao biti rezultat lokalnog prijenosa virusa (Slika 4.15).



Slika 4.15. Filogenetsko stablo, konstruirano statističkom metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parameter modelu nukleotidne supstitucije i gama raspodjeli (T3 + G), prikazuje 37 GVG izolata utvrđenih ovim istraživanjem (dva izolata sekvenciranih metodom HTS – VVL-150 i VM-160 i 35 izolata sekvenciranih Sangerovom metodom) te 11 izolata preuzetih iz baze GenBank, na osnovi nekletidnih sekvenci unutar regije genoma kapsidnog proteina (CP; 564 nukleotida). Prikazana je podržanost ogranaka veća od 50 %. Izolati opisani ovim istraživanjem označeni su mjestom, položajem, sortom i brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijском nasadu (K) te pripadajućim pristupnim brojem u bazi GenBank. Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu. Oznake: 1 – 5–filogenetske grupe.

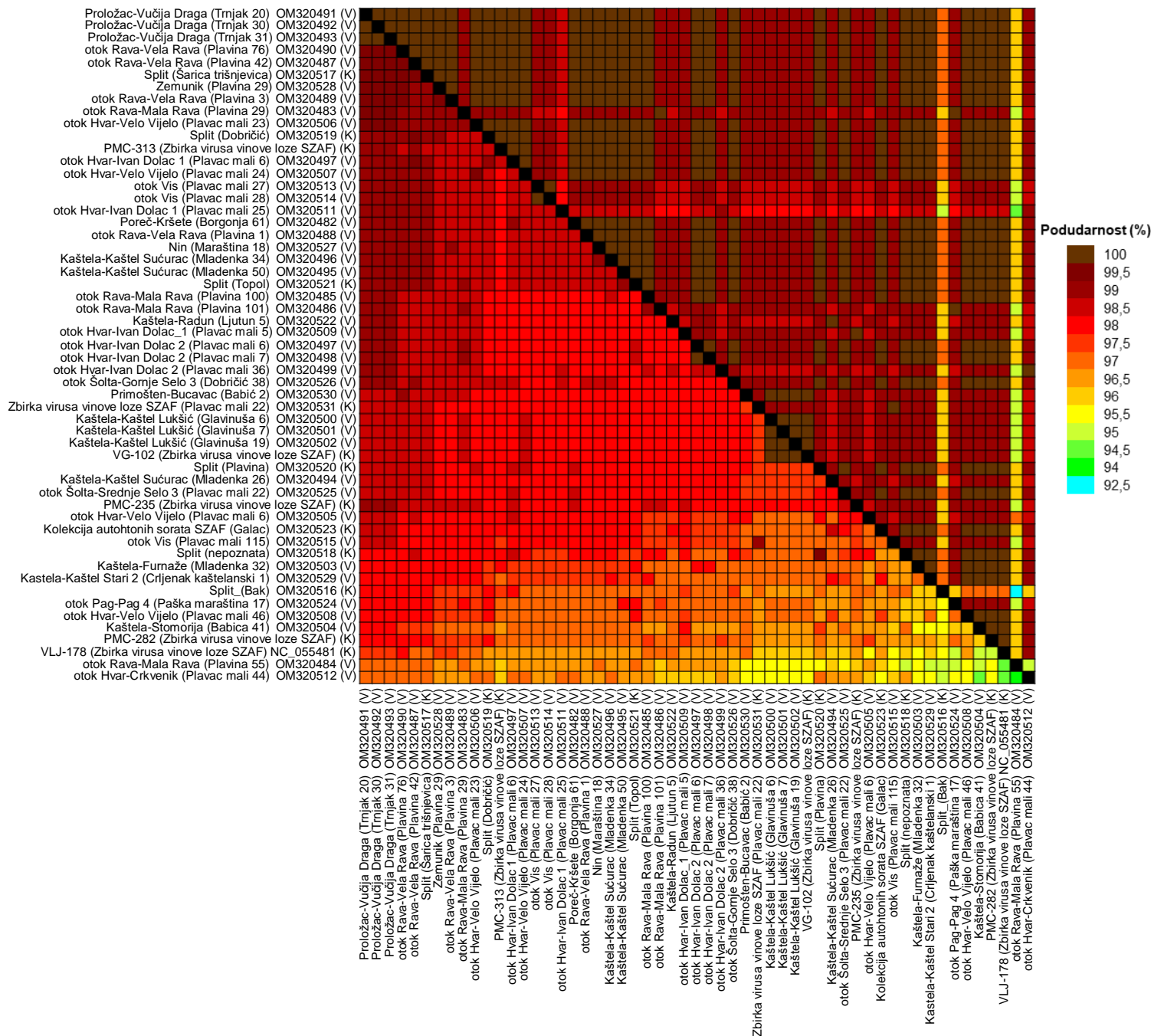
Detekcija GBV-1 u RT regiji genoma metodom PCR rezultirala je produktima veličine 419 bp, koji su vizualizirani na 1,5 % TBE agaroznom gelu nakon provedene horizontalne elektroforeze (Slika 4.16). Nakon obrade uzvodnih i nizvodnih sekvenci dobivene su konsenzus sekvence, koje su se bez regija komplementarnih početnicama sastojale od 375 nukleotida. Usporedba 54 izolata utvrđenih ovim istraživanjem (50 sekvenciranih Sangerovom metodom te četiri metodom HTS) te otprije poznatog izolata VLJ-178 (NC_055481) iz baze GenBank, pokazala je 73,33 % (275/375) konzerviranih, 26,67 % (100/375) varijabilnih te 15,20 % (57/375) parsimonijski-informativnih mjesta (Prilog 8). Usporedba pripadajućih aminokiselinskih sljedova (124 aa) rezultirala je s 89,52 % (111/124) konzerviranih, 10,48 % (13/124) varijabilnih i 3,23 % (4/124) parsimonijski-informativnih mjesta (Prilog 9).



Slika 4.16. Vizualizacija PCR produkata (419 baznih parova) na 1,5 % agaroznom gelu od 50 GBV-1 izolata odabranih za sekvenciranje u regiji genoma reverzne transkriptaze (RT). Oznake: M–DNA ljestvica (GelPilot 100 bp Plus Ladder, Qiagen, Hilden, Njemačka); 1 – 50–različiti GBV-1 izolati; N–negativna kontrola.

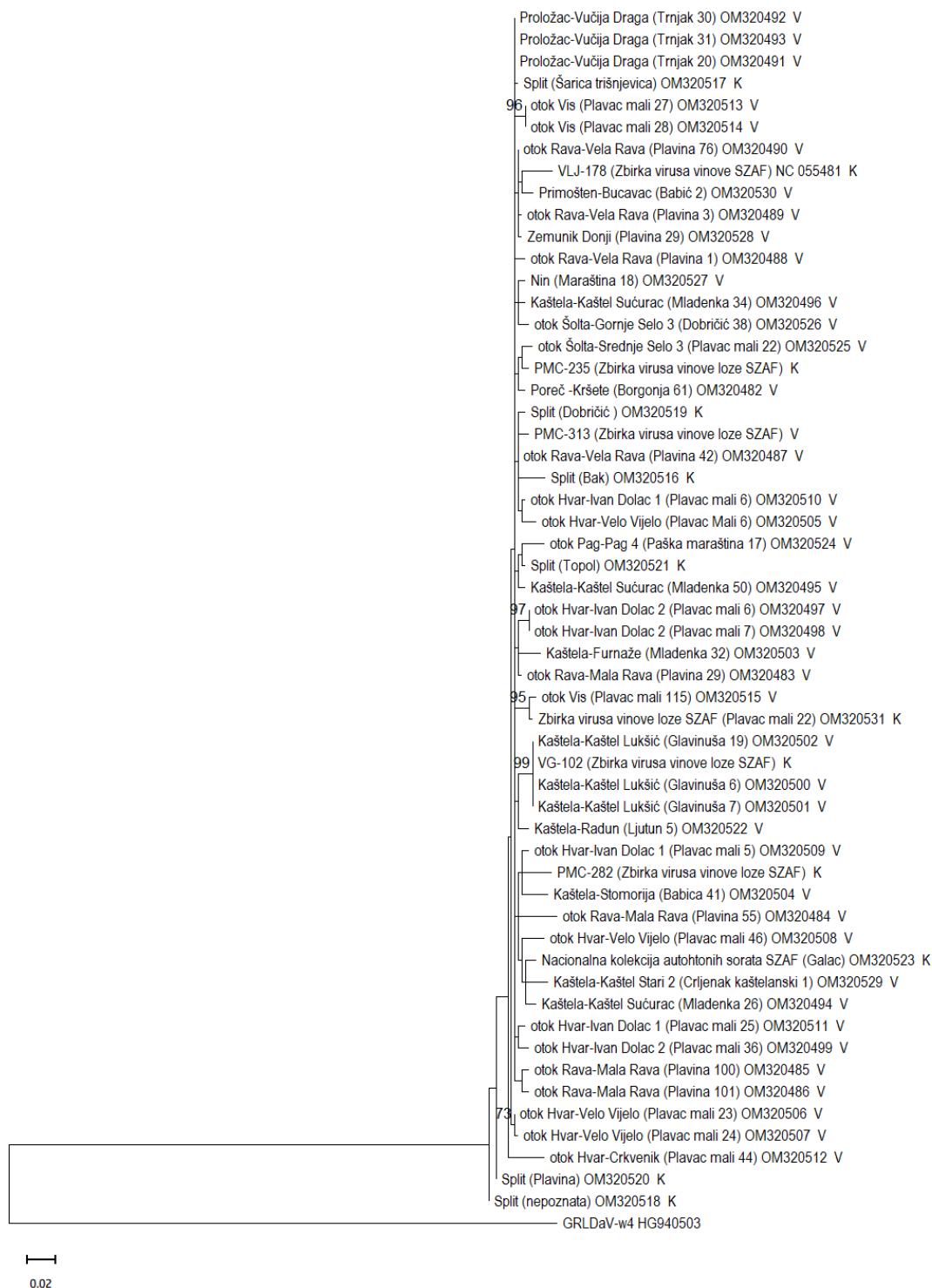
Analiza matricom udaljenosti na 54 hrvatska GBV-1 izolata potvrđena u ovom istraživanju i jednog izolata VLJ-178 iz baze GenBank, pokazala je međusobnu podudarnost u rasponu od 94,13 % do 100 % na nukleotidnoj te 92,74 % do 100 % na aminokiselinskoj razini RT regije genoma. Podudarnost od 100 % na nukleotidnoj razini zabilježena je u međusobnoj usporedbi izolata podrijetlom iz istih lokacija, redom: Vučija Draga (Proložac, Trnjak 20, 30 i 31), Petričevo (otok Vis, Plavac mali 27 i 28), Ivan Dolac 2 (otok Hvar, Plavac mali 6 i 7) i Kaštel Lukšić (Kaštela, Glavinuša 6, 7 i 19). Najmanja

podudarnost u nt zabilježena je između izolata s lokacija Mala Rava (otok Rava, Plavina 55) i Crkvenik (otok Hvar, Plavac mali 44), dok je najmanja podudarnost u aa utvrđena između izolata s lokacija Mala Rava (otok Rava, Plavina 55) i Split (Bak) (Slika 4.17).



Slika 4.17. Matrica procjene evolucijske udaljenosti, po modelu p-udaljenosti na osnovi nukleotidnih sekvenci unutar regije genoma reverzne transkriptaze (RT; 375 baznih parova), između 54 GBV-1 izolata utvrđenih ovim istraživanjem i izolata VLJ-178 preuzetog iz baze GenBank. Podudaranje na razini nukleotida – ispod dijagonale; podudaranje na razini aminokiselina – iznad dijagonale. Izolati su označeni mjestom, položajem, sortom i rednim brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijском nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.

Filogenetska analiza u RT regiji genoma od ukupno 55 GBV-1 izolata (50 novo sekvenciranih izolata Sangerovom metodom, četiri izolata sekvencirana metodom HTS – PMC-235, PMC-282, PMC-313 i VG-102 i izolata VLJ-178 preuzetog iz baze GenBank) potvrdila je nukleotidnu identičnost izolata iz istih lokacija, redom Petričevo (otok Vis, Plavac mali 27 i 28), Ivan Dolac 2 (otok Hvar, Plavac mali 6 i 7) i Kaštel Lukšić (Kaštela – Glavinuša 6, 7 i 19) te ih je smjestila u tri odvojena ogranka podržana od 96 do 99 % (Slika 4.18). Premda je izolat VG-102 detektiran u zbirci virusa vinove loze SZAF, podrijetlo vinove loze sorte 'Glavinuša' iz koje je izoliran je s područja Kaštela, što dokazuje njegovo grupiranje na isti ogranak i nukleotidnu identičnost s izolatima iz lokacije Kaštel Lukšić (Kaštela, Glavinuša 6, 7 i 19). S lokacije Petričevo (otok Vis) dva izolata sa susjednih trsova (Plavac mali 27 i 28) pokazala su se identičnima na nukleotidnoj razini, dok se treći izolat, prikupljen na istoj lokaciji, ali s udaljenijeg trsa (Plavac mali 115), grupirao u zaseban ogranak s izolatom iz zbirke virusa vinove loze SZAF (Plavac mali 22), koji je podrijetlom s otoka Visa. Navedeno sugerira filogenetsku heterogenost na lokaciji Vis s podudarnošću u analiziranom fragmentu RT regije genoma između susjednih trsova, a isti je fenomen primijećen i na lokaciji Ivan Dolac 2 (otok Hvar, Plavac mali 6 i 7 te Plavac mali 36). S druge strane, filogenetska podudarnost između izolata podrijetlom od susjednih i udaljenih trsova zabilježena je na lokacijama Vučija Draga (Proložac, Trnjak 20, 30 i 31) te Kaštel Lukšić (Kaštela, Glavinuša 6, 7 i 19). Premda nisu bili identični, izolati s lokacije Velo Vijelo (otok Hvar, Plavac mali 23 i 24) formirali su zasebni ogranak (73 % podržanosti) u odnosu na izolat podrijetlom iz udaljenog trsa Plavac mali 46, sugerirajući također veću sličnost izolata podrijetlom od susjednih trsova na navedenoj lokaciji. S obzirom da nije zabilježeno grupiranje izolata podrijetlom s različitih lokacija, sve navedeno sugerira na izraženi lokalni prijenos virusa, a posebno među susjednim trsovima u vinogradu.



Slika 4.18. Filogenetsko stablo, konstruirano statističkom metodom najveće vjerojatnosti (ML) prema Tamura-3-parameter modelu nukleotidne supstitucije i gama raspodjeli (T3 + G), prikazuje 54 GBV-1 izolata utvrđenih ovim istraživanjem te izolat VLJ-178 preuzet iz baze GenBank, na osnovi nukleotidnih sekvenci unutar regije genoma reverzne transkriptaze (RT; 375 nukleotida). Prikazana je podržanost ogranaka veća od 50 %. Izolati su označeni mjestom, položajem, sortom i brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijском nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank. Za ukorjenjivanje stabla korišten je GRLDaV izolat w4. Mjerna oznaka predstavlja broj supstitucija po nukleotidnom mjestu.

4.6. Prijenos istraživanih virusa

4.6.1. Prijenos ličinkama lozine štitaste uši (*Planococcus ficus* Sign.)

U istraživanju prijenosa virusa vektorom tijekom 2020. i 2021. godine, GVG i GBV-1 su uspješno preneseni ličinkama lozine štitaste uši (*Pl. ficus*) prvog i drugog razvojnog stadija jedino na sjemenjake vinove loze. U 2020. godini taj je prijenos za GVG ostvaren na 4 od 20 (20 %) korištenih sjemenjaka, dok je za GBV-1 prijenos bio uspješan na 9 od 20 (45 %) sjemenjaka vinove loze sorte 'Grk' x 'Panonia'. S obzirom da virusi nisu preneseni na zeljaste test biljke i korove u 2020. godini, u vektorskom prijenosu 2021. godine korišteni su samo sjemenjaci vinove loze sorte 'Žlahtina'. U 2021. godini GVG je metodom višestrukog RT-qPCR detektiran u 2 od 21 (9,52 %) korištenih sjemenjaka, što daje ukupnu uspješnost prijenosa GVG na vinovu lozu utvrđenu u dvogodišnjem prijenosu od 14,63 %. Tijekom 2021. godine GBV-1 je uspješno prenesen na 16 od 21 (76,19 %) korištenih sjemenjaka što je rezultiralo s ukupnom uspješnošću prijenosa kroz dvije godine od 60,98 % (Tablica 4.4).

S obzirom da je biljka sorte 'Vlaška' – VVL-112 (korištena kao izvor inokuluma u testovima prijenosa vektorom) uz GVG bila istovremeno zaražena i s GLRaV-3, svi sjemenjaci zaraženi s GVG nakon testova prijenosa dodatno su testirani i na GLRaV-3 metodom RT-qPCR te je u svima potvrđen navedeni virus.

Tablica 4.4. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 na zeljaste test biljke, korove i sjemenjake vinove loze korištenjem ličinki lozine štitaste uši (*Planococcus ficus*) prvog i drugog razvojnog stadija.

Virus	Godina prijenosa	Korištene biljke	Vrsta	Broj inficiranih biljaka/ broj korištenih biljaka (%)
GVG	2020	zeljaste test biljke	<i>Chenopodium murale</i>	0/10
			<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/20
		korovi	<i>Amaranthus retroflexus</i>	0/10
			<i>Ambrosia artemisifolia</i>	0/20
			<i>Chenopodium album</i>	0/20
			<i>Galinsoga parviflora</i>	0/10
			sjemenjaci vinove loze	<i>Vitis vinifera</i> (Grk x Panonia)
	2021	sjemenjaci vinove loze	<i>Vitis vinifera</i> (Žlahtina)	2/21 (9,52 %)
GBV-1	2020	zeljaste test biljke	<i>Chenopodium murale</i>	0/10
			<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/20
		korovi	<i>Amaranthus retroflexus</i>	0/10
			<i>Ambrosia artemisifolia</i>	0/20
			<i>Chenopodium album</i>	0/20
			<i>Galinsoga parviflora</i>	0/10
			sjemenjaci vinove loze	<i>Vitis vinifera</i> (Grk x Panonia)
	2021	sjemenjaci vinove loze	<i>Vitis vinifera</i> ('Žlahtina')	16/21 (76,19 %)

4.6.2. Prijenos mehaničkom inokulacijom

Nakon provedenog dvogodišnjeg istraživanja prijenosa GVG i GBV-1 mehaničkom inokulacijom korištenjem tri različita inokulacijska pufera (fosfatni, nikotinski te fosfat-nikotin-cisteinski), ni jedna od 26 zeljastih test biljaka, 43 korovne biljke i 7 sjemenjaka vinove loze korištenih u 2020. godini te 127 zeljastih test biljaka i 46 korovnih biljaka korištenih u 2021. godini nije bila pozitivna na GVG ili GBV-1, nakon provedenog testiranja metodom višestrukog RT-qPCR (Tablica 4.5).

Tablica 4.5. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 na sjemenjake vinove loze, zeljaste test biljke i korove mehaničkom inokulacijom korištenjem tri različita inokulacijska pufera. Oznake: P–fosfatni pufer; N–nikotinski pufer; P-N-C–fosfat-nikotin-cisteinski pufer.

Virus	Godina prijenosa	Korištene biljke	Vrsta	Broj inficiranih biljaka/ broj korištenih biljaka		
				P	N	P-N-C
GVG	2020	zeljaste test biljke	<i>Chenopodium murale</i>	0/5	0/6	0/6
			<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/3	0/3	0/3
		korovi	<i>Amaranthus retroflexus</i>	0/6	0/6	0/6
			<i>Ambrosia artemisifolia</i>	0/3	0/3	0/3
			<i>Chenopodium album</i>	0/4	0/3	0/3
			<i>Galinsoga parviflora</i>	0/2	0/2	0/2
			UKUPNO	0/26	0/25	0/25
		sjemenjaci vinove loze	<i>Vitis vinifera</i> (Grk x Panonia)	0/3	0/2	0/2
			UKUPNO	0/38	0/38	0/39
		2021	zeljaste test biljke	<i>Chenopodium murale</i>	0/38	0/38
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/4			0/4	0/4	
korovi	<i>Amaranthus retroflexus</i>		0/5	0/5	0/5	
	<i>Chenopodium album</i>		0/5	0/5	0/5	
	<i>Abuthilon theophrasti</i>		0/5	0/5	0/5	
UKUPNO	0/24		0/24	0/24		
GBV-1	2020	zeljaste test biljke	<i>Chenopodium murale</i>	0/6	0/5	0/6
			<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/3	0/3	0/3
		korovi	<i>Amaranthus retroflexus</i>	0/6	0/6	0/6
			<i>Ambrosia artemisifolia</i>	0/3	0/3	0/3
			<i>Chenopodium album</i>	0/3	0/3	0/4
			<i>Galinsoga parviflora</i>	0/2	0/2	0/2
			UKUPNO	0/26	0/24	0/26
		sjemenjaci vinove loze	<i>Vitis vinifera</i> (Grk x Panonia)	0/3	0/2	0/2
			UKUPNO	0/5	0/5	0/5
		2021	zeljaste test biljke	<i>Chenopodium murale</i>	0/5	0/5
<i>Nicotiana benthamiana</i>	0/4			0/4	0/4	
korovi	<i>Amaranthus retroflexus</i>		0/5	0/5	0/5	
	<i>Chenopodium album</i>		0/5	0/5	0/5	
	<i>Abuthilon theophrasti</i>		0/5	0/5	0/5	
UKUPNO	0/24		0/24	0/24		

4.6.3. Prijenos sjemenom vinove loze

Uzgojem sjemenjaka iz sjemena sakupljenog od izvorišnih biljaka zaraženih s GVG i GBV-1, proizvedeno je ukupno 420, odnosno 100 sjemenjaka koji su dospjeli u fazu 3 – 5 razvijenih listova u kojoj su testirani višestrukim RT-qPCR. Iako su sjemenjaci proizvedeni od ukupno pet biljaka loze sorte 'Žlahtina' inficiranih s GVG te šest različitih autohtonih sorata inficiranih s GBV-1, ni jedan od 520 testiranih sjemenjaka nije bio pozitivan na GVG ili GBV-1. Stoga, sposobnost prijenosa virusa sjemenom nije potvrđena za istraživane viruse (Tablica 4.6).

Tablica 4.6. Rezultati prijenosa istraživanih virusa sjemenom vinove loze. Prisutnost virusa provjerena je metodom višestrukog RT-qPCR.

Virus	Oznaka izvorišne biljke	Sorta	Broj inficiranih sjemenjaka/ broj testiranih sjemenjaka
GVG	Krk 37	Žlahtina	0/20
	Krk 82		0/20
	Krk 84		0/20
	Krk 85		0/20
	Krk 88		0/20
UKUPNO			0/100
GBV-1	3-L-1	Stara brajda	0/50
	4-H-4	Galac crni	0/45
	4-I-3	Gustopupica	0/68
	5-E-4	Soić crni (primka 1)	0/70
	8-E-1	Soić crni (primka 2)	0/63
	7-L-1	Mekuja	0/87
	8-F-1	Krstičevica	0/37
UKUPNO			0/420

4.6.4. Prijenos cijepljenjem „na zrelo“

Uspješan prijenos cijepljenjem „na zrelo“ dokazan je za oba istraživana virusa (GVG i GBV-1) i za sve korištene indikatore (Kober 5BB, *V. rupestris*, LN 33 i *V. riparia*), bez obzira na zaraženost jednim ili oba virusa u ishodišnim biljkama. Uspješnost prijenosa za GVG bila je 100 %, dok je uspješnost prijenosa za GBV-1 varirala od 44,44 % (Kober 5BB) do 100 % (*V. rupestris*) u prijenosu bez GVG te od 57,14 % (Kober 5BB) do 100 % (*V. riparia*) u koinfekcijskom prijenosu s GVG. Zabilježen je nešto uspješniji ukupni prijenos GBV-1 u koinfekcijskom prijenosu s GVG od 64,29 %, u odnosu na prijenos od 50 % bez prisutnosti GVG cijepljenoj plemci. U konačnici, testiranje višestrukim RT-qPCR potvrdilo je da su GVG i GBV-1 prenosivi cijepljenjem sa zaražene plemke na podlogu i to u ukupnom postotku od 100 % za GVG te 57,69 % za GBV-1 (Tablica 4.7). Osim mogućnosti prijenosa

putem cijepljenja „na zrelo“, američke vrste *V. rupestris* i *V. riparia* te hibridi Kober 5BB i LN 33 identificirani su kao pogodni domaćini istraživanih virusa.

Tablica 4.7. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 cijepljenjem zaražene plemke vinove loze na podlogu američkih vrsta i hibrida. Uspješnost prijenosa provjerena je metodom višestrukog RT-qPCR.

Virus	Indikator	Broj pozitivnih indikatora/ broj cijepljenih indikatora (%)	
GVG	Kober 5BB	36/36 (100 %)	
	<i>Vitis rupestris</i>	3/3 (100 %)	
	LN 33	4/4 (100 %)	
	<i>Vitis riparia</i>	6/6 (100 %)	
	UKUPNO	49/49 (100 %)	
GBV-1	Kober 5BB	4/9 (44,44 %)	
	<i>Vitis rupestris</i>	1/1 (100 %)	
	LN 33	1/2 (50 %)	
	UKUPNO	6/12 (50 %)	
GVG + GBV-1	Kober 5BB	GVG	7/7 (100 %)
		GBV-1	4/7 (57,14 %)
	<i>Vitis rupestris</i>	GVG	2/2 (100 %)
		GBV-1	1/2 (50 %)
	LN 33	GVG	3/3 (100 %)
		GBV-1	2/3 (66,67 %)
	<i>Vitis riparia</i>	GVG	2/2 (100 %)
		GBV-1	2/2 (100 %)
	UKUPNO	GVG	14/14 (100 %)
	UKUPNO	GBV-1	9/14 (64,29 %)

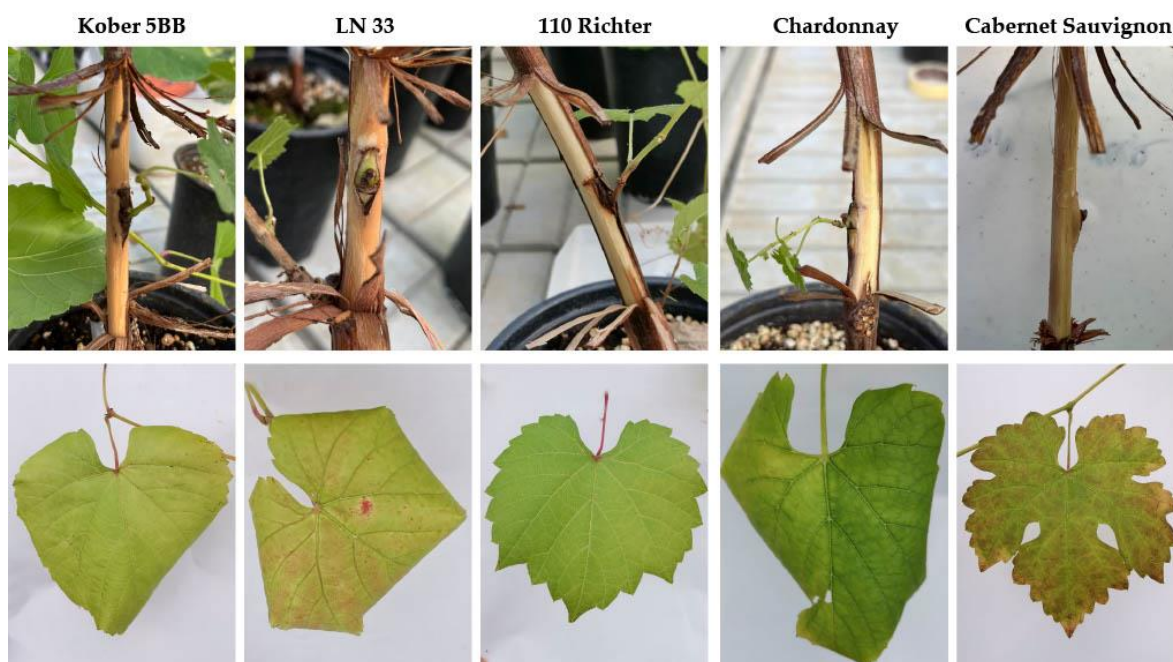
4.6.5. Prijenos cijepljenjem „zeleno na zrelo“

Cijepljenjem zelenih inficiranih pupova zaraženih s GVG tehnikom inokuliranja na T-spoj pod koru, uspješno su inokulirane tri od četiri biljke naciepljenih indikatora LN 33 i Kober 5BB, dvije od četiri biljke indikatora 110 Richter te dvije od tri biljke vinove loze sorata 'Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon', što je potvrđeno detekcijom virusa višestrukim RT-qPCR. U zbroju, GVG je uspješno prenesen na 12 od ukupno 30 naciepljenih biljaka indikatora, što je dalo postotak uspješnosti prijenosa virusa od 40 %. U suprotnosti s GVG, GBV-1 je detektiran samo u dvije biljke vinove loze sorata 'Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon' od ukupno 21 naciepljene biljke indikatora i vinove loze, što je dalo ukupni prijenos od 9,52 %. U tablici 4.8 nalazi se detaljan pregled rezultata cijepljenja „zeleno na zrelo“.

Tablica 4.8. Rezultati prijenosa GVG i GBV-1 cijepljenjem „zeleno na zrelo“ korištenjem drvenastih indikatora i vinove loze. Uspješnost prijenosa provjerena je metodom višestrukog RT-qPCR.

Virus	Indikator	Broj inficiranih indikatora/ broj cijepljenih indikatora (%)
GVG	LN 33	3/4 (75 %)
	Kober 5BB	3/4 (75 %)
	<i>Vitis rupestris</i>	0/4
	<i>Vitis riparia</i>	0/4
	110 Richter	2/4 (50 %)
	<i>Vitis vinifera</i> (Chardonnay)	2/3 (67,67 %)
	<i>Vitis vinifera</i> (Cabernet Sauvignon)	2/3 (67,67 %)
	UKUPNO	12/30 (40 %)
GBV-1	LN 33	0/3
	Kober 5BB	0/3
	<i>Vitis rupestris</i>	0/3
	<i>Vitis riparia</i>	0/3
	110 Richter	0/3
	<i>Vitis vinifera</i> (Chardonnay)	1/3
	<i>Vitis vinifera</i> (Cabernet Sauvignon)	1/3
	UKUPNO	2/21 (9,52 %)

Budući je biljka korištena kao izvor pupova za prijenos GVG bila istovremeno zaražena i s GLRaV-3, nakon provedene provjere metodom RT-qPCR u svim indikatorima i vinovoj lozi zaraženima s GVG, potvrđen je i prijenos GLRaV-3. Na listovima GVG+GLRaV-3 pozitivnih indikatora, u usporedbi s negativnim kontrolama, primijećeni su simptomi karakteristični za GLD, s izuzetkom asimptomatske biljke zaraženog indikatora 110 Richter. Simptomi su uključivali: žućenje i uvijanje plojke lista (Kober 5BB i ‘Chardonnay’), crvenilo i uvijanje listova (LN 33) te crvenilo bez uvijanja listova na vinovoj lozi sorte ‘Cabernet Sauvignon’. Bez obzira na folijarne simptome, na centralnim cilindrima inficiranih biljaka nakon skidanja kore nisu primijećene nikakve promjene u odnosu na neinficirane biljke (Slika 4.19). U suprotnosti sa simptomima primijećenima u slučaju zaraze s GVG i GLRaV-3, vizualnim pregledom listova i centralnih cilindara biljaka vinove loze zaraženih s GBV-1 nisu uočeni simptomi infekcije.



Slika 4.19. Različiti simptomi na listovima drvenastih indikatora (Kober 5BB i LN 33) i vinove loze ('Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon') inficiranih s GVG i GLRaV-3 pet mjeseci nakon provedbe cijepljenja „zeleno na zrelo“, s izuzetkom indikatora 110 Richter koji je bez simptoma. Na pripadajućim centralnim cilindrima kambija nisu uočene promjene koje bi upućivale na virusnu infekciju.

5. RASPRAVA

5.1. Osjetljivost i učinkovitost novih molekularnih metoda detekcije

Precizna i pouzdana dijagnostika virusa temelj je za sva ostala istraživanja u biljnoj virologiji. Razvoj metoda i protokola koji omogućavaju detekciju virusa u biljci prvenstveno proizlazi iz potrebe za kontrolom ekonomski značajnih bolesti koje uzrokuju veliku štetu biljnoj proizvodnji, koja je na globalnoj razini procijenjena na 15 milijardi američkih dolara (\$) godišnje (Matthews, 2019). Do danas je identificirano oko 30 ekonomski značajnih virusa vinove loze, za većinu kojih su razvijene metode detekcije bazirane na serološkim i/ili molekularnim metoda (Blouin i sur., 2017; Rowhani i sur., 2017c). Za razliku od ekonomski značajnih virusa, za velik broj novootkrivenih virusa vinove loze nije poznata stvarna uloga u interakciji s biljkama te utjecaj na biljnu proizvodnju, iz razloga što su mnogi od njih detektirani u asimptomatskim biljkama vinove loze zahvaljujući razvoju i primjeni metode HTS, pri čemu druga istraživanja nisu provedena (Saldarelli i sur., 2017). Budući da navedena metoda zbog visokih troškova izvedbe nije primjenjiva za testiranja širokih razmjera, za detaljniju karakterizaciju novootkrivenih virusa potrebno je razviti novi i što je moguće pouzdaniji dijagnostički protokol pogodan za testiranje većeg broja uzoraka. Prvi primjenjivani protokoli detekcije virusa vinove loze bili su biološki testovi, koji uključuju prijenos istraživanog virusa (mehaničkom inokulacijom, cijepljenjem i dr.) na test biljke i indikatore na kojima je moguća pojava dijagnostičkih simptoma (Martelli, 1993c) te se zbog toga koriste u studijama utjecaja virusa na biljku domaćina. Međutim, za precizno utvrđivanje zaraze i rasprostranjenost virusa u kulturi na nekom području koriste se metode izravne detekcije virusa iz biljnog materijala. Prva takva metoda namijenjena testiranju velikog broja uzoraka bila je serološka metoda ELISA, čiji protokoli su danas razvijeni za detekciju osam virusa vinove loze (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GLRaV-4, GFLV, ArMV, GVA i GVB) koji se široko primjenjuju (Blouin i sur., 2017). Međutim, u kontekstu detekcije novootkrivenih virusa vinove loze metode ELISA se ne primjenjuju iz razloga što zahtijevaju visoke troškove razvoja, ponajviše kao posljedica potrebe za purifikacijom virusa iz uzorka, ali i zbog kompleksne proizvodnje jednog ili više tipa protutijela (Blouin i sur., 2017). Zbog svega navedenog, u današnje vrijeme se glavnim protokolima detekcije virusa vinove loze, a posebno onih novootkrivenih, smatraju visoko osjetljive različite izvedbe metode PCR. Glavne prednosti navedene metode su niži troškovi razvoja (temeljeni na dizajnu početnica i proba) u odnosu na protokole metode ELISA, ali i mogućnost sekvenciranja izolata virusa, što je korisno u genetskim studijama karakterizacije virusa (Rowhani i sur., 2017). Bez obzira na visoku sofisticiranost i osjetljivost, pouzdanost protokola temeljenih na metodi PCR ovisi o precizno dizajniranim početnicama i probama u ovisnosti o divergentnosti

izolata u istraživanoj regiji genoma virusa. Usporedbom većeg broja izolata moguće je pronaći konzerviranije dijelove genoma koji će poslužiti kao kalup za dizajniranje početnica. Za vitiviruse vinove loze GVA i GVB početnice su razvijane u različitim regijama genoma s obzirom na divergentnost izolata, poput CP (Minafra i Hadidi, 1994; Goszczynski i Jooste, 2003c; Osman i sur., 2008) i RdRp regije (Saldarelli i sur., 1998; Dovas i Katis, 2003). Također, prvi RT-PCR protokoli za detekciju GVG, objavljeni u studijama iz Novog Zelanda 2017. i Hrvatske 2018. godine, razvijeni su na osnovi više različitih gena: protein povezan s replikazom (eng. *replicase polyprotein*), gena za replikazu i CP regije genoma, a korišteni su kao potvrda rezultata dobivenih HTS metodom (Blouin i sur., 2017a; Vončina i Almeida, 2018). Prvi RT-PCR protokol namijenjen terenskim istraživanjima detekcije GVG razvijen je u istraživanju u SAD-u i to usporedbom sedam tada poznatih izolata (tri iz Novog Zelanda i četiri iz Hrvatske) na bazi dvije regije genoma, uključujući gen za replikazu i CP regiju. Detekcijom virusa u dvije regije nastojali su se izbjeći lažno-negativni rezultati uslijed varijabilnosti u navedenim regijama genoma, koja zbog malog broja tada poznatih izolata još nije bila dobro istražena (Diaz-Lara i sur., 2019). U usporedbi svih do tada poznatih GVG izolata (SAD, Novi Zeland, Hrvatska) manje varijabilnom se pokazala CP regija genoma, u kojoj je podudarnost na nukleotidnoj razini bila u rasponu od 88,27 % do 99,80 %, za razliku od gena za replikazu u kojoj je podudarnost utvrđena u rasponu od 63,53 % do 100 % (Diaz-Lara i sur., 2019). Konačno, u usporedbi dva GVG izolata otkrivena metodom HTS u ovom istraživanju (VVL-150 i VM-160) (Prilog 2) s otprije poznatim izolatima iz Novog Zelanda (3) Hrvatske (4) i SAD-a (4) (Tablica 3.2), CP regija genoma je potvrđena kao najmanje divergentna za GVG zbog čega je korištena u razvoju početnica i proba u ovom istraživanju (Tablica 4.1, Slika 4.2 A). Za razliku od GVG, GBV-1 je do sada detektiran samo u Hrvatskoj i to jedan izolat VLJ-178 (NC_055481) u studiji iz 2018. godine (Vončina i Almeida, 2018) te četiri izolata u ovom istraživanju (PMC-235, PMC.282, PMC-313 i VG-102) (Prilog 3). Usporedbom navedenih izolata je RT regija genoma utvrđena kao najmanje divergentna zbog čega je korištena u dizajniranju početnica i proba za potrebe ovog istraživanja (Tablica 4.1, Slika 4.2 B). Za druge badnaviruse vinove loze, u svrhu detekcije molekularnim metodama, početnice su do sada razvijene na osnovi RT-regije za GVCV (Guo i sur., 2014), dok su za GRLDaV one razvijene na temelju RNaza H regije genoma (Morán i sur., 2020).

Osim metoda RT-PCR za GVG i PCR za GBV-1, u ovom istraživanju je razvijena metoda višestrukog RT-qPCR namijenjena detekciji oba istraživana virusa istovremeno (Slika 4.6). U svrhu testiranja većeg broja uzoraka vinove loze GES metoda je odabrana kao potencijalna metoda za izolaciju TNA iz biljnog tkiva, budući da je uspješno korištena u testovima optimiranja novodizajniranih početnica i proba za detekciju GVG (Slika 4.3) i GBV-1 (Slika 4.5) te otprije poznatih početnica za kontrolnu 18S rRNA (Slika 4.4) za metodu

višestrukog RT-qPCR (Osman i Rowhani, 2006). Metoda GES smatra se jednostavnom i dostupnom metodom izolacije TNA iz biljnog materijala koja ne eliminira PCR inhibitore iz konačnog produkta, već ih inaktivira (Rowhani i sur., 2000). Navedena metoda originalno je razvijena za izolaciju TNA u svrhu dijagnostike RNA virusa vinove loze te je uspješno korištena za viruse iz kompleksa naboranosti drveta – RW (Dovas i Katis, 2003; Osman i Rowhani, 2006; Osman i Rowhani, 2008; Jones i Nita, 2019) i GLD skupine (Osman i Rowhani, 2006; Osman i sur., 2007; Kumar i sur., 2015; Dumas i sur., 2022). Kasnije je metoda GES korištena i za izolaciju TNA u svrhu detekcije GRBV koji pripada DNA virusima vinove loze (Jones, 2016; Kahl, 2021, Kahl i sur., 2022). U svrhu korištenja metode GES u ovom istraživanju, kao metode izolacije TNA na temelju koje će biti provedena detekcija GVG i GBV-1 u velikom broju uzoraka razvijenom metodom višestrukog RT-qPCR, za istu je procijenjena učinkovitost testiranjem osjetljivosti navedene metode, naspram osjetljivosti iste metode detekcije u korištenju komercijalnih kompleta izolacije RNA i DNA. Komercijalni kompleti izolacije nukleinskih kiselina, poput onih proizvođača Life Technologies, Qiagen, Sigma, Bioneer Norgen, BioTek i dr., smatraju se sofisticiranijim, visoko učinkovitim i široko primjenjivim metodama korištenim u vinovoj lozi, pri čemu se kompleti tvrtke Qiagen smatraju jednim od najstarijih i najviše korištenih (Kominek, 2002; Xiao i sur., 2015). Bez obzira na to, mjerenje koncentracije i čistoće RNA i DNA izolirane iz 196 uzoraka navedenim Qiagen kompletima u ovom istraživanju pokazalo je značajna variranja u prinosu DNA i RNA te njihovoj čistoći. Prinosi RNA izolirane iz rozgvi bili su veći (najveća vrijednost – 83,20 ng/μL; prosječna vrijednost – 12,55 ng/μL) od RNA izolirane iz peteljke lista (najveća vrijednost – 7,60 ng/μL; prosječna vrijednost – 7,19 ng/μL), dok su koncentracije DNA izolirane iz rozgve bile u rasponu 3,00 – 43,50 ng/μL, pri čemu je prosjek iznosio 12,55 ng/μL (Prilog 1). S obzirom na referentnu vrijednost čistoće DNA i RNA za omjer apsorbancije valnih duljina A260/A280 od > 1,8, odnosno > 2,0 (Held, 2001), zadovoljene su vrijednosti čistoće za DNA (u prosjeku 1,81) i za RNA (u prosjeku 2,12) izoliranih iz peteljki listova. Suprotno od toga, isti parametar čistoće nije zadovoljen za RNA izoliranu iz rozgve (u prosjeku 1,65), što sugerira na kontaminaciju proteinima, fenolima ili drugim kontaminantima koji apsorbiraju svjetlost valne duljine od 260 nm (Thermofischer.com, 2019c), prisutnost kojih u uzorku može utjecati na smanjenu sposobnost detekcije virusa (Osman i sur., 2007).

U usporedbi osjetljivosti novodizajniranih protokola temeljenih na različitim izvedbama metoda PCR u detekciji GVG baziranim na različitim metodama izolacije RNA/TNA (RNeasy Plant Mini Kit i GES), dobivena je jednaka osjetljivost protokola za RT-qPCR (do razrjeđenja uzorka od 1:100 000) i protokola za RT-PCR (1:100) kod obje metode izolacije RNA/TNA (Slike 4.8 i 4.9). U studiji Osman i Rowhani (2008) provedena je

usporedba osjetljivosti detekcije virusa iz RW kompleksa (GVA, GVB, GVD i GRSPaV) metodama RT-PCR i RT-qPCR baziranim na izolaciji TNA metodom GES i kontrolnoj metodi izolacije RNA koja je uključivala strojno homegeniziranje tkiva pomoću uređaja ABI PRISM 6700 Automated Nucleic Acid Workstation (Applied Biosystems, Waltham, SAD). U toj studiji je metoda RT-qPCR, bazirana na TNA izoliranim metodom GES, bila dovoljno osjetljiva za detekciju do razrjeđenja TNA od 1:81 920, što je 1,2 puta manja osjetljivost od one utvrđene u ovoj studiji. Suprotno od toga, metoda RT-PCR je, s detekcijom do razrjeđenja TNA od 1:320, pokazala 3,2 puta veću osjetljivost od osjetljivosti iste metode u detekciji GVG. Razlog 3,2 puta manje osjetljivosti RT-PCR metode u ovom istraživanju moglo bi biti korištenje manjeg volumena TNA dodanog u reakcijsku smjesu za RT-PCR (0,2 μ L u ukupnom reakcijskom volumenu od 10 μ L) naspram istraživanja Osman i Rowhani (2008), gdje je korišteno 2 μ L TNA u ukupnom reakcijskom volumenu od 12 μ L. Međutim, istraživanje provedeno u ovoj studiji o utjecaju volumena TNA na uspješnost metode RT-PCR pokazalo je neučinkovitost reakcija na volumenima većim od 0,2 μ L (Slika 4.7). Da povećanje volumena TNA dobivenih metodom GES ima utjecaja na uspješnost PCR reakcije vidljivo je i iz studije Osman i sur. (2007). U toj studiji je provedena detekcija virusa iz skupine GLD (GLRaV-1,-2,-3,-4,-5 i -9) metodom RT-qPCR baziranoj na izolaciji metodom GES, pri čemu je primijećen nagli rast srednje Cq vrijednosti 22,3 – 39,4, odnosno opadanje osjetljivosti i efikasnosti reakcija s povećanjem volumena TNA od 1 do 8 μ L, u reakcijskom volumenu od 25 μ L. Taj je negativni efekt pripisan povećanju ukupnih nečistoća (posebno polisaharidnih i fenolnih spojeva) koje ne može kompenzirati povećanje ukupne TNA u reakcijskoj smjesi. Nečistoće u konačnici mogu dovesti i do inhibicije PCR reakcije, što se dogodilo u 50 % slučajeva pri volumenu od 10 μ L u tom istraživanju (Osman i sur., 2007). Osim utvrđivanja osjetljivosti, u ovom istraživanju je, prema trenutnim saznanjima, prvi puta za neki RNA virus vinove loze provjerena učinkovitost metode RT-qPCR bazirane na izolaciji TNA metodom GES u korištenju metode standardnih krivulja, za razliku od već provjerene učinkovitosti iste metode bazirane na izolaciji RNA korištenjem RNeasy Plant Mini Kit (Al Rwahnih i sur., 2012b). Bez obzira na lošiju učinkovitost metode RT-qPCR bazirane na metodi GES (106,87 %) (Slika 4.9 B) u usporedbi s Qiagen kompletom (103,85 %) (Slika 4.8 B), obje su metode bile dovoljno učinkovite za pouzdanu detekciju GVG, s obzirom da im je učinkovitost bila unutar preporučenog raspona 90 – 110 % (Boulter i sur., 2016).

U istraživanju osjetljivosti razvijenih PCR protokola za detekciju GBV-1, a s ciljem razvoja metode koja bi omogućila istovremenu detekciju oba istraživana virusa, umjesto qPCR metode za DNA virus testirana je metoda RT-qPCR. Osjetljivost metoda PCR i RT-qPCR, za razliku od detekcije GVG, ovisila je o metodi izolacije TNA (GES) i DNA (DNeasy

Plant Mini Kit). Izolacija TNA metodom GES pokazala se 100 puta manje osjetljivijom u detekciji metodom RT-qPCR (detekcija do razrjeđenja TNA od 1:100 000) i metodom PCR (1:100) (Slika 4.11) u usporedbi s kontrolnim izolacijskim kompletom DNeasy Plant Mini Kit (1:10 000 000, i 1:10 000) (Slika 4.10). U studiji Jones i sur. (2016), detekcijom GRBV, metodom qPCR baziranoj na TNA izoliranim metodom GES, dobivena je osjetljivost do razrjeđenja od 1:1 000 000, što je 10 puta veća osjetljivost navedenog protokola od onog za detekciju GBV-1 u ovom istraživanju. Razlog većoj osjetljivosti qPCR metode u toj studiji mogao bi biti izostanak koraka reverzne transkripcije (RT), korištenje strojnog homogeniziranja peteljki pomoću uređaja Homex 6 (Bioreba, Reinach, Švicarska), ali i općenito veći titar GRBV u biljci u usporedbi s GBV-1 u ovom istraživanju. Kahl (2021) navodi kako bi metoda GES mogla biti i pogodnija za DNA viruse, jer u detekciji istih nije potreban korak reverzne transkripcije koji je neophodan za RNA viruse, a koji može biti inhibiran od strane sekundarnih metabolita koji su prisutni u GES uzorku. Da metoda GES može biti pouzdana za izolaciju TNA u detekciji GBV-1, pa čak i s uključenim korakom reverzne transkripcije, vidljivo je i iz ovog istraživanja, u kojem je postignuta jednaka osjetljivost metode RT-qPCR u detekciji GBV-1 i GVG (1:100 000). Također, postignuta je i visoka učinkovitost RT-qPCR reakcije od 107,28 % (Slika 4.11 B), što je lošija učinkovitost u usporedbi s 97,91 % učinkovitosti reakcije bazirane na kontrolnoj metodi izolacije DNeasy Plant Mini Kit (Slika 4.10 B), ali je unutar granica preporučene učinkovitosti za pouzdanu detekciju virusa (Boulter i sur., 2016). Također, dobivena je puno bolja efikasnost detekcije GBV-1 metodom RT-qPCR baziranoj na metodi GES u ovom istraživanju od efikasnosti detekcije GRBV metodom qPCR u iznosu od 69,25 % (Jones, 2016). Osjetljivost PCR protokola mogla bi se i povećati korištenjem protokola za purifikaciju DNA nakon izolacije TNA "grubim" metodama, kao što je GES. Navedeno je vidljivo iz studije o detekciji GRLDaV u kojoj je, osim korištenja strojnog homogeniziranja pomoću uređaja Homex 6 homogenizer (Bioreba, Reinach, Švicarska), nakon izolacije TNA PBS metodom (0,2 % dietilditiokarbamat i 2 % PVP-10) korišteno pročišćavanje DNA s Plant/Fungi DNA isolation kit (Norgen Biotek Corporation, Thorold, Kanada). To je u konačnici rezultiralo povećanjem osjetljivosti metode qPCR do razrjeđenja od 1 : 1 000 000 000 (Morán i sur., 2020), što predstavlja 10 000 puta veću osjetljivost od one dobivene u detekciji GBV-1 u ovom istraživanju. S obzirom na dobivene rezultate, razvijena metoda višestrukog RT-qPCR baziranog na TNA dobivenim metodom GES, pokazala se zadovoljavajuće osjetljivom i efikasnom za istovremenu detekciju GVG i GBV-1 iz uzorka vinove loze.

Pored učinkovitih metoda izolacije nukleinskih kiselina te pouzdanih i osjetljivih protokola detekcije temeljenih na metodi PCR, razdoblje u godini i tip biljnog materijala vinove loze može biti od presudne važnosti za pouzdanu dijagnostiku virusa. Navedeno se

pripisuje izraženoj sezonskoj dinamici virusa u inficiranim biljkama (Gasparro i sur., 2019). Stoga je svrha istraživanja sezonske dinamike GVG i GBV-1 bila razviti najbolju strategiju uzorkovanja velikog broja uzoraka kako bi se postigla maksimalna detekcijska sposobnost metode višestrukog RT-qPCR, u kombinaciji s TNA izoliranim metodom GES. Uzorkovanjem peteljki bazalnih listova (u razdoblju aktivne vegetacije) i rozgvi (u mirovanju), koji se smatraju najpogodnijim tkivima za dijagnostiku virusa (Shabaniyan i sur., 2020) te mladica u razdoblju kretanja vegetacije (4. travnja), GVG je detektiran u svih 16 termina uzorkovanja te u svih pet zaraženih biljaka sorte 'Vlaška' tijekom 2019. godine (Grafikon 4.1, Prilog 4). Peteljke bazalnih listova su se već pokazale kao pogodniji materijal za detekciju vitivirusa GVA metodom ELISA u uzorkovanju od srpnja do listopada (uspješnost detekcije 50 %), u usporedbi s peteljkama srednjih i apikalnih listova na mladici (uspješnost detekcije <10 %) (Gasparro i sur., 2019). Međutim, detekcija virusa metodom PCR može također rezultirati lažno-negativnim rezultatima. Navedeni efekt je vidljiv na primjeru sezonske detekcije GLRaV-3 istražene korištenjem metode RT-qPCR, pri čemu su lažno-negativni rezultati dobiveni testiranjem listova sakupljenih u rano proljeće (travanj, svibanj) (Tsai i sur., 2011, Chooi i sur., 2016). U spomenutim istraživanjima je navedeni efekt pripisan niskom titru virusa u peteljkama u to doba godine, što je potvrđeno i u slučaju GVG u ovom istraživanju preko značajno viših srednjih Cq vrijednosti (> 28) u tom razdoblju. U suprotnosti s GVG, istraživanje sezonske dinamike kontrolne 18S rRNA otkrilo je da je srednja (aritmetička sredina) Cq vrijednost dobivena iz uzorkovanja 4. travnja statistički manja od srednjih Cq vrijednosti dobivenih tijekom ostalih termina uzorkovanja. Slično kao i kod GVG, srednje Cq vrijednosti za 18 S rRNA dobivene uzorkovanjem između 1. lipnja i 1. rujna nisu se statistički razlikovale, međutim nakon toga počinju rasti što se poklapa sa senescencijom lista pred kraj aktivne vegetacije. Najveća srednja Cq vrijednost zabilježena je u uzorkovanju 13. studenoga, kada je zadnji put uzorkovana peteljka lista, a nakon toga su se drastično smanjile uzorkovanjem rozgve, što je povezano s većom koncentracijom RNA u tom tkivu u usporedbi s listovima pred kraj aktivne vegetacije. Zanimljivo je da senescencija lista i smanjenje titra 18S rRNA u peteljkama nije bilo praćeno povišenjem Cq vrijednosti (smanjenjem titra) u detekciji GVG (Grafikon 4.2). Navedeni fenomen je primijećen i ranije kada je detekcija GLRaV-2 i GLRaV-3 potvrdila jednako visok titar virusa u listovima tijekom rujna i listopada (Shabaniyan i sur., 2020). U suprotnosti s GVG, za RNA viruse vinove loze poput GFLV i GPGV ustanovljen je najveći titar virusa u ranijim terminima uzorkovanja listova (svibanj, lipanj) u usporedbi s kasnijim terminima tijekom vegetacije (Rowhani i sur., 1992; Krebelj i sur., 2015, Bertazzon i sur., 2016). Sve navedeno upućuje na razlike među virusima u sposobnosti, brzini translokacije i zadržavanju u pojedinim tkivima, što može utjecati na sposobnost njihove detekcije u različitim razdobljima uzorkovanja i različitom biljnom materijalu (Krebelj i sur., 2015). Također, usporedba

sezonske dinamike GVG u različitim biljkama sorte 'Vlaška' pokazala je najveće Cq vrijednosti za biljku VVL-112 (u 9 od 16 termina uzorkovanja), pri čemu je i njena srednja Cq vrijednost bila signifikantno veća od srednjih Cq vrijednosti ostalih biljaka sorte 'Vlaška' (Grafikon 4.3). Time je potvrđeno statistički značajnije sezonsko variranje virusa u ovisnosti o zaraženoj biljci, što bi se u budućnosti moglo provjeriti i u ovisnosti o sorti.

Za razliku od GVG, GBV-1 nije detektiran u svim biljkama sorte 'Plavac mali' (PMC), odnosno u svim terminima uzorkovanja. Negativni rezultati dobiveni su 4. travnja testiranjem mladica biljaka PMC-022 i PMC-313 te 18. svibnja testiranjem peteljki bazalnih listova biljke PMC-022 (Grafikon 4.4, Prilog 4). Slični su rezultati dobiveni u studiji o sezonskoj dinamici drugog DNA virusa vinove loze, GRBV, u kojoj je dobiven negativan rezultat u ranom razdoblju uzorkovanja iz peteljki listova koje su isto obrađene metodom GES (Kahl i sur., 2022). Bez obzira na utvrđene negativne rezultate detekcije GBV-1 u početku vegetacije, statistička analiza potvrdila je da nema signifikantne razlike između srednjih Cq vrijednosti u detekciji GBV-1 dobivenim tijekom 16 termina uzorkovanja pet različitih biljaka sorte 'Plavac mali'. Tome je vjerojatno djelomično pridonijela strategija uzorkovanja starijih (bazalnih) listova na mladici, s obzirom da je dokazana negativna korelacija između veličine lista i dobivene Cq vrijednosti za GRBV, zbog čega je preporučeno uzorkovanje većih (starijih) listova (Setiono i sur., 2018). Osim za DNA viruse, fenomen većeg titra virusa u bazalnim listovima na mladici u odnosu na srednje i vršne listove dokazan je i za RNA viruse vinove loze, poput GLRaV-3 (Chooi i sur., 2016). Bez obzira što nije utvrđena statistički opravdana razlika u srednjim Cq vrijednostima za GBV-1 dobivenih u različitim terminima uzorkovanja, uzorkovanje biljnog materijala u početku kretanja vegetacije (travanj, svibanj), u svrhu testiranja protokolima za PCR, bi trebalo izbjegavati zbog mogućih negativnih rezultata dokazanih u ovom istraživanju. Prema rezultatima ovog istraživanja, u detekciji GBV-1 u obzir treba uzeti činjenicu da titar virusa može značajno varirati od biljke do biljke uzorkovanjem istog tkiva u istom terminu, što utječe na osjetljivost detekcije metodom RT-qPCR (Grafikon 4.5).

5.2. Rasprostranjenost i filogenetika istraživanih virusa

S obzirom na rezultate sezonske dinamike GVG i GBV-1, kao optimalno razdoblje za uzorkovanje peteljki listova vinove loze u istraživanju rasprostranjenosti virusa odabrani su ljetni mjeseci (lipanj i srpanj). Ukupno je sakupljeno 4327 uzoraka vinove loze i američkih vrsta loza (podloge) iz komercijalnih i kolekcijskih vinograda priobalne i kontinentalne Hrvatske, iz kojih su metodom GES izolirane TNA korištene u detekciji virusa validiranom metodom višestrukog RT-qPCR. Od svih sakupljenih uzoraka vinove loze GVG i GBV-1 su detektirani samo u uzorcima autohtonih hrvatskih sorata podrijetlom iz Dalmacije, dok ni

jedan uzorak ostalih testiranih autohtonih ni introduciranih sorata nije bio pozitivan. U skladu s time, istraživani virusi su detektirani u komercijalnim vinogradima u priobalnoj Hrvatskoj u stopi infekcije od 14,16 % za GVG i 18,42 % za GBV-1, dok su komercijalni vinogradi kontinentalnog dijela bili slobodni od istraživanih virusa. Uzimajući u obzir sve testirane uzorke, ukupna pojavnost u vinovoj lozi u Hrvatskoj bila je slična te je iznosila 10,54 % (456/4327) za GVG (Tablica 4.2), odnosno 13,38 % (579/4327) za GBV-1 (Tablica 4.3). Istražena pojavnost GVG i GBV-1 usporediva je s pojavnošću nekih ekonomski značajnih virusa vinove loze u Hrvatskoj, prije svega GLRaV-1 i GFLV. U studiji Karoglan-Kontiće i sur. (2009), testiranjem 1351 uzorka autohtonih sorata GLRaV-1 je utvrđen u njih 16,1 %, pri čemu je zaraženost u regiji Dalmacija iznosila 45 %, a u kontinentalnoj Hrvatskoj 13,9 %. U istoj studiji zaraženost s GFLV u priobalnoj Hrvatskoj je utvrđena u 16 % testiranih uzoraka, dok je zaraženost u kontinentalnom dijelu iznosila samo 0,39 % (2/511). Za razliku od toga, puno je veća bila zaraženost s GLRaV-3, koji je detektiran u regiji Dalmacija u 86 % testiranih trsova, dok je najmanja stopa zaraženosti na razini Hrvatske dobivena za ArMV, koji je detektiran u 1,7 % testiranih trsova (23/1351). S obzirom da se GFLV smatra najstarijim i među najrasprostranjenijim virusima vinove loze (Digiario i sur., 2017), koji je na razini EU reguliran certifikacijskim shemama za proizvodnju sadnog materijala slobodnog od virusa, prema uredbi Europske komisije (2019/2072) (EUR-Lex, 2022), zaraženost s GVG i GBV-1 u Hrvatskoj se može smatrati relativno visokom. Slični rezultati zaraženosti s GFLV dobiveni su i u studiji Vončina i sur. (2019), u kojoj je testiranjem autohtonih sorata vinove loze u Dalmaciji ona utvrđena u visini od 19,6 %. U usporedbi s pojavnošću vitivirusa u studiji Vončina i sur. (2019), pojavnost GVG utvrđena u ovom istraživanju je bila znatno manja od pojavnosti GVA (61,4 %) ali značajno veća od pojavnosti GVB (3,1 %). Veća pojavnost virusa u autohtonim sortama priobalne Hrvatske u odnosu na kontinentalni dio može se objasniti činjenicom da su u Dalmaciji na raspolaganju vrlo ograničeni izvori majčinskih biljaka koje se koriste za vegetativno razmnožavanje, ali i praksom cijepjenja, odnosno precjepijivanja biljaka na stalnom mjestu, odnosno na postojećim podlogama u vinogradu, što se primjenjuje kao posljedica toga da za većinu autohtonih hrvatskih sorata podrijetlom iz Dalmacije ne postoji proizvodnja certificiranog sadnog materijala (Maletić i sur., 2015). Takva bi praksa mogla biti povezana s činjenicom da je GVG detektiran u svim testiranim biljkama na lokacijama Pag 4 (otok Pag) te Furnaže i Marceline (Kaštela), dok je GBV-1 detektiran u 50 % ili više biljaka na devet različitih lokacija: Vela Rava (otok Rava) Pag 3 i 4 (otok Pag), Kraljičina plaža (Nin), Zemunik Donji, Ivan Dolac 1 i 2 (otok Hvar) Gornje Selo 3 (otok Šolta) i Dingač (Pelješac). Također, visoka zaraženost mogla bi biti i rezultat prijenosa lozinom štitastom uši (*Pl. ficus*) u prirodnim uvjetima, koja je dokazana kao vektor GVG i GBV-1 u kontroliranim uvjetima plastenika u ovom istraživanju, a česti je štetnik prisutan u vinogradima priobalnog područja (Masten Milek, 2009). U usporedbi s

visokim stopama zaraženosti na navedenim lokacijama, najmanja zaraženost s GVG zabilježena na lokaciji Zemunik Donji od 2 % (2/50) te Kaštel Stari 1 (Kaštela) od 2,5 % (1/40). Zaraženost s GVG na navedenim lokacijama može se usporediti s pojavnosću istog virusa na uzgojnom području Kalifornije (SAD). Na tom je području testirano 2436 uzoraka vinove loze iz komercijalnih vinograda, kolekcijskog nasada i nasada *Foundation Plant Services* (Sveučilište Kalifornija-Davis) te nasada Nacionalnog repozitorija klonske germplazme (eng. *National Clonal Germplasm Repository*, NCGR), pri čemu je utvrđena ukupna zaraženost s GVG od 0,2 % (4/2436) s pojavnosću u komercijalnim vinogradima okruga Santa Clara, u sortama 'Pinot crni' i 'Chardonnay' (Diaz-Lara i sur., 2019). Također, pojavnost GBV-1 u ovom istraživanju usporediva s utvrđenom pojavnosću druga dva badnavirusa vinove loze. Zaraženost s GVCV je u komercijalnim vinogradima savezne države Missouri (SAD) utvrđena u 8 % od 1600 testiranih trsova (Schoelz i sur., 2020), dok je GRLDaV utvrđen u 23,07 % (15/65) testiranih trsova u uzgojnim područjima Atena i Pieria (Grčka) (Morán i sur., 2020). U ovom je istraživanju prisutnost GVG i GBV-1 u mješovitim infekcijama zabilježena u 10 različitih autohtonih sorata vinove loze podrijetlom iz komercijalnih vinograda priobalne Hrvatske: 'Babić', 'Cipar', 'Debit', 'Dobričić', 'Gegić', 'Ljutun', 'Mladenka', 'Muškotel', 'Paška maraština', i 'Plavina'. Izuzetak je sorta 'Žlahtina' s lokacije Pod Moču (otok Krk), gdje je 2,36 % (5/212) biljaka bilo zaraženo s GVG, pri čemu nije zabilježena zaraza s GBV-1. S druge strane, GBV-1 je detektiran u pet sorata u kojima nije detektiran GVG, redom: 'Borgonja', 'Glavinuša', 'Pošip', 'Topol' i 'Trnjak'. Zanimljivi su rezultati zaraženosti s GVG i GBV-1 dobiveni za najznačajniju hrvatsku crnu sortu 'Plavac mali', za koju je u prethodnim studijama potvrđeno loše zdravstveno stanje po pitanju zaraženosti s ekonomski značajnim virusima vinove loze (GVA, GLRaV-1, GLRaV-3 i GFLV), što je okarakterizirano kao velik problem u klonskoj selekciji te sorte (Zdunić i sur., 2007; Zdunić i sur., 2009; Karoglan Kontić i sur., 2009; Vončina i sur., 2019; Čarija i sur., 2022). Suprotno od očekivanja, zaraženost sorte 'Plavac mali' s GVG iznosila je samo 0,2 % (1/506), pri čemu je jedna biljka od pet testiranih na lokaciji Bioka (Pelješac) bila pozitivna (Grafikon 4.6). S obzirom na mali broj testiranih biljaka na toj lokaciji, istraživanje bi u budućnosti trebalo proširiti uzorkovanjem više biljaka te sorte na toj, ali i drugim lokacijama u Hrvatskoj, kako bi se još preciznije odredila pojavnost GVG. S druge strane, zaraženost iste sorte s GBV-1 bila je mnogo veća te je iznosila 30,43 % (154/506). Razlog veće zaraženosti s GBV-1 u odnosu na GVG leži u činjenici da je GBV-1 u najvećoj mjeri detektiran na otocima Hvar (118/200) i Vis (32/231), gdje je i uzorkovano najviše uzoraka te sorte, a gdje, zanimljivo, GVG nije detektiran.

Filogenetska analiza provedena na 37 izdvojenih hrvatskih GVG izolata, zajedno s 11 izolata preuzetih iz baze GenBank, pozicionirala je izolate u pet jasno definiranih

filogenetskih grupa. S obzirom da su se izolati iz SAD-a te izolati iz Novog Zelanda pozicionirali u zasebne grupe 2 i 3, to sugerira njihovu međusobnu evolucijsku udaljenost, ali i filogenetsku različitost naspram hrvatskih izolata u CP regiji genoma (Slika 4.15). Navedeno filogenetsko pozicioniranje prema podrijetlu za GVG izolate u CP regiji je već prije potvrđeno u studiji iz SAD-a, pri čemu je isto potvrđeno i za sekvence izolata u genu za replikazu (Diaz-Lara i sur., 2019). S druge strane, novootkriveni hrvatski GVG izolati pozicionirali su se u tri međusobno udaljene filogenetske grupe (1, 2 i 5). Zanimljivo je da grupu 2 čine sva četiri otprije poznata hrvatska izolata (VB-108, VD-102, VLJ-178 i VVL-101) te pet izolata utvrđena ovim istraživanjem (Vlaška 51 OM960649, Vlaška 52 OM960650, Vlaška 53 OM960651, Vlaška 54 OM960652 i VVL-150 ON000923), pri čemu su svi izolirani iz biljaka podrijetlom iz okolice Kaštela (Hrvatska). Ostali izolati utvrđeni ovim istraživanjem raspodijelili su se u grupe 1 i 5, koje predstavljaju dosad nepoznatu genetsku varijabilnost GVG u CP regiji genoma. Grupa 5 je sastavljena od većeg broja izolata, dok grupa 1 objedinjuje više izolata podrijetlom s različitih lokacija. Slično grupiranje, u četiri filogenetski udaljene grupe, primijećeno je i za GVB izolate u CP regiji genoma (Hu i sur., 2014). Još jedna posebnost grupiranja GVG izolata na filogenetskom stablu je bliže pozicioniranje, odnosno grupiranje unutar istih ogranaka visoke podržanosti onih izolata podrijetlom iz iste lokacije/vinograda. Navedeno bi moglo sugerirati lokalni prijenos virusa, što podupire spomenutu teoriju o velikoj zaraženosti s GVG na pojedinim lokacijama/vinogradima kao rezultat lokalnog razmnožavanja biljaka ili prijenosa vektorima (kukcima).

Bez obzira na usporedbu izolata prema relativno malom fragmentu RT regije genoma od 375 nukleotida, filogenetska analiza 55 hrvatskih GBV-1 izolata pokazala je nekoliko zanimljivih činjenica. U pet slučajeva formirani su ogranci podržanosti veće od 50 % (Slika 4.18), što sugerira da su izolati unutar tih ogranaka slični ili identični u analiziranom fragmentu, da imaju evolucijski bliskog zajedničkog pretka te moguće lokalno rasprostranjivanje s obzirom da potječu iz istih vinograda, na lokacijama Petričevo (otok Vis), Ivan Dolac 2 i Velo Vijelo (otok Hvar) te Kaštel Lukšić (Kaštela). Filogenetska analiza potvrdila je ograničenu genetsku varijabilnost 94,13 – 100 % na nukleotidnoj i 92,74 – 100 % na aminokiselinskoj razini (Slika 4.17) te prostornu strukturiranost hrvatskih GBV-1 izolata, što bi moglo biti posljedica ograničenog broja majčinskih biljaka koji služe za propagaciju i proizvodnju sadnog materijala i/ili o ograničenom kontaminiranom materijalu koji se razmjenjuje, odnosno koristi za lokalno razmnožavanje i cijepljenje. Zanimljivo je da je do sada ovaj virus utvrđen jedino u vinovoj lozi u Hrvatskoj, dok su istraživanja u drugim zemljama (Južnoafrička Republika i Rusija) vezana uz nalaze na smokvama (*Ficus carica* L.) (Hans J. Maree, usmena komunikacija; Chirkov i sur., 2022). U istraživanju Chirkov i sur.

(2022) GBV-1 je detektiran u smokvi u Rusiji, pri čemu se dobiveni izolat Tem64 (OP087317) u filogenetskoj analizi (korištenjem izolata od 24 različite vrste biljnih badnavirusa) grupirao u zajednički ogranak s tipičnim predstavnikom patogena smokve, badnavirusom smokve 1 (eng. fig badnavirus 1, FBV-1), ali i s GBV-1 i GRLDaV izolatima iz vinove loze. Navedeno ukazuje na veću međusobnu evolucijsku srodnost tih virusa u odnosu na njihovu srodnost s drugim biljnim badnavirusima.

5.3. Prijenos i alternativni domaćini istraživanih virusa

Studije vezane uz biologiju i epidemiologiju novootkrivenih virusa vinove loze osnova su za određivanje njihove stvarne prijetnje za vinogradarsku proizvodnju. Poznavanje tih karakteristika pridonosi boljem razumijevanju njihovih interakcija u ekosustavu, čime se omogućuje donošenje ispravnih mjera za zaustavljanje ili usporavanje njihovog rasprostranjanja. Takve su studije već potvrdile vitiviruse i badnaviruse kao ekonomski značajne viruse vinove loze te su predložile smjernice za njihovu kontrolu. S obzirom da je za nedavno otkrivene viruse, GVG (Blouin i sur., 2017) i GBV-1 (Vončina i Almeida, 2018), potvrđena velika pojavnost u Hrvatskoj, posebno u priobalnom području, povećan je rizik od njihovog daljnjeg rasprostranjanja. Jedan od glavnih načina prijenosa virusa na kratke udaljenosti odvija se posredstvom vektora, zbog čega je njihovo suzbijanje jedan od glavnih načina kontrole virusa. Suzbijanje vektora posebno je važno u novim (mladim) vinogradima podignutim korištenjem bezvirusnog sadnog materijala (Hommay i sur., 2012; Pietersen i sur., 2013). Budući da je prijenos štitastim ušima (red Hemiptera, nadporodica *Coccoidea*) dokazan za vitiviruse poput GVA (Engelbrecht i Kasdorf 1990b; Garau i sur., 1995; Fortusini i sur., 1997; Goszczynski i Jooste 2003a, b, c; Nakano i sur., 2003; Zorloni i sur., 2006; Hommay i sur., 2008; Le Maguet i sur., 2012; Hommay i sur., 2022), GVB (Boscia i sur., 1993; Tanne i sur., 1993; Garau i sur., 1995; Maguet i sur., 2012), GVE (Nakaune i sur., 2008) i GVH (Jagunić i sur., 2021) te za badnavirus GRLDaV (Ekemen, 2021), isti je tip vektora odabran za eksperimentalni prijenos GVG i GBV-1 u ovom istraživanju. Lozina štitasta uš (*Pl. ficus*), potvrđeni vektor GVA, GVB, GVH i GRLDaV (Rosciglione i sur., 1983; Tanne i sur., 1993; Jagunić i sur., 2021; Ekemen, 2021), odabrana je za testove prijenosa budući da je jedna od najzastupljenijih vrsta štitastih uši prisutna u hrvatskom priobalju (Masten Milek, 2009). Testiranje biljaka metodom višestrukog RT-qPCR potvrdilo je prijenos oba virusa s loze na lozu, u ukupnoj stopi od 14,63 % za GVG i 60,98 % za GBV-1 (Tablica 4.4). Kako je ranije navedeno, vektorski prijenos navedenih virusa mogao bi biti razlog velike pojavnosti virusa na pojedinim lokacijama (do 100 % za GVG i do 96 % za GBV-1) te velike genetske sličnosti izolata s istih lokacija. S obzirom da virusi nisu detektirani u komercijalnim vinogradima kontinentalnog dijela Hrvatske, buduća

istraživanja bi se trebala orijentirati na korištenje štitastih uši koje nisu tipične samo za mediteranski klimati, čime bi se rizik od rasprostranjivanja GVG i GBV-1 mogao objektivnije procijeniti i za područje kontinentalne Hrvatske.

Osim vinove loze, i druge bi biljne vrste mogle imati ulogu u biologiji i epidemiologiji GVG i GBV-1, s obzirom da su virusi vinove loze već potvrđeni u različitim divljim i kultiviranim vrstama koje mogu poslužiti kao izvor inokuluma (Bahder i sur., 2016; Petersen i sur., 2019). Izuzev drvenastih kultura, i korovi u vinogradu mogu biti pogodni domaćini virusa vinove loze i/ili služiti kao izvor hrane za vektore, kao što je to slučaj s nematodama, vektorima uzročnika infektivne degeneracije (Digiario i sur., 2017). U ovom istraživanju su i prijenos ličinkama lozine štitaste uši i mehanički prijenos GVG i GBV-1 bili neuspješni na tipične korove česte u hrvatskim vinogradima (*A. retroflexus*, *A. artemisifolia*, *Ch. album*, *G. parviflora* i *A. theophrasti*) (slike 4.4 i 4.5). Ti su podaci u skladu s činjenicom da za vitiviruse i badnaviruse vinove loze još nisu objavljena istraživanja koja navode korove kao pogodne domaćine. To je u skladu i s nedavnom studijom u kojoj je za GVH potvrđen prijenos ličinkama lozine štitaste uši (*Pl. ficus*) s loze na lozu, dok prijenos nije potvrđen na korovne vrste česte u hrvatskim vinogradima: *Chenopodium murale* L., *A. theophrasti*, *A. retroflexus*, *A. artemisifolia* i *Papaver rhoeas* L. (Jagunić i sur., 2021). Bez obzira na to, korovi u vinogradima su već potvrđeni kao domaćini GFLV u Mađarskoj (*Aristolochia clematitis* L. i *Lagenaria siceraria* Standl.) (Horvath i sur., 1994) i Iranu (*Cynodon dactylon* L., *Polygonum* spp., *Sorghum halepense* L., *Melilotus* spp. i *Plantago lanceolata* L.) (Izadpanah i sur., 2003a; Izadpanah i sur., 2003b; Zakiaghl i sur., 2015). Također, nedavne studije potvrdile su prisutnost GPGV u čestim korovima u vinogradima u Italiji: *Ailanthus*, *Asclepias*, *Crataegus*, *Fraxinus*, *Rosa*, *Rubus* i *Sambucus* (Demian i sur., 2022), dok je GLRaV-3 detektiran u božuru (Mishchenko i sur., 2022). U suprotnosti s kultiviranim i korovnim biljkama koje se često istražuju za potrebe epidemioloških studija, laboratorijske zeljaste test biljke, poput vrsta *Ch. murale* i *N. benthamiana* korištene u ovom istraživanju, koriste se u svrhu precizne detekcije i karakterizacije virusa vinove loze, s obzirom da omogućuju bržu amplifikaciju i veći titar virusa u odnosu na vinovu lozu (Martelli, 2018). Nakon provedene mehaničke inokulacije korištenjem izvorišne simptomatične loze, GVA, GVB i GVD su prvi puta identificirani u zeljastim vrstama iz roda *Nicotiana* (Boscia i sur., 1993; Conti i sur., 1980; Bonavia i sur., 1996; Abou Ghanem i sur., 1997), a kasnije je ustanovljen i prijenos na iste vrste vektorima, poput *Pl. ficus* (La Notte i sur., 1997; Goszczynski i Jooste, 2003b), *P. longispinus* (La Notte i sur., 1997), *P. affinis* (Garau i sur., 1995) i *Parthenolecanium corni* (Hommay i sur., 2008). Za GRLDaV je također potvrđen mehanički prijenos na zeljaste test biljke *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa*, *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. rustica* i *Physalis floridana* (Maliogka i sur., 2015b; Rumbos i Avgelis, 1989).

Bez obzira na te prijašnje uspješne prijenose vitivirusa i badnavirusa vinove loze na zeljaste test biljke, prijenos GVG i GBV-1 na korištene vrste *Ch. murale* i *N. benthamiana* nije bio uspješan ni putem vektora (*Pl. ficus*) ni mehaničkom inokulacijom uz korištenje tri inokulacijska pufera (fosfatnog, nikotinskog te fosfat-nikotin-cisteinskog). Nemogućnost mehaničkog prijenosa utvrđena je i za GVE na zeljaste vrste *N. benthamiana*, *N. clevelandii*, *N. glutinosa* i *N. occidentalis* (Nakaune i sur., 2008). U istraživanju Monette i sur. (1990), uspješan prijenos GVA mehaničkom inokulacijom na vrstu *N. benthamiana* ostvaren je korištenjem inokuluma zaraženih eksplantata vinove loze iz "in vitro" uzgoja, naglašavajući kako bi uspješan mehanički prijenos mogao biti povezan s visokom koncentracijom virusa u uzorku za inokulaciju, što bi se u budućnosti moglo primijeniti i u pokusima prijenosa GVG i GBV-1.

Budući da se vinova loza razmnožava vegetativno, generativno razmnožavanje ne predstavlja značajan rizik za prijenos virusa. Bez obzira na to, prijenos virusa sjemenom može biti od velikog značaja u oplemenjivačkim programima vinove loze (Gasparro i sur., 2016). U ovom istraživanju prijenos GVG i GBV-1 sjemenom vinove loze nije potvrđen, budući da virusi nisu detektirani u 100 sjemenjaka dobivenih od pet biljaka sorte 'Žlahtina' zaraženih s GVG te u 420 sjemenjaka dobivenih od pet različitih autohtonih sorata zaraženih s GBV-1 (Tablica 4.6). Time su rezultati ovog istraživanja u skladu s rezultatima studije Gasparro i sur. (2016), u kojoj prijenos sjemenom vinove loze nije bio uspješan za viruse iz RW skupine (GVA, GVB i GRSPaV), GLD skupine (GLRaV-1, -2 i -3) te za ArMV, GFLV i GFkV. Ipak, rezultati za GFLV i GRSPaV u spomenutoj studiji nisu u skladu s rezultatima prethodnih studija u kojima je potvrđen njihov prijenos sjemenom (Laimer i sur., 2009; Lazar i sur., 1990). Također, za GRSPaV je dokazan prijenos na sjemenjake vinove loze sorte 'Cabernet Sauvignon', ali ne i na sjemenjake sorte 'Muscadelle' i 'Pinot crni' (Lima i sur., 2006). Sve navedeno upućuje na zaključak kako prijenos virusa vinove loze sjemenom može značajno ovisiti o sorti, kako je predloženo u nedavnoj studiji Zhang i sur. (2022). U navedenoj studiji ostvaren je uspješan prijenos GLRaV-2 i GPGV na sjemenjake vinove loze sorte 'Moldova', što bi moglo utjecati na promjenu općeprihvaćenog stava o vrlo ograničenoj mogućnosti prijenosa virusa vinove loze sjemenom. Sukladno navedenom, istraživanje vezano uz prijenos GVG i GBV-1 sjemenom bi se trebalo istražiti korištenjem većeg broja različitih sorata vinove loze.

Jedan od glavnih načina prijenosa virusa vinove loze na velike udaljenosti je trgovina zaraženim sadnim materijalom, budući da se isti dobiva cijepljenjem koje predstavlja vrlo uspješan prijenos virusa s vinove loze (plemka) na američke vrste i hibride (podloga), ali i obrnuto (Martelli, 1993a; Maliogka i sur., 2015a; Fuchs, 2020). U ovom istraživanju je

prijenos GVG cijepljenjem potvrđen u stopi od 100 % na sve korištene indikatore (Kober 5BB, *V. rupestris*, LN 33 i *V. riparia*) te na vinovu lozu ('Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon'). U suprotnosti s time, uspješnost prijenosa za GBV-1 je varirala od 44,44 % (Kober 5BB) do 100 % (*V. rupestris*) u prijenosu bez GVG te od 57,14 % (Kober 5BB) do 100 % (*V. riparia*) u koinfekcijskom prijenosu s GVG, uz ukupni srednji postotak prijenosa od 57,69 %. U konačnici, istraživani virusi su uspješno preneseni na sve korištene indikatore (Kober 5BB, *V. rupestris*, LN 33 i *V. riparia*) zbog čega se oni smatraju pogodnim domaćinima istraživanih virusa (Tablica 4.7). Zbog toga, kako je ranije spomenuto, višestruko cijepljenje plemki na iste podloge u vinogradu, bez prethodne kontrole zdravstvenog stanja, može značajno pogodovati rasprostranjivanju GVG i GBV-1. Prijenos virusa cijepljenjem može se spriječiti trgovinom certificiranog sadnog materijala koji se proizvodi certifikacijskim shemama od podloga i plemki majčinskih biljaka kontroliranog bezvirusnog podrijetla (Golino i sur., 2017). Certifikacijske sheme u EU regulirane su uredbom Europske komisije EU 2019/2072 (EUR-Lex, 2022), prema certifikacijskim protokolima koje je definirao EPPO (2008). Bez obzira što certifikacijske sheme mogu varirati od članice do članice (Maliogka i sur., 2015a), Hrvatska je uredbu u potpunosti usvojila u „Zakon o sjemenu, sadnom materijalu i priznavanju sorti poljoprivrednog bilja“ (NN 110/21). Prema tom zakonu u Hrvatskoj su regulirani GLRaV-1, GLRaV-3, GFLV i ArMV u podlogama i plemkama te GFkV samo u podlogama. Za tu nedosljednost vezanu uz ne regulaciju GFkV u plemkama, bez obzira na drugačije epidemiološke spoznaje, upozoreno je u studiji Maliogka i sur. (2015a). U toj je studiji također izražena zabrinutost zbog nereguliranja GVA i GLRaV-2 kao ekonomski značajnih virusa vinove loze. U Hrvatskoj nisu do sada regulirani ni GVG ni GBV-1, budući da njihovi učinci na vinovu lozu još nisu detaljno istraženi. Neregulacija GVG i GBV-1 bi u budućnosti mogla utjecati na njihovu još veću rasprostranjenost i pojavnost, poput GVA, koji je u regiji Dalmacija prisutan u stopi od 61,4 % (Vončina i sur., 2019). Posebno bi moglo biti zabrinjavajuće to što su GVG i GBV-1 prisutni u kolekcijskim vinogradima koji su osnovani na temelju klonske selekcije, a koji služe ili bi mogli služiti kao izvori biljaka za proizvodnju sadnog materijala autohtonih sorata (Maletić i sur., 2015).

Pored mehaničke inokulacije koja se koristi za prijenos virusa na zeljaste test biljke, cijepljenje „na zeleno“ ili „zeleno na zrelo“ predstavlja biološku metodu prijenosa virusa na drvenaste indikatore, koji služe za brži razvoj simptoma i pouzdaniju dijagnostiku virusa u certifikacijskim shemama (Rowhani i sur., 2017b). Cijepljenjem „zeleno na zrelo“, korištenjem tehnike okuliranja zaraženog zelenog pupa na T-spoj pod koru drvenastih indikatora i vinove loze, dokazan je uspješan prijenos za oba istraživana virusa. Pri tome je prijenos GVG ostvaren i na indikatore (LN 33, Kober 5BB i 110 Richter) i na vinovu lozu ('Chardonnay' i 'Cabernet Sauvignon'), dok je GBV-1 prenesen samo na vinovu lozu sorata

'Chardonnay i Cabernet Sauvignon' (Tablica 4.8). Pored infekcije s GVG, u svim je zaraženim biljkama nakon pokusa prijenosa vektorom i cijepljenjem „zeleno na zrelo“ utvrđena koinfekcija s GLRaV-3. Koinfekcijski i čak sinergistički odnos između vitivirusa i ampelovirusa već je prije primijećen preko učestalijeg zajedničkog pojavljivanja u inficiranim biljkama, što dovodi do veće koncentracije vitivirusa u biljkama i izraženijih simptoma (Rowhani i sur., 2018), kao i do simultanog prijenosa štitastim ušima (Bertin i sur., 2016). Simptomi primijećeni na indikatorima koinficiranim s GVG i GLRaV-3 odgovarali su tipičnim simptomima GLD, vidljivi u obliku žućenja i/ili crvenjenja u kombinaciji s uvijanjem listova u ovisnosti o sorti (Slika 4.19) (Pathirana i sur., 2005). Međutim, u obzir treba uzeti činjenicu da su simptomi slični GLD primijećeni i kod bolesti Syraha (SD) u Južnoj Africi i Australiji, a pripisuju se GVA, pri čemu je u inficiranim biljkama metodom HTS dokazana odsutnost GLRaV-3 (Wu i sur., 2020). Buduća istraživanja trebala bi utvrditi utjecaj GVG u pojedinačnim infekcijama na razvoj simptoma GLD. Za razliku od listova, na centralnim cilindrima kambija cijepljenih indikatora, na kojima se inače pojavljuju dijagnostički simptomi infekcije s virusima iz skupine RW, u slučaju infekcije s GVG+GLRaV-3 nisu uočene promjene koje bi upućivale na zarazu virusima. Dijagnostički simptomi za viruse iz RW kompleksa na tom organu indikatorskih biljaka se mogu podijeliti na: užlijebljenost drveta podloge Kober 5BB pod utjecajem GVA (Garau i sur., 1994), naboranost drveta podloge LN 33 (nespecifična povezanost) (Savino i sur., 1989), naboranost drveta podloge *V. rupestris* pod utjecajem GRSPaV (Meng i sur., 1999) te plutavost kore uzrokovane s GVB (Martelli, 1993b). Navedena je ekspresija simptoma RW kompleksa na indikatorima najizraženija cijepljenjem zaraženih plemki „na zrelo“, stoga bi se cijepljenjem bezvirusne podloge i plemke zaražene s GVG mogla provjeriti ova hipoteza. S druge strane, biljke vinove loze zaražene s GBV-1 nisu pokazivale simptome na listovima ni na centralnim cilindrima nakon skidanja kore. Potencijalni neutralni učinak GBV-1 na vinovu lozu mogao bi biti razjašnjen pomoću nedavne studije u kojoj je isti virus detektiran u različitim vrstama roda *Ficus* u Rusiji (Chirkov i sur. 2022) te smokvama u Južnoafričkoj Republici (Hans J. Maree, usmena komunikacija), čime se otvara mogućnost da vinova loza možda nije primarni domaćin istraživanih virusa. U prilog tome govori i činjenica o vrlo čestoj prisutnosti stabala smokve unutar ili u neposrednoj blizini vinograda, pri čemu su i vinova loza i smokva pogodni domaćini za štitaste uši, poput lozine štitaste uši (*Pl. ficus*), koja je dokazani vektor GBV-1 u ovom istraživanju.

Provedenim istraživanjem razvijene su pouzdane metode detekcije za GVG i GBV-1 kao temelj za buduća istraživanja njihove biologije i epidemiologije. Također, konstatirana je velika raširenost istraživanih virusa u priobalnom području, gdje, zbog korištenja ograničenog broja matičnih biljaka neprovjerenog zdravstvenog statusa za reprodukciju i

primjene drugih ampelotehničkih zahvata, postoji realna opasnost od njihovog daljnjeg rasprostranjivanja. Zbog utvrđenih čestih mješovitih infekcija s drugim virusima buduća istraživanja trebala bi biti usmjerena na rasvjetljavanje interakcija oba virusa s vinovom lozom te njihove potencijalne patogene uloge, njihove odnose sa drugim virusima kao i realan utjecaj na vinogradarsku proizvodnju, pri čemu bi se saznanja o njihovim ekološkim i epidemiološkim karakteristikama utvrđena u ovom istraživanju mogla iskoristiti kao temelj za razvoj strategija njihove kontrole.

6. ZAKLJUČCI

1. Provedenim istraživanjem razvijene su nove početnice i probe za detekciju istraživanih virusa metodama konvencionalnog RT-PCR za GVG i PCR za GBV-1 te višestruki RT-qPCR za istovremenu detekciju oba virusa. Navedeni protokoli uspješno su testirani na većem broju uzoraka te kroz jednu sezonu rasta i mirovanja vegetacije. S obzirom na dokazane visoke efikasnosti RT-qPCR reakcija te učinkovitost konvencionalnih metoda detekcije, novorazvijeni protokoli smatraju se osjetljivim i pouzdanim metodama detekcije GVG i GBV-1. Zbog svega navedenoga, prihvaća se hipoteza da se za GVG i GBV-1 mogu razviti precizne molekularne metode detekcije.

2. Analizom 4327 uzoraka vinove loze prikupljenih iz 93 komercijalna vinograda i 5 kolekcijskih nasada utvrđena je ukupna zaraženost s GVG od 10,54 % te 13,38 % s GBV-1. Oba virusa utvrđena su samo u autohtonim sortama vinove loze prisutnima u kolekcijskim vinogradima kontinentalne i priobalne Hrvatske te u komercijalnim vinogradima priobalne Hrvatske, ali ne i u komercijalnim vinogradima kontinentalnog dijela. Sukladno navedenome, djelomično se prihvaća hipoteza da su GVG i GBV-1 široko rasprostranjeni na području Hrvatske.

3. Od pet testiranih tipova prijenosa u uvjetima plastenika za oba virusa utvrđena je sposobnost prijenosa ličinkama lozine štitaste uši, cijepljenjem „na zrelo“ te cijepljenjem „zeleno na zrelo“. Za oba virusa nije potvrđena sposobnost prijenosa sjemenom prikupljenim sa zaraženih biljaka te mehaničkom inokulacijom. Sukladno rezultatima, djelomično se prihvaća hipoteza da se GVG i GBV-1, osim zaraženim sadnim materijalom, prenose sjemenom, mehanički, cijepljenjem te pomoću štitastih uši.

4. Osim vinove loze kao pogodni domaćini oba virusa u testovima prijenosa cijepljenjem potvrđene su indikatorske drvenaste biljke iz roda *Vitis* te njihovi hibridi koji se često koriste kao podloge u proizvodnji sadnog materijala vinove loze: *Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, Kober 5BB (*V. berlandieri* × *V. riparia*), LN 33 (Couderc 1613 × *V. berlandieri*) te 110 Richter (*V. berlandieri* × *V. rupestris*). Nisu potvrđeni dodatni domaćini istraživanih virusa među zeljastim test biljkama (*Nicotiana benthamiana* i *Chenopodium murale*) i korovima prisutnim u hrvatskim vinogradima (*Amaranthus retroflexus*, *Ambrosia artemisiifolia*, *Chenopodium album*, *Galinsoga parviflora* i *Abutilon theophrasti*). Na osnovi dobivenih rezultata prihvaća se hipoteza da vinova loza nije jedini domaćin istraživanih virusa.

7. POPIS LITERATURE

1. Abou Ghanem N., Saldarelli P., Minafra A., Buzkan N., Castellano M. A., Martelli G. P. (1997). Properties of grapevine virus D, a novel putative trichovirus. *Journal of Plant Pathology* 79: 15–25.
2. Adams M. J., Antoniw J. F., Bar-Joseph M., Brunt A. A., Candresse T., Foster G. D., Martelli G. P., Milne R. G., Fauquet C. M. (2004). Virology division news: the new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. *Archives of Virology* 149: 1045–1060. doi:10.1007/s00705-004-0304-0
3. Adams M. J., Accotto G. P., Agranovsky A. A., Bar-Joseph M., Boscia D., Brunt A. A., Candresse T., Coutts R. H. A., Dolja V. V., Falk B. W., Foster G. D., Gonsalves D., Jelkmann W., Karasev A., Martelli G. P., Mawassi M., Milne R. G., Minafra A., Namba S., Rowhani A., Vetten H. J., Vishnichenko V. K., Wisler G. C., Yoshikawa N., Zavriev S. K. (2005). Family: *Flexiviridae*. U: *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. 8th Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses (ur. Claude M., Fauquet M. A., Mayo J., Maniloff U., Desselberger L., Ball A.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, str. 1087-1122.
4. Al Rwahnih M., Sudarshana M. R., Uyemoto J. K., Rowhani A. (2012a). Complete genome sequence of a novel vitivirus isolated from grapevine. *Journal of Virology* 86: 9545–9545. doi:10.1128/jvi.01444-12
5. Al Rwahnih M., Osman F., Sudarshana M., Uyemoto J., Minafra A., Saldarelli P., Martelli G., Rowhani A. (2012b). Detection of grapevine leafroll-associated virus 7 using real time qRT-PCR and conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 179: 383-389. doi:10.1016/j.jviromet.2011.11.02
6. Al Rwahnih M., Diaz-Lara A., Arnold K., Cooper M. L., Smith R. J., Zhuang G., Battany M. C., Bettiga L. J., Rowhani A., Golino D. (2021). Incidence and genetic diversity of grapevine Pinot gris virus in California. *American Journal of Enology and Viticulture* 72: 64–169. doi:10.5344/ajev.2020.20044
7. Alabi O. J., McBride S., Appel D. N., Al Rwahnih M., Pontasch F. M. (2019). Grapevinevirus M, a novel vitivirus discovered in the American hybrid bunch grape cultivar Blanc du Bois in Texas. *Archives of Virology* 164: 1739–1741. doi:10.1007/s00705-019-04252-7.
8. Alston J. M. i Sambucci O. (2019). Grapes in the world economy. U: *The grape genome*. Compendium of plant genomes (ur. Cantu D., Walker M. A.), Springer, Cham, Switzerland, str. 1-24.

9. Andabaka Ž., Divić M., Jerković T., Stupić D., Marković Z., Preiner D., Maletić E., Karoglan Kontić J., Vončina D., Tomaz I., Šikuten I. (2022). Sanitary status of three Croatian native grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) from Dalmatia region included in clonal selection. *Journal of Central European Agriculture* 23: 533-539. doi:10.5513/JCEA01/23.3.3604
10. Atallah S. S., Gomez M. I., Fuchs M. F., Martinson T. E. (2012). Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *American Journal of Enology and Viticulture* 63: 73–79. doi: 10.5344/ajev.2011.11055
11. Avgelis A. D. i Rumbos I. C. (1991). Carnation mottle virus isolated from vines affected by "Roditis leaf discoloration". *Proceedings of the 10th Meeting of the ICVG*, 3.-7.09.1991., Volos, Greece, str. 437–443.
12. Avgelis A., Saldarelli P., Boscia D. (2006). Grapevine viruses associated with Roditis leaf discoloration. *Proceedings of the 15th Meeting of the ICVG*, 3.-7.04.2006., Stellenbosch, South Africa, str. 161–162.
13. Bahder B. W., Zalom F. G., Sudarshana M. R. (2016). An evaluation of the flora adjacent to wine grape vineyards for the presence of alternative host plants of grapevine red blotch-associated virus. *Plant Disease* 100: 1571–1574. doi:10.1094/PDIS-02-16-0153-RE
14. Balthazard J. (1993). Agricultural value of a leafroll-infected Gewürztraminer clone n. 913 sanitized by thermotherapy. *Progrès Agricole et Viticole* 110: 382–385.
15. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A. A., Dvorkin M., Kulikov A. S., Lesin V. M., Nikolenko S. I., Pham S., Prjibelski A. D., Pyshkin A. V., Sirotkin A. V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M. A., Pevzner P. A. (2012). SPAdes. A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19: 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
16. Basso M. F., Fajardo T. V. M., Saldarelli P. (2017). Grapevine virus disease: economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura* 39. doi:10.1590/0100-29452017411.
17. Beach S., Kovens M., Hubbert L., Honesty S., Guo Q., Pap D., Dai R., Kovacs L., Qiu W. (2017). Genetic and phenotypic characterization of grapevine vein clearing virus from wild *Vitis rupestris*. *Phytopathology* 107: 138–144. doi:10.1094/PHYTO-04-16-0173-R
18. Bem F. i Murrant A. F. (1979). Transmission and differentiation of six viruses infecting hogweed (*Heracleum sphondylium*) in Scotland. *Annals of Applied Biology* 92: 237–242. doi:10.1111/j.1744-7348.1979.tb03869.x

19. Bertazzon N., Forte V., Filippin L., Causin R., Maixner M., Angelini E. (2016). Association between genetic variability and titre of grapevine Pinot gris virus with disease symptoms. *Plant Pathology* 66: 949–959. doi:10.1111/ppa.12639.
20. Bertin S., Pacifico D., Cavaliere V., Marzachi C., Bosco D. (2016). Transmission of grapevine virus A and grapevine leafroll-associated viruses 1 and 3 by *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* fed on mixed-infected plants. *Annals of Applied Biology* 169: 53–63. doi:10.1093/jee/tow120
21. Besse S., Rüttsche C., Gugerli P. (2009) Tentative analysis of the economic impact of grapevine leafroll disease in the vineyard of Valais (Switzerland). Proceedings of the 16th Meeting of the ICVG, 31.08.-04.09.2009., Dijon, France, str. 232–233.
22. Bester R., Lotos L., Vermeulen A., Pietersen G., Maliogka V. I., Maree H. J. (2021). Genome sequence of a grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus (GRLDaV) variant from South Africa. *Archives of Virology* 166: 2041–2044. doi:10.1007/s00705-021-05079-x.
23. Beukman E. F. i Goheen A. C. (1965). Corky bark, a tumor-inducing virus of grapevines. Proceedings of the International Conference on Virus and Vector on Perennial Hosts with Special Reference to Vitis, 6.-10.09.1965., Davis, California, USA, str.164–166.
24. Bhat A. I., Hohn T., Selvarajan R. (2016). Badnaviruses: the current global scenario. *Viruses* 8: 177. doi:10.3390/v8060177.
25. Blouin A. G., Keenan S., Napier K. R., Barrero R. A., MacDiarmid R. M. (2017a). Identification of a novel vitivirus from grapevines in New Zealand. *Archives of Virology* 163: 281–284. doi:10.1007/s00705-017-3581-0
26. Blouin A. G., Chooi K. M., Cohen D., MacDiarmid R. M. (2017b). Serological methods for the detection of major grapevine viruses. U: Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 409–429. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_21.
27. Blouin A. G., Chooi K. M., Warren B., Napier K. R., Barrero R. A., MacDiarmid R. M. (2018). Grapevine virus I, a putative new vitivirus detected in co-infection with grapevine virus G in New Zealand. *Archives of Virology* 163: 1371–1374. doi:10.1007/s00705-018-3738-5.
28. Bonavia M., Digiaro M., Boscia D., Boari A., Bottalico G., Savino V., Martelli G.P. (1996). Studies on “corky rugose wood” of grapevine and the diagnosis of grapevine virus B. *Vitis* 35, 53–58.
29. Borah B. K., Sharma S., Kant R., Anthony-Johnson A. M., Saigopal D. V. R., Dasgupta I. (2013). Bacilliform DNA containing plant viruses in the tropics: commonalities within

- a genetically diverse group. *Molecular Plant Pathology* 14: 759–771. doi:10.1111/mpp.12046
30. Boscia D., Savino V., Minafra A., Namba S., Elicio V., Castellano M. A., Martelli G. P. (1993). Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology* 130: 109–120. doi:10.1007/bf01319000
 31. Boulter N., Suarez F. G., Schibeci S., Sunderland T., Tolhurst O., Hunter T., Hodge G., Handelsman D., Simananien U., Hendriks E., Duggan K. A. (2016). Simple, accurate and universal method for quantification of PCR. *BMC Biotechnology* 16: 27. doi:10.1186/s12896-016-0256-y
 32. Cabaleiro C. i Segura A. (2006). Temporal analysis of grapevine leafroll associated virus 3 epidemics. *European Journal of Plant Pathology* 114: 441–446. doi:10.1007/s10658-006-0006-4
 33. Candar S., Uysal T., Ayaz A., Akdemir U., Korkutal İ., Bahar E. (2021). Viticulture tradition in Turkey. *Viticulture Studies (VIS)* 1: 39–54. doi:10.52001/vis.2021.5
 34. 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: 277–280. doi.org/10.1007/s00705-017-3587-7
 35. Chirkov S., Sheveleva A., Tsygankova S., Sharko F., Mitrofanova I. (2022). Characterization of divergent grapevine badnavirus 1 isolates found on different Fig species (*Ficus* spp.). *Plants* 11: 2532. doi:10.3390/plants11192532.
 36. Chirstenhusz M. J. M. i Byng J. W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 26: 201. doi:10.11646/phytotaxa.261.3
 37. Chiumenti M., Morelli M., Giampetruzzi A., Palmisano F., Savino V. N., La Notte P., Martelli G. P., Saldarelli P. (2015). First report of grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus in Italy. *Journal of Plant Pathology* 97: 551. doi:10.4454/JPP.V97I3.036
 38. Chooi K. M., Cohen D., Pearson M. N. (2016). Differential distribution and titre of selected grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants within grapevine rootstocks. *Archives of Virology* 161: 1371–1375. doi:10.1007/s00705-016-2791-1
 39. Cieniewicz E. J., Qiu W., Saldarelli P., Fuchs M. (2020). Believing is seeing: lessons from emerging viruses in grapevine. *Journal of Plant Pathology* 102: 619–632. doi:10.1007/s42161-019-00484-3
 40. CIHEAM (2015). International Centre for Advanced Mediterranean Agronomic Studies. Phytosanitary challenges for the Mediterranean viticultural industry: emerging grapevine viruses. Dostupno na: http://vmcorporate.iamm.fr/publications/174/016_-Martelli.pdf; pristup: 05.10.2022.

41. Clark M. F. i Adams A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34: 475–483. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475
42. Clingeleffer P. R. i Krake L. R. (1992). Response of Cabernet franc grapevine to minimal pruning and virus infection. *American Journal of Enology and Viticulture* 43: 31–37. doi:10.5344/ajev.1992.43.1.31
43. Conti M., Milne R. G., Luisoni E., Boccoardo G. (1980). A closterovirus from a stem pitting diseased grapevine. *Phytopathology* 70: 394–399.
44. Culjak A. (2022). Zastupljenost ekonomski značajnih virusa u vinovoj lozi sorte Babić. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:722171>; pristup: 18.10.2022.
45. Čarija M., Radić T., Černi S., Mucalo A., Zdunić G., Vončina D., Jagunić M., Hančević K. (2022). Prevalence of virus infections and GLRaV-3 genetic diversity in selected clones of Croatian indigenous grapevine cultivar Plavac Mali. *Pathogens* 11: 176. doi:10.3390/pathogens11020176
46. Daane K. M., Middleton M. C., Sforza R., Cooper M. L., Walton V. M., Walsh D. B., Zaviezo T., Almeida R. P. P. (2011). Development of a multiplex PCR for identification of vineyard mealybugs. *Environmental Entomology* 40: 1595–1603. doi:10.1603/EN11075
47. Debat H., Zavallo D., Brisbane R. S., Vončina D., Almeida R. P. P., Blouin A. G., Al Rwahnih M., Gomez-Talquenca S., Asurmendi S. (2019). Grapevine virus L: a novel vitivirus in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 155: 319–328. doi:10.1007/s10658-019-01727-w
48. Demian E., Jakska-Czotter N., Varallyay E. (2022). Grapevine Pinot gris virus is present in different non-*Vitis* hosts. *Plants* 11: 1830. doi:10.3390/plants11141830
49. Diaz-Lara A., Golino D., Al Rwahnih M. (2018a). Genomic characterization of grapevine virus J, a novel virus identified in grapevine. *Archives of Virology* 163: 1965–1967. doi:10.1007/s00705-018-3793-y
50. Diaz-Lara A., Klaassen V., Stevens K., Sudarshana M. R., Rowhani A., Maree H. J., Chooi K. M., Blouin A. G., Habili N., Song Y., Aram K., Arnold K., Cooper M. L., Wunderlich L., Battany M. C., Bettiga L. J., Smith R. J., Bester R., Xiao H., Meng B., Preece J. E., Golino D., Al Rwahnih M. (2018b). Characterization of grapevine leafroll-associated virus 3 genetic variants and application towards RT-qPCR assay design. *PLoS ONE* 13: e0208862. doi:10.1371/journal.pone.0208862
51. 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: 2573–2580. doi:10.1007/s00705-019-04355-1

52. Digiario M., Elbeaino T., Martelli G. P. (2017). Grapevine fanleaf virus and other old world nepoviruses. U: Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management (ur. Meng B., Martelli G. P., Golino D. A., Fuchs M.) Springer, Cham, Switzerland; str. 47–82. doi:10.1007/s00705-019-04355-1
53. Dovas C. i Katis N. (2003). A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the *Vitivirus* and *Foveavirus* genera in grapevine. *Journal of Virological Methods* 107: 99–106. doi:10.1016/s0166-0934(02)00197-0
54. 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: 1495–1503. doi:10.1007/s00705-011-1071-3
55. Dumas M., Borges D., Preising S., Tippet E., Ambrosio M. M. Q., da Silva W. L. (2022). Gathered from the vine: a survey of seven grapevine viruses within New England vineyards. *Plant Disease*. doi:10.1094/PDIS-03-22-0668-SR
56. DZS (2022). Državni zavod za statistiku. Tablica 2.8. Površina različitih vrsta usjeva, u hektarima, Republika Hrvatska i HR NUTS 2 (HR_NUTS 2021.). Dostupno na: https://web.dzs.hr/PXWeb/Table.aspx?layout=tableViewLayout1&px_tableid=PP28.px&px_path=Popis%20poljoprivrede%202020__Poljoprivredno%20zemlji%c5%a1te&px_language=hr&px_db=Popis%20poljoprivrede%202020&rxid=0732e953-1537-4a20-b0c6-02dce20d4c33; pristup: 24.09.2022.
57. Đurić-Stjepanović K. (2021). Ekonomski značajni virusi vinove loze u vinogradima u okolici Poreča. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:872996>; pristup: 18.10.2022.
58. Eibach R. i Töpfer R. (2015). Traditional grapevine breeding techniques. U: Grapevine Breeding programs for the wine industry (ur. Reynolds A.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, str. 3–22. doi:10.1016/b978-1-78242-075-0.00001-6
59. Ekemen M. (2021). Investigation of etiology on grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus. Diplomski rad. Niğde Ömer Halisdemir University, Turkey. Dostupno na: <http://acikerisim.ohu.edu.tr/xmlui/handle/11480/8548>; pristup: 05.07.2022.
60. Engelbrecht D. J. i Kasdorf G. G. F. (1987). Occurrence and transmission of grapevine virus A in South African grapevines. *South African Journal of Enology and Viticulture* 8: 23-29. doi:10.21548/8-1-2325
61. Engelbrecht D. J. i Kasdorf G. G. F. (1990a). Field spread of corky bark, fleck, leafroll and Shiraz decline diseases and associated viruses in South African grapevines. *Phytophylactica* 22: 347-354
62. Engelbrecht D. J. i Kasdorf G. G. F. (1990b). Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug *Planococcus ficus*. *Phytophylactica* 22: 341–346. doi:10.1094/PHYTO-98-10-1093

63. Engvall E. i Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871–874.
64. EPPO (2008). European and Mediterranean Plant Protection Organization. Pathogen-tested material of grapevine varieties and rootstocks (Certification scheme). *EPPO Bulletin* 38: 422–429.
65. EPPO (2022). European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO Alert List. Dostupno na: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/alert_list; pristup: 20.09.2022.
66. EUR-Lex (2022). Access to European Union law. Provedbena uredba Komisije (EU) 2019/2072. Službeni list Europske unije L 319/1. Dostupno na: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/ALL/?uri=CELEX:32019R2072>; pristup: 08.10.2022.
67. Fiore N., Prodan S., Pino A. M. (2009). Monitoring grapevine viruses by elisa and RT-PCR throughout the year. *Journal of Plant Pathology* 91: 489–93.
68. Fortusini A., Scattini G., Prati S., Cinquanta S., Belli G. (1997). Transmission of grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and grapevine virus A (GVA) by scale insects. Extended Abstracts of the 12th Meeting of the ICVG, 29.09.–02.10.1997., Lisbon, Portugal, pp. 121–122.
69. Fuchs M. (2020). Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. *Journal of Plant Pathology* 102: 643–653. doi:10.1007/s42161-020-00579-2
70. Gambino G., Perrone I., Gribaudo I. (2008). A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19: 520–525. doi:10.1002/pca.1078
71. Garau R., Prota V. A., Piredda R., Boscia D., Prota U. (1994). On the possible relationship between Kober stem grooving and grapevine virus A. *Vitis* 33: 161–163.
72. Garau R., Prota V. A., Boscia D., Fiori M., Prota U. (1995). *Pseudococcus affinis* new vector of grapevine trichoviruses A and B. *Vitis* 34: 67–68. doi: <https://doi.org/10.5073/vitis.1995.34.67-68>
73. Gasparro M., Caputo A. R., Forleo L. R., Perniola R., Alba V., Milella R. A., Antonacci D. (2016). Study of main grapevine viruses transmission in breeding programs. *BIO Web Conferences* 7: 01039. doi:10.1051/bioconf/20160701039
74. Gašparec-Skočić Lj. (2015). Vinova loza i vino u povijesti, sadašnjosti i budućnosti Hrvata. *Hrvatska revija* 4. Dostupno na: <https://www.matica.hr/hr/470/vinova-loza-i-vino-u-povijesti-sadasnjosti-i-buducnosti-hrvata-25304/>; pristup: 29.09.2022.
75. 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: 262–268. doi:10.1016/j.virusres.2011.10.010
76. Giribaldi M., Purrotti M., Pacifico D., Santini D., Mannini F., Caciagli P., Rolle L., Cavallarin L., Giuffrida M. G. i Marzachi C. (2011). A multidisciplinary study on the effects of phloem-limited viruses on the agronomical performance and berry quality of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Journal of Proteomics* 75: 306–315.
77. Golino D. A., Fuchs M., Sim S., Farrar K., Martelli G. P. (2017). Improvement of grapevine planting stock through sanitary selection and pathogen elimination. U: *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (ur. Meng B., Martelli G. P., Golino D. A., Fuchs M.) Springer, Cham, Switzerland; str. 561–579. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_27
78. Golino D., Sim S., Rowhani A. (2000). Identification of the latent viruses associated with young vine decline in California. *Proceedings of the 13th Meeting of the ICVG*, 12.–18.03.2000., Adelaide, Australia, str. 85–86.
79. Golino D. A., Sim S.T., Rowhani, A. (2003). The role of rootstock genotype in the effect of single and mixed infections of grapevine viruses. *Proceedings of the 14th Meeting of the ICVG*, 13.-17.09.2003., Locorotondo, Italy, str. 246–247.
80. Golino D. A., Weber E., Sim S. T., Rowhani A. (2008). Leafroll disease is spreading rapidly in a Napa Valley vineyard. *California Agriculture* 62: 156. doi:10.3733/ca.v062n04p156
81. Golino D. A., Wolpert J., Sim S. T., Benz J., Anderson M., Rowhani A. (2009). Virus effects on vine growth and fruit components of Cabernet sauvignon on six rootstocks. *Proceedings of the 16th Meeting of the ICVG*, 31.08.-04.09.2009., Dijon, France, str: 245–246.
82. Golino D. A., Rowhani A., Klaassen V., Sim S. T., Al Rwahnih M. (2015). Grapevine leafroll associated virus 1 effects on different grapevine rootstocks. *Proceedings of the 18th Meeting of the ICVG*, 07.-11.09.2015., Ankara, Turkey.
83. Goszczynski D. E. i Jooste A. E. C. (2003a). Identification of divergent variants of grapevine virus A. *European Journal of Plant Pathology* 109: 397–403. doi:10.1023/A:1023555018700
84. Goszczynski D. E. i Jooste A. E. C. (2003b). Shiraz disease (SD) is transmitted by the malybug *Planococcus ficus* and associated with Grapevine virus A. *Proceedings of the 14th Meeting of the ICVG*, 12.-17.09.2003., Locorotondo, Italy, str. 219.
85. Goszczynski D. E. i Jooste A. E. C. (2003c). Identification of grapevines infected with divergent variants of grapevine virus A using variant-specific RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 112: 157–164. doi:10.1016/s0166-0934(03)00198-8

86. Goszczynski D. E. (2007). Single-strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing of grapevine virus A (GVA) reveal a close association between related molecular variants of the virus and Shiraz disease in South Africa. *Plant Pathology* 56: 755-762. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01624.x
87. Goszczynski D. E. i Habili N. (2012). 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: 205–214. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02499.x
88. Graniti A. i Martelli G. P. (1965). Further investigations on legno riccio (rugose wood), a graft-transmissible stem-pitting of grapevine. *Proceedings of International Conference on Virus and Vector on Perennial Hosts, with special reference to Vitis*, 6.-10.09.1965., Davis, USA, str. 168–179.
89. Gugerli P. (2000). Detection of grapevine leafroll-associated viruses by chemiluminometric enzyme-linked immunosorbent assay (LUMINO-ELISA). *Proceedings of the 13th Meeting of the ICVG*, 12.–18.03.2000., Adelaide, Australia, str. 134–136.
90. Guo Q., Honesty S., Xu M. L., Zhang Y., Schoelz J. E., Qiu W. P. (2014). Genetic diversity, tissue and host specificity of grapevine vein clearing virus. *Phytopathology* 104: 539-547. doi:10.1094/PHYTO-03-13-0075-R
91. Habili N. i Nutter F. W. (1997). Temporal and spatial analysis of grapevine leafroll-associated virus 3 in Pinot Noir grapevines in Australia. *Plant Disease* 81: 625–628. doi:10.1094/pdis.1997.81.6.625
92. Habili N. i Randles J. (2004). Descriptors for grapevine virus A-associated syndrome in Shiraz, Merlot and Ruby Cabernet in Australia, and its similarity to Shiraz disease in South Africa (Nuredin Habili). *The Australian & New Zealand grapegrower & winemaker* 488: 71-74.
93. 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.
94. Hančević K., Saldarelli P., Čarija M., Černi S., Zdunić G., Mucalo A., Radić T. (2021). Predominance and diversity of GLRaV-3 in native vines of Mediterranean Croatia. *Plants* 10: 17. doi:10.3390/plants10010017
95. Hančević K., Čarija M., Radić Brkanac S., Gaši E., Likar M., Zdunić G., Regvar M., Radić T. (2023). Grapevine leafroll-associated virus 3 in single and mixed infections triggers changes in the oxidative balance of four grapevine varieties. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 8. doi:10.3390/ijms24010008

96. Hanson J. M. i French R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* 31: 81–109. doi:10.1146/annurev.py.31.090193.000501
97. Held P. (2001). Nucleic acid purity assessment using A260/A280 ratios. Dostupno na: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/nucleic-acid-purity-assessment-using-a260/a280-ratios/>; pristup: 20.01.2023.
98. Hewitt W. B. (1954). Some virus and virus-like diseases of grapevines. *Bulletin of the California Department of Agriculture* 43: 47–64.
99. Hewitt W. B. i Neja R. (1971). Grapevine bark and wood pitting disease found in California. *Plant Disease Reporter* 55: 860–861.
100. Hohn T., Richert-Poggeler K. R., Harper G., Schwarzacher T., Teo C., Teycheney P.-Y., Iskra-Caruana M.-L., Hull R. (2008). Evolution of integrated plant viruses. U: *Plant virus evolution* (ur. Roosinck M.), Academic Springer, Heidelberg, Germany, str. 54–76.
101. Hommay G., Komar V., Lemaire O., Herrbach E. (2008). Grapevine virus A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni*. *European Journal of Plant Pathology* 121: 185–188. doi:10.1007/s10658-007-9244-3
102. Hommay G., Wiss L., Le Maguet J., Beuve M. Herrbach E. (2012). First results on wind dispersal of *Parthenolecanium corni* crawlers in a newly planted vine plot. *Proceedings of the 17th Meeting of the ICVG, 7.-14.10.2012.*, Davis, CA, USA, 202–203.
103. Hommay G., Beuve M., Herrbach E. (2022). Transmission of grapevine ampelo- and vitiviruses by the Bohemian mealybug *Heliococcus bohemicus* Šulc (*Hemiptera: Pseudococcidae*). *Viruses* 14: 1430. doi:10.3390/v14071430
104. Horvath J., Tobias I., Hunyadi K. (1994). New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus. *HortScience* 26: 31–32.
105. Hu G. J., Dong Y. F., Zhang Z. P., Fan X. D., Fang R., Zhu, H. J. (2014). Detection and sequence analysis of grapevine virus B isolates from China. *Acta Virologica* 58: 180–184. doi:10.4149/av_2014_02_180
106. IBM Corp. (2017). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0, IBM Corp, Armonk, NY, USA. Dostupno na: <https://www01.ibm.com/support/docview.wss?uid=swg21476197>; pristup: 10.02.2022.
107. ICTV (2023a). International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV 2021 Master Species List (MSL37). Dostupno na: <https://ictv.global/msl>; pristup: 02.10.2022.

108. ICTV (2023b). International Committee on Taxonomy of Viruses. *Betaflexiviridae*. Dostupno na: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae; pristup: 15.10.2022.
109. Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Rowhani A. (2003a). Non-*Vitis* hosts of grapevine fanleaf virus and their possible epidemiological significance. Proceedings of the 14th Meeting of the ICVG, 12.–17.09.2003., Locorotondo, Italy, 210 str.
110. Izadpanah K., Zaki-Aghl M., Zhang Y. P., Daubert S. D., Rowhani A. (2003b). Bermuda grass as a potential reservoir host for grapevine fanleaf virus. *Plant Disease* 87: 1179 -1182. doi:10.1094/PDIS.2003.87.10.1179
111. Jagunić M. (2019). Alternativni domaćini uvijenosti lista vinove loze pridruženog virusa 3 i A – virusa vinove loze. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb. Dostupno na: <https://zir.nsk.hr/islandora/object/agr%3A1259>; pristup: 20.10.2022.
112. Jagunić M., Lazarević B., Nikolić K., Stupić D., Preiner D., Vončina D. (2021). Detection, transmission, and characterization of grapevine virus H in Croatia. *Pathogens* 10: 1578. doi:10.3390/pathogens10121578
113. Jo Y., Son M. K., Choi, H., Park J. S., Lee J. W., Lian S., Lee B. C., Cho W. K. (2017). Genome sequence of grapevine virus K, a novel vitivirus infecting grapevine. *Genome Announcements* 14: 5:e00994-17. doi:10.1128/genomeA.00994-17
114. Jones T. (2016). Grapevine viruses and associated vectors in Virginia: survey, vector management, and development of efficient grapevine virus testing methods. Doktorska disertacija. Virginia Polytechnic Institute and State University, SAD. Dostupno na: https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/81460/Jones_TJ_D_2016.pdf?sequence=1; pristup: 06.10.2022.
115. Jones T. i Nita M. (2019). A survey of Virginia vineyards revealed high incidences of grapevine Rupestris stem pitting-associated virus, grapevine red blotch virus, and two mealybug species. *Plant Health Progress* 20: 207–214. doi:10.1094/php-04-19-0026-s
116. Jordan D. (1993). Leafroll spread in New Zealand vineyards. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 8: 322-324.
117. Kahl D. (2021). Evaluation of the grapevine red blotch virus epidemiological landscape of the Okanagan valley. Diplomski rad. University of British Columbia, Kanada. Dostupno na: <https://open.library.ubc.ca/media/stream/pdf/24/1.0398192/4>; pristup: 06.10.2022.
118. Kahl D., Lowery D. T., Hart M., Úrbez-Torres J. R. (2022). Seasonal dynamics and optimal diagnostics of grapevine red blotch virus in a British Columbian vineyard.

- Canadian Journal of Plant Pathology 44: 453–464. doi:10.1080/07060661.2021.1993346
119. Karoglan Kontić J., Preiner D., Šimon S., Zdunić G., Poljuha D. Maletić, E. (2009). Sanitary status of Croatian native grapevine varieties. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74: 99-103.
120. Kearse M., Moir R., Wilson A., Stones-Havas S., Cheung M., Sturrock S., Buxton S., Cooper A., Markowitz S., Duran C., Thierer T., Ashton B., Meintjes P., Drummond A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
121. Klaassen V. A., Sim S. T., Dangl G. S., Osman F., Rwahni M. A., Rowhani A., Golino D. A. (2011). *Vitis californica* and *Vitis californica* × *Vitis vinifera* hybrids are hosts for grapevine leafroll-associated virus-2 and -3 and grapevine virus A and B. *Plant Disease* 95: 657–665. doi:10.1094/pdis-09-10-0621
122. Klechkovskiy Y., Titova L., Palagina O., Janse L. (2022). Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus: express pest risk analysis for Ukraine. *Agricultural Science and Practice* 9: 39-49. doi:10.15407/agrisp9.01.039
123. Komar V., Vigne E., Demangeat G., Fuchs M. (2007). Beneficial effect of selective virus elimination on the performance of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture* 58: 202-210. doi:10.5344/ajev..58.2.202
124. Kominek P. (2002). Selection of RNA isolation method for molecular detection of grapevine viruses. *Plant Protection Science* 38: 267-270. doi:10.17221/10463-PPS
125. Krebelj A. J., Čepin U., Ravnikar M., Novak M. P. (2015). Spatio-temporal distribution of grapevine fanleaf virus (GFLV) in grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 142: 159–171. doi:10.1007/s10658-015-0600-4
126. Krenz B., Thompson J. R., Fuchs M., Perry K. L. (2012). Complete genome sequence of a new circular DNA virus from grapevine. *Journal of Virology* 86: 7715–7715. doi:10.1128/jvi.00943-12
127. Kumar S., Rai R., Baranwal V. K. (2015). Development of an immunocapture–reverse transcription–polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) using modified viral RNA release protocol for the detection of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Phytoparasitica* 43: 311–316. doi:10.1007/s12600-014-0445-y
128. 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: 79–85.

129. Laimer M., Lemaire O., Herrbach E., Goldschmidt V., Minafra A., Wetzel P. B. (2009). Resistance to viruses, phytoplasmas and their vectors in the grapevine in Europe: a review. *Journal of Plant Pathology* 91: 7–23.
130. Lazar J., Kolber M., Lehoczky J. (1990). Detection of some nepoviruses (GFV, GFV-YM, GCMV, ArMV) in the seeds and seedlings of grapevine by ELISA. *Kertgazdasag* 22: 58–72.
131. Le Maguet J., Beuve M., Herrbach E., Lemaire O. (2012). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris*. *Phytopathology* 102: 712–723. doi:10.1094/PHYTO-10-11-0289
132. Lehoczky J. i Tasnady G. (1971). The effect of fanleaf and chrome mosaic virus diseases on yield and the fruit sugar content of grapevine. *Kiserletugyi-Kozlemlenyek* 64: 49–64.
133. Lima M. F., Rosa C., Golino D. A., Rowhani A. (2006). Detection of Rupestris stem pitting-associated virus in seedlings of virus-infected maternal grapevine plants. *Proceedings of the 15th Meeting of ICVG, 3.-7.04.2006., Stellenbosch, South Africa, str. 244–245.*
134. Liu Y. P., Peremyslov V. V., Medina V., Dolja V. V. (2009). Tandem leader proteases of grapevine leafroll-associated virus 2: host-specific functions in the infection cycle. *Virology* 383: 291–299. doi:10.1016/j.virol.2008.09.035
135. Lockhart B. E. L. i Olsweski N. E. (1994). Plant virus badnavirus group. U: *Encyclopedia of virology* (ur. Webster R. G., Granoff A.) Academic Press, New York, USA, str. 139–143.
136. López-Fabuel I., Wetzel T., Bertolini E., Bassler A., Vidal E., Torres L. B., Yuste A., Olmos A. (2013). Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *Journal of Virological Methods* 188: 21–24. doi:10.1016/j.jviromet.2012.11.034
137. Lunden S., Meng B., Avery J. D., Qiu W. P (2009). Characterization of a grapevine vein-clearing complex on Chardonnay. *European Journal of Plant Pathology* 126: 135–144.
138. Maeda K., Kubuchi T., Kasajima I., Li C., Yamagishi N., Yamashita H., Yoshikawa N (2020). Virus-induced flowering by apple latent spherical virus vector: effective use to accelerate breeding of grapevine. *Viruses* 12: 70. doi:10.3390/v12-10070
139. Malenica N., Jagić M., Pavletić B., Bauer N., Vončina D., Zdunić G., Leljak Levanić D. (2020). Somatic embryogenesis as a tool for virus elimination in Croatian indigenous grapevine cultivars. *Acta Botanica Croatica* 79: 26-34. doi:10.37427/botcro-2020-008
140. 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. T. (2015).

- Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze, Državni Zavod za Zaštitu Prirode, Zagreb, Hrvatska. Dostupno na: <https://www.agr.unizg.hr/multimedia/03d1ddc97051e60b1563fce2493453fbee61b34e2ff04f5b3b63481e9ae7e3d6afcf551562585902.pdf>; pristup: 19.09.2022.
141. Maliogka V. I., Martelli G. P., Fuchs M. Katis N. I. (2015a). Control of viruses infecting grapevine. *Advances in Virus Research* 91: 175–227. doi:10.1016/bs.aivir.2014.11.002
 142. Maliogka V. I., Olmos A., Pappi P. G., Lotos L., Efthimiou K., Grammatikaki G., Avgelis A. D. (2015b). A novel grapevine badnavirus is associated with the Roditis leaf discoloration disease. *Virus Research* 203: 47–55. doi:10.1016/j.virusres.2015.03.003
 143. Mannini F., Gerbi V., Credi R. (1998). Heat-treated virus-infected grapevine clones: agronomic and enological modifications. *Acta Horticulture* 473: 155–163. doi:10.17660/ActaHortic.1998.473.17
 144. Mannini F. i Digiario M. (2017). The Effects of viruses and viral diseases on grapes and wine. U: *Grapevine Viruses: molecular biology, diagnostics and management* (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 453–482. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_23
 145. Maree H. J., Fox A., Al Rwahnih M., Boonham N., Candresse T. (2018). Application of HTS for routine plant virus diagnostics: state of the art and challenges. *Frontiers in Plant Science* 9: 1082. doi:10.3389/fpls.2018.01082
 146. 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. doi:10.1007/s00705-019-04500-w
 147. Marković Z., Preiner D., Bošnjak A., Safner T., Stupić D., Andabaka Ž., Maletić E., Chatelet P., Engelmann F., Karoglan Kontić J. (2014). *In vitro* introduction of healthy and virus-infected genotypes of native Croatian grapevine cultivars. *Central European Journal of Biology* 9: 1087-1098. doi:10.2478/s11535-014-0337-7
 148. Marković Z., Preiner D., Stupić D., Andabaka Ž., Šimon S., Vončina D., Maletić E., Karoglan Kontić J., Chatelet P., Engelmann F. (2015). Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis* 54: 247–251. doi:10.5073/vitis.2019.58.71-78
 149. Martelli G. P., Lehoczky J., Quacquarelli A., Sarospataki G. (1967). A disorder resembling “legno riccio” (rugose wood) of grapevine in Hungary. *Phytopathologia Mediterranea* 6: 110–112.

150. Martelli G. P. (1993a). Detection and identifications of specific grapevine diseases or pathogens. U: Graft-transmissible diseases of grapevines – handbook for detection and diagnosis (ur. Martelli G. P.), ICVG, FAO, Rome, Italy, str. 9-75.
151. Martelli G. P. (1993b). Detection and identifications of specific grapevine diseases or pathogens. U: Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis (ur. Martelli G. P.), ICVG, FAO, Rome, Italy, str. 45–53.
152. Martelli G. P. (1993c). Facilities and techniques for identification of diseases and their agents by biological methods. U: Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis (ur. Martelli G. P.), ICVG, FAO, Rome, Italy, str. 157-162.
153. Martelli G. P. (1993d). Facilities and techniques for identification of diseases and their agents by biological methods. U: Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis (ur. Martelli G. P.), ICVG, FAO, Rome, Italy, str. 115-162.
154. Martelli G. P., Candresse T., Namba S. (1994). *Trichovirus*, a new genus of plant viruses. Archives of Virology 134: 451–455. doi:10.1007/BF01310583.
155. Martelli G. P., Minafra A., Saldarelli P. (1997). *Vitivirus*, a new genus of plant viruses. Archives of Virology 142: 1929–1932.
156. Martelli G. P. i Jelkmann W. (1998). Foveavirus, a new plant virus genus. Archives of Virology 142: 1245–1249. doi:10.1007/s007050050372
157. Martelli G. P. i Boudon-Padieu T. (2006). Directory of infectious diseases of grapevine and viruses and virus-like diseases of the grapevine. Bibliographic Report 1998–2004. Options mediterraneennes: serie B: 279.
158. Martelli G. P., Adams M. J., Kreuze J. F., Dolja V. V. (2007). Family *Flexiviridae*: a case of study in virion and genome plasticity. Annual Review of Phytopathology 45: 73–100. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401
159. Martelli G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Journal of Plant Pathology 96: 1–136. doi:10.4454/JPP.V96I1SUP
160. Martelli G. P. (2017). An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. U: Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 31–46. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_2
161. Martelli G.P. (2018). Where grapevine virology is heading to. Proceedings of the 19th Meeting of the ICVG, 9.–12.04.2018., Santiago, Chile, str. 10–15.
162. Masten Milek T. (2009). Štitaste uši (Hemiptera: *Coccoidea*) na vinovoj lozi. Glasilo biljne zaštite 5: 357–368.

163. Matthews R. E. F. (2019). *Diagnosis of plant virus disease* (ur. Matthews R. E. F.), CRC Press, Boca Raton, USA, str. 2.
164. McGovern P. (2003). *Ancient wine: the search for the Origins of Viniculture* (ur. Mondavi R. G.) Princeton University Press, Princeton, New Jersey, United States, str. 1-20. doi:10.1515/9781400849536
165. Meng B., Pang S. Z., Forsline P. L., McFerson J. R., Gonsalves D. (1998). Nucleotide sequence and genome structure of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus 1 reveal similarities to apple stem pitting virus. *Journal of General Virology* 79: 2059–2069. doi:10.1099/0022-1317-79-8-2059
166. Meng B., Johnson, R., Peressini S., Forsline P. L., Gonsalves D. (1999). Rupestris stem pitting-associated virus 1 is consistently detected in vines that are infected with rupestris stem pitting. *European Journal of Plant Pathology* 105: 191–199. doi:10.1023/A:1008771713839
167. Milat V. (2005). Stanje u vinogradarstvu i vinarstvu Republike Hrvatske. *Glasnik zaštite bilja* 6: 5-15.
168. Milne R. G., Conti M., Lesemann D. E., Stellmach G., Tanne E., Cohen J. (1984). Closterovirus-Like particles of two types associated with diseased grapevines. *Journal of Phytopathology* 110: 360–368. doi:10.1111/j.1439-0434.1984.tb00076.x
169. Minafra A. i Hadidi A. (1994). Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *Journal of Virological Methods* 47: 175–187. doi:10.1016/0166-0934(94)90076-0
170. Minafra A., Saldarelli P., Martelli G. P. (1997). Grapevine virus A: nucleotide sequence, genome organization and relationships in the *Trichovirus* genus. *Archives of Virology* 142: 417–423. doi:10.1007/s007050050088
171. Minafra A., Mawassi M., Goszczynski D., Saldarelli P. Grapevine vitiviruses. U: *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 229–256. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_11
172. Mishchenko L. T., Konup L. O., Dunich A. A., Gorobets V. F., Konup A. I., Zaimenko N. V., Kozub N. O., Dashchenko A. V., Chistyakova V. L., Shcherbakova T. O., Sovinska R. S. (2022). First report of grapevine leafroll-associated virus-3 on peony plants in Ukraine. *Journal of Plant Diseases and Protection*. doi:10.1007/s41348-022-00665-w
173. Monette P. L., Godkin S.E., James D. (1990). Mechanical sap transmission of a closterovirus from in vitro shoot tip cultures of a leafroll-affected grapevine to *Nicotiana benthamiana*. *Vitis* 29: 49–55.

174. Morán F., Sossalou C.-L., Canales C., Maliogka V. I., Olmos A., Ruiz-García A. B. (2020). Specific real-time PCR for the detection and absolute quantitation of grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus, an EPPO alert pathogen. *Plants* 9: 1151. doi:10.3390/plants9091151
175. Mudge K., Janick J., Scofield S., Goldschmidt E. E. (2009). A history of grafting. U: *Horticultural Reviews* (ur. Janick J.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, United States, str. 35: 437–493.
176. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51: 263–273. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032
177. Mullins M. G. (1992). The grapevine and its relatives. U: *Biology of the grapevine* (ur. Bouquet A., Williams L. E.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, str. 29-31.
178. Myles S., Boyko A. R., Owens C. L., Brown P. J., Grassi F., Aradhya M. K., Prins B., Reynolds A., Chia J.-M., Ware D., Bustamante C. D., Buckler E. S. (2011). Genetic structure and domestication history of the grape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 3530-5. doi:10.1073/pnas
179. Nakano M., Nakaune R., Komazaki S. (2003). Mealybug transmission of grapevine viruses in Japan. *Extended Abstracts of the 14th Meeting of the ICVG*, 13.-17.09.2003., Locorotondo, Italy, p. 218.
180. Nakaune R., Toda S., Mochizuki M., Nakano M. (2008). Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Archives of Virology* 153: 1827–1832. doi:10.1007/s00705-008-0188-5
181. Nassuth A., Pollari E., Helmeczy K., Stewart S., Kofalvi S. A. (2000). Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *Journal of Virological Methods* 90: 37–49. doi:10.1016/s0166-0934(00)00211-1
182. NN (2019) Narodne novine. Zakon o vinu (NN 32/2019). Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2019_03_32_641.html; pristup: 12.11.2022.
183. NN (2021). Narodne novine. Zakon o sjemenu, sadnom materijalu i priznavanju sorti poljoprivrednog bilja (NN 110/21). Dostupno na: <https://www.zakon.hr/z/774/Zakon-o-sjemenu%2C-sadnom-materijalu-i-priznavanju-sorti-poljoprivrednog-bilja>; pristup: 12.11.2022.
184. Nölke G., Cobanov P., Uhde-Holzem K., Reustle G., Fischer R., Schillberg S. (2009). grapevine fanleaf virus (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and arabis mosaic

- virus (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* 10: 41–49. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00510.x
185. OIV (2022). International Organisation of Vine and Wine. State of the world vine and wine sector 2021. Dostupno na: https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/ENG_State%20of%20the%20world%20vine%20and%20wine%20sector%20April%202022%20v6.pdf; pristup: 15.01.2023.
186. Olmo H. P. (1996). The origin and domestication of the *Vinifera* grape. U: The rigins and ancient history of wine (ur. McGovern P., Fleming S. J., Katz S. H.), Routledge, London, United Kingdom, str. 5-10.
187. Orfanidou C. G., Moraki K., Panailidou P., Lotos L., Katsiani A., Avgelis A., Katis N. I., Maliogka V. I. (2021). Prevalence and genetic diversity of viruses associated with rugose wood complex in Greek vineyards. *Plant disease* 105: 3677–3685. doi: 10.1094/PDIS-02-21-0266-RE
188. Osman F. i 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: 130–136. doi:10.1016/j.jviromet.2005.11.0
189. Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. (2007). Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of grapevine leafroll associated viruses 1–5 and 9. *Journal of Virological Methods* 141: 22–29. doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.03
190. Osman F. i Rowhani A. (2008). Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays for the detection of viruses associated with Rugose wood complex of grapevine. *Journal of Virological Methods* 154: 69–75. doi:10.1016/j.jviromet.2008.09.00
191. Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. (2008). Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan® RT-PCR in detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods* 149: 292-299. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.012
192. Osman F., Olineka T., Hodzic E., Golino D., Rowhani A. (2012). Comparative procedures for sample processing and quantitative PCR detection of grapevine viruses. *Journal of Virological Methods* 179: 303–310. doi:10.1016/j.jviromet.2011.11.00
193. Osman F., Hodzic, E., Omanska-Klusek A., Olineka T., Rowhani A. (2013). Development and validation of a multiplex quantitative PCR assay for the rapid detection of grapevine virus A, B and D. *Journal of Virological Methods* 194: 138–145. doi:10.1016/j.jviromet.2013.07.046
194. Panjan M. i Šarić A. (1963). Serološka dijagnostika arabis mozaik virusa iz vinove loze i trešnje gel-difuzionom metodom. *Agronomski glasnik* 3: 204-206.

195. Pathirana R. i McKenzie M. J. (2005). A modified green-grafting technique for large-scale virus indexing of grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Scientia Horticulturae* 107: 97–102. doi:10.1016/j.scienta.2005.06.002
196. Perrone I., Chitarra W., Boccacci P., Gambino G. (2017). Grapevine–virus–environment interactions: an intriguing puzzle to solve. *The New Phytologist* 213: 983–987. doi:10.1111/nph.14271
197. Pesqueira A. M., Garcia-Berrios J. J., Barrasa M., Cabaleiro C. (2012). Economic impact of leafroll disease in vineyards of the cultivar Albariño in Rias Baixas (Spain). *Proceedings of the 17th Meeting of the ICVG, 7.-14.10.2012., Davis, CA, USA, str. 57–58.*
198. Petersen S., Keith C., Austin K., Howard S., Su L., Qiu W. (2019). A natural reservoir and transmission vector of grapevine vein clearing virus. *Plant Disease* 103: 571–577. doi:10.1094/PDIS-06-18-1073-RE
199. Pietersen G., Spreeth N., Oosthuizen T., Van Rensburg A., Van Rensburg M., Lottering D., Rossouw N., Tooth D. (2013). A case study of control of grapevine leafroll disease spread at a commercial wine estate in South Africa. *American Journal of Enology and Viticulture* 64: 296–305. doi: 0.5344/ajev.2013.12089
200. Poljuha D., Sladonja B., Peršurić D. (2004). Survey of five indigenous Istrian cultivars for presence of six grape viruses. *American Journal of Enology and Viticulture* 55: 286-287. doi:10.5344/ajev.2004.55.3.286
201. Poljuha D., Sladonja B., Bubola M. (2010). Incidence of viruses infecting grapevine varieties in Istria (Croatia). *Journal of Food, Agriculture & Environment* 8: 166- 169.
202. Powell K. S., Cooper P. D., Forneck A. (2013). The Biology, physiology and host–plant interactions of grape phylloxera *daktulosphaira vitifoliae*. *Advances in Insect Physiology* 45: 159-218. doi:10.1016/B978-0-12-417165-7.00004-0
203. Preiner D., Cibilić I., Karoglan Kontić J., Marković Z., Maletić E. (2010). Utjecaj zaraze virusom uvijenosti lista tip 3 na ampelografske karakteristike sorte Grk (*V. vinifera* L.). *Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma, 15.-19.02.2010., Opatija, Hrvatska, str. 1188-1192.*
204. Qiu W. P., Avery J. D., Lunden S. (2007). Characterization of a severe virus-like disease in Chardonnay grapevines in Missouri. *Plant Health Progress* 8. doi:10.1094/PHP-2007-1119-01-BR
205. Qiu W. i Schoelz J. (2017). Grapevine vein clearing virus: diagnostics, genome, genetic diversity, and management. U: *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 315–330. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_15

206. Qiu W., Petersen S., Howard S. (2020). North American grape "Norton" is resistant to grapevine vein clearing virus. *Plant Disease* 104: 2051–2053. doi:10.1094/pdis-10-19-2161-sc
207. Rakhshandehroo F., Pourrahim R., Zamani Zadeh H., Rezaee S., Mohammadi M. (2005). Incidence and distribution of viruses infecting Iranian vineyards. *Journal of Phytopathology* 153: 480–484. doi:10.1111/j.1439-0434.2005.01006.x
208. Rantsiou K., Giacosa S., Pugliese M., Englezos V., Ferrocino I., Río Segade S., Monchiero M., Gribaudo I., Gambino G., Gullino M. L., Rolle L. (2020). Impact of chemical and alternative fungicides applied to grapevine cv Nebbiolo on microbial ecology and chemical-physical grape characteristics at harvest. *Frontiers in Plant Science* 11. doi:10.3389/fpls.2020.00700
209. Read D. A., Thompson G. D., Cordeur N. L., Swanevelder D., Pietersen G. (2022). Genomic characterization of grapevine viruses N and O: novel vitiviruses from South Africa. *Archives of Virology* 167: 611–614. doi:10.1007/s00705-021-05333-2
210. Reynolds A. G., Lanterman W. S., Wardle D. A. (1997). Yield and berry composition of five *Vitis* cultivars as affected by Rupestris stem pitting virus. *American Journal of Enology and Viticulture* 48: 449–458. doi:10.5344/ajev.1997.48.4.449
211. Reynolds A. G. (2017). The grapevine, viticulture and winemaking: a brief introduction. U: *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 3–29. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_1
212. Ricketts K. D., Gomez M. I., Atallah S. S., Fuchs M. F., Martinson T. E., Battany M. C., Bettiga L.J., Cooper M. L., Verdegaal P. S., Smith R. J. (2015). Reducing the economic impact of grapevine leafroll disease in California: identifying optimal disease management strategies. *American Journal of Enology and Viticulture* 66: 138–147. doi:10.5344/ajev.2014.14106
213. Rosciglione B., Castellano M. A., Martelli G. P., Savino V., Canizzaro G. (1983). Mealybug transmission of grapevine virus A. *Vitis* 22: 331–347.
214. Rowhani A., Walker M. A., Rokni S. (1992). Sampling strategies for the detection of grapevine fanleaf virus and the grapevine strain of tomato ringspot virus. *Vitis* 31: 35–44. doi:10.5073/vitis.1992.31.35-44
215. Rowhani A., Chay C., Golino D.A., Falk B.W. (1993). Development of a polymerase chain-reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology* 83: 749–753. doi:10.1094/Phyto-83-749.
216. Rowhani A., Biardi L., Johnson R., Saldarelli P., Zhang Y. P., Chin J., Green M. (2000). Simplified sample preparation method and one-tube RT-PCR for grapevine

- viruses. Proceedings of the 13th Meeting of the ICVG, 12.–18.03.2000., Adelaide, Australia, str. 148.
217. Rowhani A., Uyemoto J. K., Golino D. A., Daubert S. D., Al Rwahnih M. (2017a). Viruses Involved in graft incompatibility and decline. U: Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 289-302. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_13
218. Rowhani A., La Notte P., Uyemoto J. K., Daubert S. D., Savino V. (2017b). Biological assays. U: Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 395–407. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_20
219. Rowhani A., Osman F., Daubert S. D., Al Rwahnih M., Saldarelli P. (2017c). Polymerase chain reaction methods for the detection of grapevine viruses and viroids. U: Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 431–450. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_22
220. Rowhani A., Daubert S., Arnold K., Al Rwahnih M., Klaassen V., Golino D., Uyemoto J. K. (2018). Synergy between grapevine vitiviruses and grapevine leafroll viruses. *European Journal of Plant Pathology* 151: 919–925. doi:10.1007/s10658-018-1426-7
221. Rüdell, M. (1985). Grapevine damage induced by particular virus-vector combinations. *Phytopathologia Mediterranea* 24: 183–85.
222. Rumbos I. C. i Avgelis A. D. (1989). Roditis leaf discoloration – a new virus disease of grapevine: symptomatology and transmission to indicator plants. *Journal of Phytopathology* 125: 274–278. doi:10.1111/j.1439-0434.1989.tb01070.x
223. Rumbos I. C. i Avgelis A. D. (1993). Further investigations on Roditis leaf discoloration disease. Proceedings of the 11th Meeting of the ICVG, 5.-10.09.1993., Montreux, Switzerland, 76 str.
224. Sabaghian S., Rakhshandehroo F., Zamanizadeh H. R., Elbeaino T. (2021). Biological, epidemiological and population structure analyses of vitiviruses in Iran. *European Journal of Plant Pathology* 159: 117–129. doi:10.1007/s10658-020-02147-x
225. Saldarelli P., Minafra A., Martelli G.P. (1996). The nucleotide sequence and genomic organization of grapevine virus B. *Journal of General Virology* 10: 2645-52. doi:10.1099/0022-1317-77-10-2645
226. Saldarelli P., Rowhani A., Routh G., Minafra A., Digiaro M. (1998). Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous

- viruses, with special reference to clostero- and vitiviruses of the grapevine. *European Journal of Plant Pathology* 104: 945–950. doi:10.1023/a:1008608506699
227. Saldarelli P., Giampetruzzi A., Morelli M., Malossini U., Pirolo C., Bianchedi P., Gualandri V. (2015). Genetic variability of grapevine Pinot gris virus and its association with grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology* 105: 555–563. doi:10.1094/PHYTO-09-14-0241-R
228. Saldarelli P., Giampetruzzi A., Maree H. J., Rwahni A. (2017). High throughput sequencing: advantages beyond virus identification. U: *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management* (ur. Baozhong M., Giovanni P. M., Deborah A. G., Marc F.), Springer, Cham, Switzerland, str. 625–642. doi:10.1007/978-3-319-57706-7_30
229. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463–5467.
230. Savino V., Boscia D., Musci D., Martelli G. P. (1985). Effect of legno riccio (stem pitting) on 'Italia' vines grafted onto rootstocks of different origin. *Phytopathologia Mediterranea* 24: 68–72.
231. Savino V., Boscia D., Martelli G. P. (1987). Rugose wood complex of grapevine: can grafting to *Vitis* indicators discriminate between diseases? *Proceedings of the 9th Meeting of the ICVG, 09.-12.04., Kiryat Anavim, Israel, str., 91–94.*
232. Schoelz J., Volenberg D., Adhab M., Fang Z., Klassen V., Spinka C., Rwahni M. A. (2020). A survey of viruses found in grape-vine cultivars grown in Missouri. *American Journal of Enology and Viticulture* 72: 73–84. doi:10.5344/ajev.2020.20043
233. Sefc K. M., Leonhardt W., Steinkellner H. (2000). Partial sequence identification of grapevine leafroll-associated virus-1 and development of a highly sensitive IC-RT-PCR detection method. *Journal of Virological Methods* 86: 101–106. doi:10.1016/S0166-0934(00)00135-X
234. Setiono F. J., Chatterjee D., Fuchs M., Perry K. L., Thompson J. R. (2018). The distribution and detection of grapevine red blotch virus in its host depends on time of sampling and tissue type. *Plant Disease* 102: 2187-2193. doi:10.1094/pdis-03-18-0450-re
235. Shabanian M., Xiao H., Meng B. (2020). Seasonal dynamics and tissue distribution of two major viruses associated with grapevine leafroll under cool climate condition. *European Journal of Plant Pathology* 158: 1017–1031. doi:10.1007/s10658-020-02137-z
236. Silva J. M. F., Melo F. L., Elena S. F., Candresse T., Sabanadzovic S., Tzanetakis I. E., Blouin A. G., Villamor D. E. V., Mollov D., Constable F., Cao M., Saldarelli P., Cho

- W. K., Nagata T. (2022). Virus classification based on in-depth sequence analyses and development of demarcation criteria using the *Betaflexiviridae* as a case study. *Journal of General Virology* 103. doi:10.1099/jgv.0.001806.
237. Singleton V. L. (1996). An enologist's commentary on ancient wine. U: *The origins and ancient history of wine* (ur. McGovern P. E., Fleming S. J., Katz S. H.), Gordon and Breach, Amsterdam, Netherlands, str. 67–77.
238. Šarić A. i Corte A. (1959). Sintomatologia della degenerazione infettiva della vite in Istria. *Atti Ist. Bot. Lab Crit Univ Pavia* 17: 3-8
239. Šarić Sabadoš A. i Corte A. (1959). Dati preliminari su una forma di "degenerazione infettiva" della vite in Istria a complesso sintomatologico insolito. *Atti Ist Bot Univ Pavia* 17: 268-273.
240. Šarić A. (1960). Degeneracija loze u Istri. *Biljna zaštita* 1: 3-5.
241. Šarić A. i Hranueli T. (1977). Istraživanje virusnih bolesti loze u SR Hrvatskoj. *Proceedings of Symposium on Ekskoriosis in vine*, Mostar, Bosnia and Herzegovina, str.149-151.
242. Šarić A. i Korošec-Koruza Z. (1991). Occurrence and spread of viruses associated with leafroll (GLR) and stem pitting (GSP) diseases in north-western part of Yugoslavia. *Proceedings of the 10th Meeting of the ICVG*, 03.-07.09.1990., Volos, Greece, str. 416.
243. Tamura K., Stecher G., Kumar S. (2021). MEGA 11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022–3027. doi:10.1093/molbev/msab120
244. Tanne E., Ben-Dov Y., Raccah B. (1993). Mealybug transmission of corky bark disease and an associated virus to healthy grapevine. *Proceedings of the 11th Meeting of ICVG*, 5.-10.09.1993., Montreux, Switzerland, str. 59–60.
245. Thermofischer.com (2019a). TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix. User guide for one-step RT-PCR of viral nucleic acid. Dostupno na: <https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0028278TaqManFastVirus1StepMM-UG-RUO.pdf>; pristup: 20.12.2019.
246. Thermofischer.com (2019b). TaqMan® multiplex PCR optimization. For optimization of multiplex PCR using 7500/7500 Fast, ViiA™ 7, and QuantStudio™ Real-Time PCR Systems. Dostupno na: https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/taqman_optimization_man.pdf; pristup: 20.12.2019.
247. Thermofischer.com (2019c). T042- technical bulletin. NanoDrop Spectrophotometers. 260/280 and 260/230 Ratios. Dostupno na: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf; pristup: 20.01.2023.

248. Thompson J., Fuchs M., McLane H., Celebi-Toprak F., Fischer K. F., Potter J. L., Perry K. L. (2014). Profiling viral infections in grapevine using a randomly primed reverse transcription-polymerase chain reaction/microarray multiplex platform *Phytopathology* 104: 211–219. doi:10.1094/PHYTO-06-13-0166-R
249. Tomažić I., Petrović N., Korošec-Koruza Z. (2005). Effects of rugose wood and GLRaV-1 on yield of cv. 'Refošk' grapevine. *Acta Agriculturae Slovenica* 85: 91–96.
250. Topolovec-Pintarić S. (1990). Analize vinove loze na prisustvo virusa Elisa metodom u rasadniku Jastrebarsko (Mladina). Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
251. Tsai C. W., Daugherty M. P., Almeida R. P. P. (2011). Seasonal dynamics and virus translocation of grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. *Plant Pathology* 61: 977–985. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02571.x
252. Tukey J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics* 5: 99–114.
253. Uhls A., Petersen S., Keith C., Howard S., Bao X., Qiu W. (2021). Grapevine vein clearing virus is prevalent and genetically variable in grape aphid (*Aphis illinoisensis* Shimer) populations. *Plant Disease* 105: 1531–1538. doi:10.1094/pdis-10-20-2176-re
254. Ulubaş Serçe Ç., Altan B., Bolat V., Ayyaz M., Çifçi O., Önder S., Öztürk Gökçe Z. N., Maliogka V. I. (2018). First Report of grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus infecting grapevine (*Vitis vinifera*) in Turkey. *Plant Disease* 2: 256. doi:10.1094/PDIS-06-17-0927-PDN
255. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115. doi:10.1093/nar/gks596
256. Uyemoto J. K. i Rowhani, A. (2003). Discovery of different grapevine sources with graft-transmissible agents causing union-incompatibility on sensitive rootstocks. Proceedings of the 14th Meeting of the ICVG, 13.-17.09.2003., Locorotondo, Italy, str. 39–141.
257. Varsani A., Roumagnac P., Fuchs M., Navas-Castillo J., Moriones E., Idris I., Briddon R. W., Rivera-Bustamante R., Murilo Zebrini F., Martin D. P. (2017). *Capulavirus* and *Grablovirus*: two new genera in the family *Geminiviridae*. *Archives of Virology* 162: 1819–1831. doi:10.1007/s00705-017-3268-6
258. Vončina D., Simon S., Dermić E., Cvjetković B., Pejić I., Maletić E., Karoglan Kontić J. (2010). Distribution and partial molecular characterization of Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2) found in Croatian autochthonous grapevine (*Vitis*

- vinifera* L.) germplasm. Journal of Plant Diseases and Protection 117: 194–200. doi:10.1007/bf03356360
259. Vončina D., Zdunić G., Mihaljević M., Hančević K., Budić-Leto I., Cvjetković B. (2011a). Presence of viruses in the population of rare grapevine cultivar 'Dobričić' (*Vitis vinifera* L.) in the Croatian coastal region. Glasilo Biljne Zaštite 11: 343-352.
260. Vončina D., Šimon S., Đermić E., Cvjetković B., Pejić I., Maletić E., Karoglan Kontić J. (2011b). Differential properties of grapevine virus B isolates from Croatian autochthonous cultivars. Journal of Plant Pathology 93: 283–89.
261. Vončina D., Al Rwahnih M., Rowhani A., Gouran M., Almeida R. P. P. (2017). Viral diversity in autochthonous Croatian grapevine cultivars. Plant Disease 101: 1230–1235. doi:10.1094/pdis-10-16-1543-re
262. Vončina D., Almeida, R. P. P. (2018) Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals multitude of viruses including novel ones. Archives of Virology 163: 2239–2243. doi:10.1007/s00705-018-3850-6
263. Vončina D., Preiner D., Šimon S., Cvjetković B., Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J. (2019). Distribution of nine viruses in Croatian autochthonous grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Dalmatian region included in clonal selection. Journal of Central European Agriculture 20: 262–273. doi:10.5513/jcea01/20.1.2008
264. Vončina D., Diaz-Lara A., Preiner D., Al Rwahnih M., Stevens K., Jurić S., Malenica N., Šimon S., Meng B., Maletić E., Fulgosi H., Cvjetković B. (2022). Virus and virus-like pathogens in the Grapevine Virus Collection of Croatian autochthonous grapevine cultivars. Plants 11: 1485. doi:10.3390/plants11111485
265. Vuittenez A. J., Rüdell K. M., Brückbauer H. (1970). Detection and serological study of strawberry latent ringspot, tomato black ring and raspberry ringspot in grapevines from the Palatinate. Annales de Phytopathologie 2: 279–327.
266. Wallingford A. K., Fuchs M. F., Martinson T., Hesler S., Loeb G. M. (2015). Slowing the spread of grapevine leafroll-associated viruses in commercial vineyards with insecticide control of the vector *Pseudococcus maritimus* (Hemiptera: Pseudococcidae). Journal of Insect Science 15: 112. doi:10.1093/jisesa/iev094
267. Wan Y., Schwaninger H., Li D., Simon C. J., Wang Y., He P. (2008). The ecogeographic distribution of wild grape germplasm in China. Vitis 47: 77-80. doi:10.5073/vitis.2008.47.77-80
268. Wen J. (2007). *Vitaceae*. U: The families and genera of vascular plants (ur. Kubitzki K.), Springer, Berlin, Germany, str. 467–479.
269. Wu Q., Habili N., Constable F., Al Rwahnih M., Goszczynski D. E., Wang Y., Pagay V. (2020). Virus pathogens in Australian vineyards with an emphasis on Shiraz disease. Viruses 12: 818. doi:10.3390/v12080818

270. Xiao H., Kim W S., Meng B. (2015). A highly effective and versatile technology for the isolation of RNAs from grapevines and other woody perennials for use in virus diagnostics. *Virology Journal* 12: 171. doi:10.1186/s12985-015-0376-3
271. Zakiaghi M., Izadpanah K., Gholampour Z., Kargar M., Mehrvar M. (2015). Molecular characterization of grapevine fanleaf virus from non-*Vitis* hosts. Proceedings of the 18th Meeting of the ICVG, 7.–11.09.2015., Ankara, Turkey, str. 149–150.
272. Zdravaloza (2022). Zdrava vinova loza. Patent Prirodoslovnog matematičkog fakulteta u Zagrebu za ozdravljivanje vinove loze od virusa. Dostupno na: <https://zdravaloza.biol.pmf.hr/>; pristup: 14.01.2023.
273. Zdunić G., Maletić E., Vokurka A., Karoglan Kontić J., Pezo I. i Pejić I. (2007). Phenotypical, sanitary and ampelometric variability within the population of cv. Plavac mali (*Vitis vinifera* L.). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 72: 117-128.
274. Zdunić G., Hančević K., Sladonja B., Poljuha D., Hartl-Musinov D., Budić-Leto I., Bućan L., Pezo I. (2008). Ampelographic characterization and sanitary status of grapevine cultivar 'Prč bijeli' (*Vitis vinifera* L.). *Agriculturae Conspectus Scientificus* 73: 85-88.
275. Zdunić G., Šimon S., Maletić E., Vončina D., Budić-Leto I., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2009). Conservation and valorization of genetic diversity within the population of cv. Plavac mali (*Vitis Vinifera* L.). Proceedings of the 16th International GiESCO Symposium, 12.-15.07.2009., Davis, USA, str. 547-551.
276. Zhang Y., Singh K., Kaur R., Qiu W. (2011). Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology* 101: 1081–1090. doi:10.1094/PHYTO-02-11-0034
277. Zhang C. W., Huang H. Q., Huang W. T., Li H. W., Chi H., Cheng Y. Q. (2022). Grapevine leafroll-associated virus 2 and grapevine 'Pinot gris' virus are present in seedlings developed from seeds of infected grapevine plants. *Vitis* 61: 21–25. doi: 10.5073/vitis.2022.61.21-25
278. 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: 195. doi:10.3390/agriculture8120195
279. Zorloni A., Prati S., Bianco P., Belli G. (2006). Transmission of grapevine virus A and Grapevine leafroll-associated virus 3 by *Heliococcus bohemicus*. *Journal of Plant Pathology* 88: 325–328. doi:10.1093/jee/tow120.
280. Zrnić E. (2021) Ekonomski značajni virusi vinove loze u kolekciji autohtonih sorata vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina Zagreb. Diplomski Rad. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb. Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:204098>; pristup: 10.11.2022.

ŽIVOTOPIS AUTORA

Martin Jagunić rođen je 9. studenoga 1995. godine u Zagrebu, Hrvatska. Osnovnoškolsko obrazovanje započinje u područnoj školi Plešivica, a nastavlja i završava u Osnovnoj školi Ljubo Babić u Jastrebarskom. Srednju školu upisuje u istom gradu, smjer Opća gimnazija, gdje je maturirao 2014. godine.

Preddiplomski studij Zaštita bilja na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, upisuje 2014. godine. Studij završava 2017. godine obranom završnog rada naslova: „Zbrinjavanje ambalaže utrošenih sredstava za zaštitu bilja“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Aleksandra Mešića (Zavod za poljoprivrednu zoologiju), čime stječe titulu univ. bacc. ing. agr. Iste godine upisuje diplomski studij Fitomedicina (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet). Titulu mag. ing. agr. stječe obranom diplomskog rada naslova „Alternativni domaćini uvijenosti lista vinove loze pridruženog virusa 3 i A-virusa vinove loze“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Darka Vončine (Zavod za fitopatologiju). Iste je godine zaposlen na Agronomskom fakultetu u svojstvu asistent/doktorand u sklopu programa Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) *Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti*, gdje svoja istraživanja provodi u sklopu HRZZ projekta „Ekologija i karakterizacija dva nova virusa vinove loze“, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Darka Vončine (Zavod za fitopatologiju). Iste godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Poljoprivredne znanosti na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Kao izvođač vježbi i seminara na preddiplomskim i diplomskim studijima bio je suradnik na 9 modula: *Biljni virusi prenosivi vektorima* (hrvatski i engleski), *Bolesti vinove loze*, *Molekulame tehnike u fitopatologiji* (hrvatski i engleski), *Osnove fitomedicine*, *Epidemiologija biljnih bolesti*, *Fitobakteriologija i fitovirologija*, *Štetni organizmi energetskih kultura*, *Sustavi suzbijanja štetnih organizama* i *Digitalni sustavi u poljoprivredi*. Martin Jagunić autor je ili koautor 6 znanstvenih radova citiranih u WoS bazi podataka i 5 kongresnih priopćenja.

Znanstvene publikacije

Schianchi N., Flore S., **Jagunić M.**, Serra S., Prota V. A., Vončina D. (2022). Identification of grapevine virus G and grapevine virus H in Sardinia, Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 61: 505-511. doi:10.36253/phyto-13619

Jagunić M., De Stradis A., Preiner D., La Notte P., Al Rwahnih M., Almeida R. P. P., Vončina D. (2022). Biology and ultrastructural characterization of grapevine badnavirus 1 and grapevine virus G. *Viruses* 14: 2695. doi:10.3390/v14122695

Jagunić M., Diaz-Lara A., Szőke L., Rwahnih M. A., Stevens K., Zdunić G., Vončina D. (2022). Incidence and genetic diversity of grapevine virus G in Croatian vineyards. *Plants* 11: 2341. doi:10.3390/plants11182341

Jagunić M., Diaz-Lara A., Rwahnih M. A., Preiner D., Stevens K., Zdunić G., Hwang M., Vončina, D. (2022). Grapevine badnavirus 1: detection, genetic diversity, and distribution in Croatia. *Plants* 11: 2135. doi:10.3390/plants11162135

Čarija M., Radić T., Černi S., Mucalo A., Zdunić G., Vončina D., **Jagunić M.**, Hančević K. (2022). Prevalence of virus infections and GLRaV-3 genetic diversity in selected clones of Croatian indigenous grapevine cultivar Plavac Mali. *Pathogens* 11: 176. doi:10.3390/pathogens11020176

Jagunić M., Lazarević B., Nikolić K., Stupić D., Preiner D., Vončina D. (2021). Detection, transmission, and characterization of grapevine virus H in Croatia. *Pathogens* 10: 1578. doi:10.3390/pathogens10121578

Kongresna priopćenja

Jagunić M., Diaz Lara A., Al Rwahnih M., Preiner D., Zdunić G., Almeida R. P. P., Vončina, D. (2022). Učestalost pojave, djelomična molekularna karakterizacija te načini prijenosa G-virusa vinove loze. Zbornik sažetaka 57. hrvatskog i 17. međunarodnog simpozija agronoma, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, 19.-24.06.2022., Vodice, Hrvatska, str. 323-324.

Vončina D., **Jagunić M.**, Diaz-Lara A., De Stradis A., Preiner D., Zdunić G., Almeida R. P. P., Al Rwahnih M. (2022). Rasprostranjenost, karakterizacija i prijenos badnavirusa vinove loze 1. Zbornik sažetaka 57. hrvatskog i 17. međunarodnog simpozija agronoma, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, 19.-24.06.2022., Vodice, Hrvatska, str. 284-285.

Jagunić M., Diaz-Lara A., Al Rwahnih M., La Notte P., Vuletin A., Vončina D. (2021). Kaštela i otok rava – izvori dva nova virusa vinove loze. Zbornik sažetaka 56. hrvatskog i 16. međunarodnog simpozija agronoma, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, 05.-10.09.2021., Vodice, Hrvatska, str. 299-300.

Vončina D. i **Jagunić, M.** (2021). Viroze vinove loze – nove spoznaje i stanje u Hrvatskoj. 31. međunarodni susret vinogradara i vinara – Sabatina, Zadružni savez Dalmacije, 04.-07.11.2020., Cavtat, Hrvatska.

Jagunić M. i Vončina, D. (2020). Viroze vinove loze – često zanemaren vinogradarski problem. E-Zbornik radova – Panel znanstveno-stručni skup o vinogradarstvu i vinarstvu 30. međunarodnog susreta vinogradara i vinara – Sabatina, Zadružni savez Dalmacije, 02.-07.11.2020., Split, Hrvatska.

PRILOZI

Prilog 1. Spektrofotometrijska očitavanja koncentracije i čistoće izolirane RNA i DNA iz rozgvi (R) i peteljki listova (P) biljaka podrijetlom iz zbirke virusa vinove loze (SZAF).

R.br.	Oznaka biljke	Biljni materijal	RNA		DNA		
			Koncentracija (ng/μl)	Čistoća A260/280	Biljni materijal	Koncentracija (ng/μl)	Čistoća A260/280
1	VB-132	R	19,60	1,26	P	10,50	1,62
2	VB-135	R	16,00	1,60	P	26,00	1,68
3	ZAG-006	R	8,00	1,43	P	23,50	1,68
4	PUŠ-1	R	4,80	1,50	P	15,50	1,82
5	PUŠ-4	R	9,60	1,85	P	23,00	1,84
6	PUŠ-5	R	6,40	1,78	P	33,50	1,68
7	PUŠ-2	R	9,20	1,77	P	26,50	1,47
8	PUŠ-3	R	9,20	1,53	P	6,50	2,17
9	VUG-066	R	6,40	1,46	P	11,50	2,09
10	VUG-112	R	8,40	1,50	P	9,00	1,80
11	VUG-116	R	6,40	1,60	P	11,50	1,77
12	VUG-117	R	6,40	1,60	P	18,50	1,85
13	VUG-107	R	6,80	1,70	P	15,50	1,82
14	VUG-126	R	11,60	1,32	P	24,00	1,85
15	VUG-092	R	5,20	1,86	P	26,50	1,83
16	VUG-115	R	7,60	1,90	P	6,00	2,00
17	VUG-064	R	7,60	1,90	P	11,00	1,83
18	VD-101	R	15,20	1,65	P	4,50	2,25
19	VB-104	R	15,60	1,77	P	10,50	1,91
20	VB-105	R	23,20	1,81	P	35,50	1,78
21	POŠ-016	R	6,00	1,50	P	20,00	1,54
22	POŠ-022	R	5,20	1,30	P	4,00	1,33
23	POŠ-007	R	8,80	1,57	P	5,50	1,57
24	POŠ-051	R	11,20	1,47	P	9,50	1,58
25	POŠ-009	R	10,40	1,37	P	4,00	2,00
26	POŠ-012	R	7,60	1,73	P	43,50	1,48
27	POŠ-001	R	6,00	1,50	P	12,50	1,67
28	POŠ-046	R	7,20	1,64	P	5,00	1,67
29	POŠ-048	R	5,60	1,40	P	6,50	1,44
30	VN-116	R	18,00	1,61	P	4,50	1,50
31	VN-103	R	13,60	1,62	P	10,00	1,67
32	VN-108	R	9,20	1,64	P	4,00	2,00
33	VN-104	R	20,40	1,82	P	5,00	1,43
34	VN-120	R	6,40	1,78	P	15,50	1,63
35	VN-107	R	6,80	1,42	P	4,00	1,60
36	VN-124	R	9,20	1,53	P	8,50	1,89
37	POŠ-076	R	8,00	1,43	P	12,50	1,67
38	POŠ-080	R	11,20	1,56	P	13,50	1,69
39	POŠ-075	R	10,40	1,30	P	5,50	1,83
40	POŠ-084	R	12,80	1,28	P	14,50	1,81
41	POŠ-064	R	8,40	1,50	P	6,50	1,86
42	POŠ-069	R	6,80	1,55	P	8,50	1,55
43	POŠ-059	R	9,60	1,71	P	2,50	2,50
44	POŠ-066	R	8,00	1,67	P	12,50	1,79
45	POŠ-077	R	4,80	1,71	P	8,00	1,78
46	VLJ-178	P	4,00	2,00	P	22,50	1,88
47	POŠ-056	R	6,00	1,50	P	10,50	1,75
48	VG-112	R	9,20	1,77	P	7,50	1,67
49	VVL-122	R	2,00	1,25	P	6,00	2,00
50	VVL-114	R	5,60	1,75	P	5,50	1,83
51	VVL-135	R	6,40	1,60	P	7,50	1,88
52	VVL-123	R	8,40	1,75	P	4,50	1,80
53	VVL-125	R	8,00	1,82	P	7,50	1,88
54	VVL-134	R	4,80	1,71	P	12,50	1,67

Prilog 1. Nastavak

R.br.	Oznaka biljke	Biljni materijal	RNA		DNA		
			Koncentracija (ng/ μ L)	A260/280	Biljni materijal	Koncentracija (ng/ μ L)	A260/280
55	VVL-131	R	3,20	1,60	P	6,50	1,86
56	VVL-129	R	6,00	1,88	P	6,00	2,00
57	VVL-113	R	6,80	1,55	P	10,00	1,82
58	VUG-002	R	5,20	1,86	P	8,00	1,78
59	VUG-037	R	12,40	1,47	P	7,00	2,00
60	VUG-036	R	7,20	1,80	P	7,50	1,67
61	VUG-013	R	13,20	1,74	P	10,50	1,91
62	VUG-059	R	12,00	1,58	P	4,00	2,00
63	VUG-062	R	8,00	1,67	P	4,50	1,80
64	VUG-014	R	6,80	1,70	P	5,50	1,83
65	VM-154	R	5,60	1,56	P	8,00	2,00
66	VM-148	R	4,40	1,83	P	9,00	1,80
67	VM-160	R	10,80	1,69	P	6,00	2,00
68	VM-116	R	11,60	1,32	P	8,50	1,70
69	VN-112	R	10,00	1,47	P	8,00	2,00
70	PLA-013	R	7,60	1,90	P	5,00	1,43
71	PLA-020	R	220	1,83	P	4,00	1,60
72	PLA-004	R	6,40	1,60	P	11,50	1,77
73	PLA-006	R	6,80	1,42	P	12,50	1,67
74	POŠ-096	R	6,40	1,23	P	8,50	1,70
75	POŠ-120	R	5,20	1,86	P	16,00	1,78
76	POŠ-095	R	6,00	1,50	P	7,50	1,88
77	POŠ-087	R	7,60	1,73	P	12,00	1,85
78	POŠ-123	R	10,80	1,69	P	13,00	1,73
79	POŠ-094	R	6,00	1,88	P	12,00	1,71
80	VB-122	P	6,80	1,13	P	20,00	1,82
81	BAB-076	P	5,20	1,18	P	12,00	1,71
82	POŠ-124	R	7,60	1,73	P	12,00	1,85
83	POŠ-102	R	8,00	1,67	P	15,50	1,82
84	POŠ-100	R	17,20	0,96	P	9,00	1,80
85	POŠ-109	R	4,00	1,43	P	8,50	1,89
86	PMC-312	R	9,20	1,77	P	21,00	1,91
87	PMC-287	R	5,60	1,75	P	8,00	1,78
88	PMC-313	R	12,00	1,58	P	37,00	1,95
89	PMC-401	R	18,00	1,02	P	3,00	3,00
90	PMC-286	R	10,40	1,73	P	17,00	1,89
91	PMC-235	R	13,60	1,62	P	30,50	1,85
92	MAR-019	R	10,40	1,73	P	11,00	1,83
93	MAR-044	R	6,00	1,67	P	12,50	1,67
94	MAR-037	R	7,60	1,73	P	14,50	1,81
95	MAR-114	R	11,60	1,61	P	11,00	1,83
96	MAR-123	R	7,60	1,58	P	11,00	1,83
97	BAB-035	R	10,00	1,47	P	12,00	1,85
98	BAB-045	R	9,20	1,44	P	9,50	1,58
99	BAB-009	R	9,20	1,53	P	17,00	1,70
100	BAB-018	R	8,40	1,62	P	12,00	1,60
101	BAB-049	R	8,80	1,83	P	11,00	1,83
102	BAB-038	R	7,60	1,73	P	10,00	1,67
103	BAB-002	R	11,60	1,53	P	21,00	1,68
104	BAB-034	R	8,40	1,75	P	12,50	1,79
105	BAB-052	R	12,40	1,63	P	10,50	1,75
106	PMC-178	R	8,80	1,57	P	9,50	1,73
107	PMC-192	R	5,20	1,44	P	7,50	1,88
108	PMC-181	R	10,80	1,68	P	5,50	1,57
109	PMC-124	R	8,00	1,82	P	13,50	1,59
110	PMC-094	R	8,40	1,50	P	11,50	1,77
111	PMC-084	R	10,80	1,69	P	8,50	2,13
112	PMC-159	R	8,40	1,91	P	11,50	1,77

Prilog 1. Nastavak

R.br.	Oznaka biljke	RNA			DNA		
		Biljni materijal	Koncentracija (ng/μl)	A260/280	Biljni materijal	Koncentracija (ng/μl)	A260/280
113	PMC-135	R	8,00	1,54	P	7,00	2,00
114	PMC-113	R	8,00	1,67	P	10,50	1,91
115	PMC-189	R	12,40	1,72	P	22,00	1,63
116	PMC-104	R	10,40	1,04	P	13,00	1,73
117	PMC-105	R	8,40	1,62	P	7,00	1,75
118	PMC-085	R	15,20	1,65	P	23,00	1,28
119	VLJ-160	R	7,20	1,80	P	7,00	1,75
120	BAB-065	R	8,40	1,75	P	25,50	1,65
121	BAB-058	R	8,00	1,82	P	12,00	1,71
122	BAB-084	R	17,20	1,87	P	27,00	1,86
123	BAB-072	R	10,40	1,73	P	7,00	1,75
124	BAB-067	R	6,80	1,89	P	14,50	1,81
125	BAB-075	R	8,40	1,75	P	13,00	1,63
126	BAB-068	R	18,40	1,59	P	14,00	1,65
127	BAB-073	R	8,40	1,91	P	9,50	1,90
128	BAB-071	R	18,80	1,88	P	35,50	1,73
129	GRK-009	R	15,60	1,77	P	15,50	1,72
130	GRK-012	R	36,00	1,88	P	17,50	1,75
131	GRK-042	R	6,00	1,67	P	6,50	1,86
132	GRK-008	R	8,80	1,69	P	13,00	1,73
133	GRK-003	R	16,40	1,86	P	11,00	1,83
134	GRK-015	R	13,20	1,74	P	16,00	1,68
135	PMC-282	R	8,40	1,50	P	10,50	1,91
136	PMC-200	R	11,20	1,65	P	15,00	1,77
137	PMC-219	R	10,40	1,63	P	19,50	1,86
138	PMC-234	R	7,60	1,90	P	6,00	1,71
139	PMC-236	R	12,00	1,50	P	9,50	1,73
140	PMC-245	R	10,40	1,53	P	7,00	1,75
141	PMC-243	R	10,40	1,53	P	5,50	1,57
142	PMC-272	R	12,00	1,67	P	6,00	2,00
143	PMC-279	R	54,40	1,70	P	2,50	2,50
144	PMC-275	R	22,40	1,60	P	12,00	1,71
145	PMC-232	R	83,20	1,87	P	4,00	2,67
146	VVL-140	R	15,60	1,86	P	7,50	1,88
147	VVL-142	R	24,00	1,94	P	23,00	1,84
148	VVL-143	R	7,20	1,80	P	6,00	2,00
149	VVL-150	R	38,00	1,98	P	15,50	1,94
150	VVL-147	R	12,40	1,94	P	16,00	1,88
151	PMC-022	R	10,80	1,69	P	7,00	1,75
152	PMC-009	R	22,80	1,84	P	8,50	1,70
153	PMC-082	R	16,40	1,78	P	8,00	2,00
154	PMC-011	R	13,20	1,74	P	17,00	1,89
155	PMC-079	R	11,60	1,00	P	9,50	1,90
156	PMC-013	R	13,60	1,79	P	6,00	2,00
157	PMC-026	R	34,00	1,81	P	5,50	1,83
158	PMC-078	R	26,40	1,69	P	8,50	1,89
159	PMC-010	R	27,20	1,70	P	5,00	2,00
160	PMC-003	R	9,60	1,60	P	6,50	1,63
161	PMC-081	R	16,40	1,78	P	9,50	1,90
162	D-34	R	10,00	1,67	P	12,50	1,67
163	D-30	R	8,40	1,91	P	14,00	1,87
164	D-17	R	19,60	1,63	P	14,50	1,93
165	D-24	R	12,40	1,82	P	20,00	1,91
166	D-21	R	5,60	1,75	P	15,00	1,77
167	VG-102	P	5,60	1,27	P	22,50	1,88
168	BAB-059	P	4,00	1,67	P	12,00	1,85
169	BAB-063	P	3,60	1,50	P	12,00	1,71
170	VVL-141	P	2,80	2,33	P	11,00	2,00

Prilog 1. Nastavak

R.br.	Oznaka biljke	Biljni materijal	RNA		DNA		
			Koncentracija (ng/ μ l)	A260/280	Biljni materijal	Koncentracija (ng/ μ l)	A260/280
171	VD-102	P	3,60	1,50	P	17,00	1,89
172	MAR-034	P	5,20	1,63	P	22,50	1,73
173	VG-107	P	6,00	1,50	P	10,00	2,00
174	VB-115	P	7,20	1,50	P	19,50	1,86
175	VLJ-103	P	7,20	1,29	P	15,00	1,88
176	BAB-061	P	5,60	1,27	P	8,50	1,89
177	VB-191	P	8,80	1,22	P	11,50	1,92
178	VB-138	P	4,40	1,38	P	13,50	1,69
179	MAR-101	P	5,60	1,75	P	24,00	1,66
180	VB-116	P	5,60	1,17	P	13,00	1,73
181	VB-184	P	7,20	1,39	P	12,00	2,00
182	VB-171	P	9,20	1,44	P	10,00	2,00
183	D-3	P	4,00	1,67	P	14,00	1,87
184	MAR-042	P	3,20	1,60	P	15,50	1,82
185	VVL-112	P	6,40	1,33	P	14,50	1,93
186	MAR-016	P	6,00	1,67	P	23,50	1,96
187	MAR-026	P	7,20	1,50	P	27,00	1,86
188	VLJ-163	P	16,40	1,41	P	19,50	1,86
189	VLJ-139	P	17,60	1,38	P	17,00	1,79
190	Jarbola	P	6,80	1,42	P	12,50	1,92
191	BAB-057	P	15,20	9,50	P	20,00	1,74
192	VLJ-119	P	15,60	6,50	P	14,00	1,87
193	MAR-028	P	10,40	8,67	P	24,50	1,82
194	BAB-055	P	4,80	1,20	P	11,00	2,00
195	BAB-054	P	5,60	1,00	P	13,00	1,73
196	BAB-047	P	4,80	0,92	P	13,00	1,63

Prilog 2. Sekvence GVG izolata utvrđene metodom HTS u okviru provedenog istraživanja.

Oznaka biljke: VVL-150	Sorta: Vlačka	Duljina sekvence: 7439
Sekvenca		
<p>CATCCTTTGCTAGTTCGCTCTTATCATTCAACTATGTCTCTGGGTGCAGGAAGTCAACGGAACGCTTATGCTAACGTTATTTCAAATCTGGATGCAGAGTCCAGCTCTA AGCTCAAGCTTCTAAAGGGTGAGGAGGTCTTAAAAATTGAGTCTGATGCTAATAATCTATATGATTATTATGTATCTGATCAAGTTTATGATTTCTAGTATCAAAGGTA TCCCTCTTTTGAACCAATGCTTTAGAGTGCATTCTCATCCTGCTTCGAAAATAATAGAGAATTATTTTCTTTATAACGTTATTTCTAATCATATAGTTAGTAACACTATTTT TATTAGTTTAAAGGAGTCTAAACTAGTACAGTTAGGTGTTAGGAAAGCTCATATTAAGGATAATGTTAATTTGATTAATAGATTAATACATGCCAAAGATGCACTTAGATA TTCTGACCCCGTAAGGAATCTTGATTTCCACTTTGAAACCTGAATCAAGGAGAAATTAAGTTTCAGCAAAAAGGGTTGTAATTCACGATGAAGTGCATTATTGGTCA CTTTTAGATTTTCAAATTTTTGGGTTAATTGATGGCCTCTGATCTACTCAATCATATACCCCTGAGGTTTCATATGGGTTATGAAAGCTCCCTTCACCCGGATTT GTACGAATTCAGGTATATCAAAGATCGCACTGCCTTCATTTGGGCTCCAGATGGGAATTATGGGGCGAGCTACACCCAGCCTGTGAACCTTGGTTACTCAGCACGA ACAAGCTTCATGACTCAATGAGCAGAACGTGGACGCTGACCAAGCTCGAAAACATTGGTTCACATCATCTGTTTCTATGCGTGCAGGGCTCAAAAATAGTTGAGGATC AACACATCTTCACCGATTTTACTCTAGTTGACCCGAAACTCTTGCATCATACGCGAACAGAAACCCACGTTTAAAGGGCGTCAATTTGTTCCGGAGGACGGCTCATTACCT AATGGCCCTCAAGAAAGCGGATAGTGCAAGCGCGGTCAGCAAATTGAGACAGCTCTCAAAAAGTGATGAGACAGCTGATGAAATTTTATTCGTTGGTGGCCTCGCAA AGTGCATCAGTGATCTCAAGTACTTTAACAACTGTCTGGCCTGCTTGATTTAGGGGAGGTTATCAAGCACTCCATTGAGCATAATGTTCTTCAGTGGCCTTGCTCTTTA TATGGTTGATAAACAAGCATACCACATGGAGAAAAATGCGCGTGGATTTGAAGAATCTTGTACCCCAACATTGGTGGTTCGTTGTTGTTTCAAGGAGTACAAGAGCCT CAATAGCAAACACTTCATGAGGATTGAGGATTATTTGATAGCAAGTTTGAAGGGGCTAACTGGAGAAATTTGAACCCAGTACGCCATGATTTCCCATGTTTGGAG AGATCCATATTTCAAACCTTTTCGCTGAGGGAGAGGAAAGCTTGTAAATTCCAAAGCTGGAGAGGAGTGTGCTCGCTTCAAGCAGATGCTGGGACCCCAAGGGTTG TGGAACAGAAGGCCAAGTACTTCACTGAGCGCCCTGCTGATGGTGAGGATTATGTGTATGTCGAGACTGTGCCCAAATTTCTTATAAAGGTTATGCTTCTAGAGGATG GCGCGCCACACATTTTGTACCAGGAGGGGCTGATTGGGCTGATGAGTACATTAAGCGCGCAACATGCCAGAAAAACAGGATGAACAGTTGGAGTGGTTGAAGC TGTTGAAACCACTGTGGATGATGAAGTGCCTGTTGAGGAACAAATGGATCTTGGAGGGACACTTGAAGCCGTTGTAGAGGCGAAAAAGAATCTCTGCCTGCTGAAAC CACTAAGTGAGCATCTCAAGGTTGAGCATCCAATTTAGTCGGCCATATGATCAGTATTGATAGTTTTCGCCAGGTTCTTAAATGAGGATGGTCTAGGGCTCCAG GGCTACTCATGATAGCCGCCGCAAGAACATGACCATGGCTATCTCAAGAAAAGGGGGTGGTTACTTACACATCGATGGAGAGTATAATCCAATTTGGGATTGAGATCT CCTCCAATCATGCCACTCTGGTGCCTATGAGCGAATAAGGAATTTGCCCTCTGATATGCTTAGAGTCTCTGAAACTTGTGGCAGACTGAGTTACACAGTAAAGGCAT AGAGGGCACTGAGACTGGTGAATGCATTCAAGAAGGGTTTCACTGGCCTCTACTAAATGAGTTTGTAAAACAATGGGGCAGGGTTGAAACAAGAGTGGTTGGGGAT CACGAGCTTCAGGTTAGTTCTTTCTTAGGTTTTGCTGGATGTGGA AAAACAACCTTTTTGCTCAAGATGCTCAAGTGCAACACCGGTTATTATGCTCCGTTGGTGAGCC CTAGAAGGAACCTGGCTGATGAGTGGTCAAAGGATCTAGAAGGAACATCTCATAATGTGTACACTTTTGAAGAAATTTTAAAGGTTCTCCGCAAGTTGTGACCTCTTGGT GGTTGATGAATGTGGCTTGTTCCTCCCTGGTTATCTTGACCTGGTCTTTTTCATGAAGGAATTTAAGCATATTGTTATCCTGGGTGATCCTTTACAGTGTCTCGTATTACA ATGAGAAAAGACAACATCGTCTTGAGGGGAGAATTCACGTTATTCAAGGAATTGAGGTTGCCAAAGGTTAACCAGTGCCTCTGTGGTTTATCGCTGGATGTCAAGGACT ATGTTGGTCCATCTTTTTGTAACATGCCTGGCACTGGTGACAAATTGAAAGGCAGGGATGCCTGGTTCTATAGCAGGAACGGGGAGGGTTACACTTATTCTGGCATAA AGCACAACCTCCAGAGGTTGGCCAGAGAGCCTAGATGAAGTGATCAGAGCTTGTCTGTGGAACCCCACTTTTCGATCATTGCCTAGCTCAGGAGTACTGTGCCGGT GGCAAGATAGGTTCCATGCTGACGATGAGAAGTGCTATCCAATCGGAAACCCCAATTTGACTGTGCAGCTAGACGGGGCGTGCCATTTTCAAGTATCCTGTAAAGAA GGGGCGTTCATACATTTGTTCTTGTGATGGAGCCAAGTATTTCTTAATGCCAAAGGATGCGAGCAACCCACAAGCAGCTGTTGAAGCTGACAAACCCAGGGCAAGCT TGACGTTTATAGTCCACAAGGCCAGTACCCTGGAGCAACATTCTGAGTCCACTCTTAAATGCCATACATGTTGTTTACCAACAGGTTGTCAAGAAAGAATAACGTCTT TGGGGTTAAGTACATGGTACTCTTGGTTATGAGGTGAAGGAGATTAATACCTTAAATCATGACCTGCCTACCATATGCTTTTCCAGAGATTATCTTGAAGAAGAAG GAAATGAAAGAAATCATGACAGTTAGCCAATCTCAAGGTCTAAGCAGAAAAATAGTTCAACTGGTCTTGTACTGTTCTGTGAGTGTGAAGATACTAATGTAATCA CTGCTTTAACCAGGGCCCGCAATGGCATCCACGTTCTTTGATGTCCGGCAAAGAGACTGTGCTATCTACCGCCAGGAGCAGCATCCTCAAGGCATTCATCAAGAGG GAGATCATCAGTAAGAAGATGTTAATGTCAATTTATCCTCCGAGACTAAGATCCCCTTTGAATTCATTGAGGAGAACCACCAGATAGGTTCCACTAGGGCAGAGATTG AGCAGAAATTAAGAAGTGACCCCGGTTCTCAAAGCTATGCTCACTATCTTGGATGCTGAAGAGATGGAGGAGGAATTCATGGAGAAGGAATTAGCCCCAGAGAGTAGC AGGACACATCTAGCACTTTCTGAGTTTCGGAATGAGCTATTTCTACAGAGCTCAAAGCCAAAGAAGATCGAGAAGCTCACATCTATGGTCAGGGATACAGTAACCAG</p>		

Prilog 2. Nastavak

Oznaka biljke: VVL-150	Sorta: Vlačka	Duljina sekvence: 7439
Sekvenca		
ATTAGAGATGATGTGCCAAGCGAGAGGATGGCAGGTCCATATGGTCCAAGTAGCATCTACCTTCACCACAGGTCGGAAGATGACATCACCTTCATACTCTCAATCCGGA AGAGGCTGCGTTTCGCTGATTATGAGAAGAATTGCAGATCATTGCTCTTAAAGCACACATAGGGGAACAGATATTCGATGTGTTTTCTAGGCGCATCGGATTAGGGCAT GTACCCCAGGTGGATCCGACTGAATCTGAACTGCAGTTTACTCAGAAAAGAATTGAGAAAAGCGCAGCACTGCTTGAAGCTCACTCAATAAGATCTGACCCTGATTGGC CATCAAACATTATAAAGATCTTCATAAAGAATCAGTGCTGACAAAAAATGGAGAAAAGAGGTATCGATGCAAAGGCTGGACAGACTATAGCATGCTTCGCCATTCCGTT CTCTGCAGGTTCCGGGCCCTTAATGAGAAAGACTGAGCTCCAGTTTCGGAGGATGATCCCTGAGCATATTCTTATCTTTTTCTCAGAAGAAGACTACGATGATCTTGATAGATG GGCCAAAGAGTACTTCTTGATTTACCGGGACTGACAGTGACTATGAGGCTTTTGATAGATCGCAAGATGCCACTATCTTAGGCTTCGAAAGGAGTTTCTTGAGGTA TCGATTGGCCAGAAGAGATGATCAGTGAATATGTGGAGCTCAAACCTAGAATGGGGGACTCTAGGTGACTTGGCCATCATGAGGTTTTCCGGTGAATTCGGTACCTT TTTTCTCAATACTATTTGTAACATGGCCTTCACCTTCTTGAGGTACAAAATAGGACCTTACCAACCCTTGGCCTTCGCAGGTGATGATATGGTGGCTCCTGGCAAACCTTGA AGTGGATATGGCATAACCATGATCTACTTGGTCTCCTACAACCTCAAAGCCAAGGTGAATTACAGCGATCAACCGCTCTTCTGCGGATGGAGAGTGAGCCCTTTGGCATT GTTAAGGATCCGAACCTTCTCCTGGATAGGCTGGAGATGAAACGTTCTGAAGGCACTCTCCATTTGTGCATCGCAAATTATGCATTGGAGGCGAGTTATGGTTACAGATT AAGCGATCATCTTCATTTCTTGAATATAGATCTGGATGCTTATCAGGAGTTGGTGAGGAAGATAATCAAGCTCAAAGCCATCTGCCGGCCAACATCAGTGCCTGTACT CTTCCGAAGAGGATATTATCTCAGATGGTGAAGGATGATGGAGGGACTCATCAAGGATAGGTTTGTAGAGGAGCTTGTGAATATTTATAATAATCTAGTGATTAGTGA TATAGCTATCCCAGATGATTTAGACTTTCTTTAAGGTTAGGTAGTTCTGATAGTTCTGTGGTAGCTCTGAGGAACCTATTTGCTGGGGAATCATTCTGCTCAAGTTCAGAG CTTCAGCTACTCCCAACTTTAGTAACTCAGCCTGCTTACCCTGAACTAGGTGATGCCAGCGGTTAACTGAACTCCTGGGTTTTTCAGTTGTGACTAGTGAATACTCAA ATCTCTTACAGGTTTTCTGGAGGTAATCTCATGCACCTCTCTGTTTTGAGTGGACAAAGGGTTGTTTTGATGAACTACAAGCTACACAGGATAAACCTCAGTGGCCACA CATCCATGATGCTCTCCAAGGCATTAAGATAATATCAAATTGCCTTTCTTGGTTAAGGAGCAACCGTAGTTTAATAATGGAGAGGGTGGAGAATAAAGTGTAAAGGTG AGGAATCTCAAGAATGGTCTCTCAAACCTCCAAGACTTTGAGAAGATCGTTGATAAAAAAGAAGGTCTATGAGCTCGGGGTGCTCGATGAAATTTTTGGCCAAAGAGGGT CTTCAAATGTGCGATCTGCAAGGAGCTCACGGTTGAGTCAGGTGAGGTCAATGTACAGATGGATCTATTTTGCAGGAGACTATGGATGGAATTGACCCTGACGTTTAC CCATTTATGCACTTTGGCTGTCTCGCTCTGGGCTTTATGGGCTTGGAAGTAGGCTGGATGGTCAGTATGTAGCCAGGTCGTTGATACGAGGAGGAAAGAGGGTTCCA ATGTCCTCTCATCCTTCCGCTTCAGGTGCAAGGATGGTGTGACGCGTACATAGATTTTCCAGATTTCTGCGTAGCGACCACTGACATCATGGGGGGCTTCACCATCTC CATCCGTCTGAGATCTGAGGGCATAGACTTCATGGACGGTTCTCACCCCTTGGCCTTAAACGTGGTAGCACTCTGTGCTTTTATGGATGACAACTGGAGACAAAGATG CTCATAAAGAAACACGGGAAGAGAATCTACCAAGCAGTCGGCCAGGTCGAAATTCTTGATCCTGAAATAGGGAATCTCCGTCTCAATGATACTCCAAGTGGAGACACAAT TGATAAGACTATGTTTCGACGTCCGCGGAGATAATAAGGAAGATCAGATCAAGTGTGCGTTTCCAGGGGCAAGTGCAAGCACAAAGGATGGGAGAGGAATCAAAGAGGATGA GGCTAGCAGTACTGACGCTGCTCAGCGTGAAGCATCCGGCTCTAAAGTCAAGAGCCCTCTTCTGATGAGGAAAAAGAAGTAAACCATAATATACTTAGTAATATATTTGGT AATATAGGTATTATAGGTACTAGTGCTAAGATAAGTAACTATCCTGAGTCAATAAAGTGCTATGATCTCTCAGCTGGTCTTGAATCCAGCTCTCCTCAAGGGTGAGGAT ATCAGATTGGGAGAGATTTTAGTCACAATGATAGTGGTCTTAAGGCTGCTGACGGTCTCCAATGGGTGGAGCTACACTGCGTCAAATGTGTGAGCCCTTTGCTAATG AGGCTTACCATTACCTGAAGGCCGACGTAATAGTGGTGTACACCAATTTGGCAAAGAAGATGACAAGGGCTGGGAATAAGGAACCTCAGGTAATGTTTGACTTTTCT AAGGGTCTTGCAATATCTAGGTTGACACGCTCTGAGGCCAGTGTGATGCAAGTCACTGATCAACGTGCTTTTCAACTGAAGGCGCCAAGGGTGTATTGCAAGCTCAA GCAACGTGGCCGAAGACCTGTGGAGGTTAGCTTAAAGCAGTTAAGAGGATCACTACTAATAATGCAAGGCTAGGTGAGTCTAAAAGTGCAGCTAAGCGTCCG AGCTAAGCGGTATGGTGTCTGTTATAAAGTGTGCTAAGTCAAGTTCAGTTTGGCTTTGTGAGAAAAATAGGGCTAGCTTTTTGATCGGACTGATTGGAAATGCTAATGCAATAAG GATGCTGCGACTAGATACTTAATCGAAAGCAGAGGTACTTATTTGCACAAAGCATCACAATTAGCTCTCTCCGATCTTGAGGCTATTGGTGTCTGGGTTATGAGAAATA TGTTAGGTATAATAATCAATAAGAGTTGTAATCTCCAGAGGAACTCCAGAGTATTACAATTTCAATTAATAAAGAGGGGACATGCTTAGCCTTCCCCCTTAGTGATA GGCGAAATAACACACAGTGC		

Prilog 2. Nastavak

Oznaka biljke: VM-160	Sorta: Mladenka	Duljina sekvence: 6864
Sekvenca		
<p>GAAGTGCATTATTGGTCTCTGTTAGATTTCCAGAATTTCTTAGGTTTAATTGAAGGACCATTAATCTACTCGATCATATATCCACCAGAGGTCCACATGGGTTATGAAAG CTCCCTTCATCCGGATTTATATGAGTTCAGGTACATTAAGGACCGCACAGCATTATCTGGGCGCCTGATGGCAATTATGGAGCTAGTTATACCCAACCTGTAAACCC TTGGTTATTGAGCACCAACAAGCTCCATGATTCTACAGGTAGAACATGGACACTACCAAGCTTGA AACCATCGGTTACACCCATCTGTTTCTGTGTGTTCCAGGGGTC AAAAATTGTGGAGGATCAGCATATTTTACCCGATTTTACATTGGTAGATCCTAGACTCTTCTCCACATATGCCAATAGGAATCCTAGGTTGAGGGGCATCGTTTCGTGCGC AGAACAGCTCATTATTTGATGGCCCTCAAAAAGGCTGATAGTGCCAGTGCCGTTAGCAAACCTGAGACAACATCAAAAAGTGATGAGACTGCTGATGAGATACTGTTT GTGGGGGGTCTAGCAAAAATGCATAAGTGACCTCAAGTATTTCAACAATGTTTCTGGCTTATTAGAGTTGGGGGAGGTCATCAAGCATTCAATAGAGCATATGTTCTTCA GTGGTCTGGCTCTGTACATGGTGGATAAACAGGCTTACCACATGGAGAAGATGCGATTGGATCTTAAGAATCTTGTCAACCCAACTCTAGTGGTGCCATGTAACCTCA AGGAGTACAAAGGCCTCAACAATAAGCATTTTATGAAGATAGAGGATTACATGGATAACATCTTTGAGGGCGGCCTAACCGGTGAGTTTGATCCACAATTTGCAATGG TGCCTATGTTTGAAGAGATCCATATTTCAAAAATCTTCTTGGATGGTGAGGAAAGACTCTCGATCCCACAGCTTGGAGGGAGTGCCTAGATTTAAACAGATGCTTG GACCACCAAGGGTTGTTGAGCAGAAGGCAGTCTACCATGCTGAACGTCCACTTACTGTGACGATCATGTGTATATAGAGACCGTGCCTAAGTTTTACATGAAGGTAA TGCTCCTGGAGGACGGTGAGGATCATGTACTATACCAGGAAGGTTTGATTGGGGTTCGATGAGTACATTAGACGTGCCAACTTTTACAGATGCTCAAGTTGCACCTGCA GAGGTCTCAGAGGTTATACAAGATTTCACTGACCCTGAGTACCTGTTGAGGAGCAGTTAGATTTGGGGGGATCCCTTGGAGGCTGTGGTGGAGGCTAAAAAGAATCT TCTTACTTAAGCCACTCAGTGAGCATCTCAAAGTCGAGCATCCTATTCTGGTGGGGCACATGATCAGTATTGATAGCTCATTGCCCCGATTCTCAACGAGGATGG TCTTGGTCTGCCTGGTTTACTCATGATAGCTGCTGCCAAAAATATGACCATGGCCATATCAAGAAAAGGTGGTGGCTACCTGCACATAGAGGGCGAGTACAACCCGAT TGGCATTGAACTTTTATCCAACCATGCCACACTGGTCCATATGAGCGGATTAGAAACCTGCCACAGGATATGCTCAGAATCTCAGAAACTTGTGGGACCCTCAATTA CACAGTTAAGGCAGAACGGGCACTGAGGTTAGTCAATGCATTCAAGAAAGGTTTACAGGCATCCTGCTGAATGAATTTGTGAAGCAATGGGGCAGAGTTGAATCAA GAGTGACTGGGGATCATGAGTTGCAGGTAAGTTCTTCTTAGGATTCGCTGGGTGGCAAGACAACCTTTCTGCTCAAGATGTTGAAGTGTAACACCGGGATTACCG CATCGGTTGTGAGCCCTAGGAGAAACCTCGCTGATGAATGGGTAAGGATCTAGAAGGCACATCCCACAGTTCACACGTTTGA AAAATTCCTGAAAGCATCAGCAA GTTGTGATCTCTTAGTTATAGATGAGTGTGGCCTATTTCCACCAGGTTATCTTGATCTGGTTTTCTTATGAAGGAATTC AAACACATAGTGATACTGGGGGATCCTCT GCAATGCTCATATTACAATGAGAAAAGATAACATTGTGCTGAGGGGAGAGTTCCGCATTGTTCAAGGAGCTGAGACTGCCGAGTATAAACAAGTGCATTTGTGGTTTACC CTTGGAGCTCAAAGATTATGACGGTCTACTTTCTGTAACATGCCTGGGAATGGAGATAAATTGAAAGGAAGAGATGCGTGGTTTTACAGCAGAAAATGGTGACGGCTA CACCTATTCAAGGTAAAAAACACGCCTCCAAAAGTTGGCCTCAAACATTAGATGATGTGATTAGGGCCTGCAATTTGGACCCACAATTTTATCATTGTTTGGCTCAA GAATACAGTGCTGGTGGTAAGATAGGGTTCCACGCGGATGATGAGAAATGTTACCCTATTAACAATCCCATCTTAACTGTACAACCTAGATGGGGCCTGTCAATTCAGC GTATCGTGCAAAAAGGGTACGTCTACGTTTCGTTCTTGTGAGGGCCAAAGTACTTCTTGTGATGCCCAATGGTATGCAGGCAAATCACAAGCATGCTGTGCAAGCTGACAAA CCTAGGGCAAGCTTAACTTTTCAAGATCCACAAAGCCAGTCACTTTGGAGCAACCAGCTGAAGCTGTTTCTGGGTGTCCATACATGCTATTCACCAATAGGCTGTCCAGA AAGAATTCGTCTTTGGAGTCAAATCACATGGTACTTTGGGTTATGAGGTGAAGGAGATTAATACCTTAAATCATGATCTACCTACCATCTGCTTCTCCAGAGACTATCT TGAAAAGAAAAAGGAGATTAAGGAGATAATGACTGTGAGTCAAGGTTTGGAGCAGGAAGATCATTCACTAGTTTCTAGACACTGGCTCAATCAGCGCAGAGGA CACAAACGTTATCAGGCAATTGACCAGGGCTCGAAATGGGATCCATGTGTTCTTTGATGTCGGCAAGGATCACTGTGCTGTCAACCGCAAGAAGTGGTGTCTCCTCAAGA AGTTTGTAAAGGGGAAATAATAGATAAGAAAATGTTGATGTCAATCTTATCTGTAAGAACCAAAATCTTTTTAACTTCAATGAGGAGAACCACAAATAGGCTTACC AGAGCAGAAAATTGAGCAAAAATTGGAGGGTGTCCCGGCTCAAAGCCATGCTGACGATCCTGGAGGCTGAGGAAATGGAGGAGGATTCATGGAACCTGAATGTG CTGAGGAAAATAGTAAGACACACTTGGCACTCTCTGAGTTCCGCAATGAACTGTTCCCAACTGAGCTGAAGGCCAAGGAAGATCGTGAAGCACACATAACATAACCAG GGTTACAGTAATCAGATTAGGGATGATGTGCCAATGAAAAGATGGCAGGGCCGATGGTCCCAGTAGCATTTACCTCCACCACAGGCTGTGATGATGACATCACATTC ATACTTTCTATCAGAAAAGAGTTGAGGTTTGTGATTATGAGAAGAATTGCAGGGCGCTTGCCTCAAAGGGGCATCTGGGAGAGCAGATCTTTGATGTCTTCTCTAGG CGCATTGGTTTGGGGCATGTACCACAGGTAGATCCAACCTGATTCTGAACTGCTCTTACACAAAAAGAGGATCGAGAAAAGTGCAGCATTGTTGGAGGCTCACTCCATA AGGTCTGATCCTGACTGGCCCTCAAATATAATCAAGATCTTATAAAGAACCAGTGTGCACTAAGATGGAGAAAAGAGGCATAGATGCAAAAAGCAGGCCAGACCATT GCATGTTTGTCTCATGCTGTGCTCTGTAGGTTTGGTCCCCTGTTGAGAAAAACTGAGATCCAGTTTCCGAAAATGATCCCAGAGCACATCCTTATCTTTTCTCAGAAGA</p>		

Prilog 2. Nastavak

Oznaka biljke: VM-160	Sorta: Mladenka	Duljina sekvence: 6864
Sekvenca		
<p>ACTATGATGATCTGGATAAATGGGCTAAGGAGTACTTCCTGGACTTCAGTGGAACTGATAGCGATTATGAGGCTTTCGATAGGTCCACAGGATGCCACCATTCTGGGTTTC GAGAGGAGTTTCTTAAGGTACTTTGATTGGCCGGAAGAGATGATAAATGAGTACGTGAGCTCAAGCTAAGAATGGGTGGTACTCTGGGTGATTTGGCAATCATGAGGT TCTCAGGGGAGTTCGGGACCTTTTTCTTCAACACCATCTGCAACATGGCCTTCACATACTTGAGATAACAAGATAAGCCCTTCAACCCTTGGCCTTCGCTGGAGATGAT ATGGTAGCACCTGGGAAACTAGAAGTTGATATGGCATACCATGACCTACTCAGTCTGCTTCAACTTAAGGCCAAGGTGAATTACAGTGATCAACCCTATTCTGCGGCTG GAGGGTAAGTCCTTTTGAATTGTCAAGGATCCAAATCTTCTTCTTGGATCGATTGGAGATGAAACGTGCGGAAGGTACACTTGATCTTGCATAGCAAATTATGCATTAGA AGCAAGTTACGGTTACAGATTAAGTGACCACCTCCATTTCTGAACATAGATTTGGACGCTTACCAGGAGCTGATAAGGAAGATAATCAAGTAAAAGGCCGTCTGCCAG CCAATATCAGTGCCTGTACTCGTCTGAGGAGGATATAATTTCTGATGGTGAAGGTGATGGACAGAGCAATTAGGGATAGGTATACTTTACATGCCTTGTAGATATTTA TAATAATCTAGTCATTAGTGATATAGCTATACCGGATGATTTGGATTTCTTTAAGGTTAGGTAGTTCTGATAGTTCTGTGGTAGCTCTGAGAACTATCTGTTGGGGAAC AATCCGGATCAGGTCCGAAATTTAGTTTATTACCAACTCTAGTAACCTCAGCCTGTTTATCCTGAACTAGGTGATGCCCAACGGTTGACTGAACTCTTGGGTTTTTTCAGTT GTGACTAGTGAAAAATCTCAGAACTCTCCATCGATTCTCTGGAGGGAACCTCATGCACCTTTCTGTCGTATCTGGCCAAAGAATAGTCCTGATGAATTACAAGTTGCACAG GGTGAATCTCAATTGTCCACACGTCCACCAAGCTCTCGAGGGTATCAAGGTTTTATCGAACTGTTTATTCTTGGTTTAAAGTTCAACCGTGGTTCAATAATGGAGAGAGT GGAGAATAAAGTGTCAAGGTCCGGAACCTGAAGAATGGTCTCTCAAACCTCCAGGATTTGAGAAGATTGTGGACAAAAAGAAAGTCTACGAACTTGGGGTGTCTTGAC GAAATCTTCGGGCCCAAGAGGGTTTTCAAGTGTGCGATCTGCAAGGAACTCACCGTCTGAGTCTGGGGAGGTTAATGTTCAATGGATCTATTTTGTGAAGAGACTATGG ATGGAATTGACCCAGAGGCTTATCCGTTTATGCACTTCGGTTGTCTTGTCTTGGCTTTATGGGTCTTGGAAAGTAGGTTGGATGGTCAGTTCATAGCTCAAGTCGTGGAT ACAAGGAGAACAGAGGGCTCTAATGTTCTCTCATCATTCCGCTTCAAGTGCAAAGATGGGGTTTGTGCATACATAGATTTCCAGACTTCTGTGTGGCCACGACTGATAT AATGGGCGGTTTTACCATCTCCATCCGTTTGAATCTGAAGGTATAGATTTTGTGGATGGTGGCCACCCATTGGCTCTGAATGTGGTCGCTCTTTGTGCTTTCATGGATG ATAAATTGGAGACAAAGATGCTCATAAAGAAGCATGGGAAGAGGATCTACCAGTCGGTCGGGCAAGTTGAAATCTTGACCCTGAAATAGGGAATCTCCGTCTCAATGAT TCTCCAAACGGAGAAAATTTTGATAAGACTATGTTTCGACGTGCGGAGATAATAAGAAAGATCAGGTCAAGTGTGGAAGTGGTGAAGTGTGACCAAGAAGGATGGGA GAGGAATCAAAGAGGATGAGGCGAGCAGTACTGACGCTGCTCAGCGTGAAGCACCCGGCTCTAAAAGCAGAGCCCTTCTGATGAGGAAAAAGAGCTTAACCATAAT ATACTTAGTAATATATTTGGCAATATAGGTATAATAGGTACTAGTGCAAAAAAAGTAACCTATCCAGAGTCAATAAAGTGCTATGATCTCTCTGCTGGCCGTCTGAACCCAA ACCTTCTCAAGGGTGAGGACATTAAGCTTGGGGAGATTTAGTAACTATGATAGTGGTTTTCAAAGCTGCTGACGGTCTCCGATGGGTGGTGCAACTACGTCAGAT GTGTGAACCTTTTGCTAATGAGGCTTACCATTATCTGAAGGCTGCAGCTAATAGCGGAGTTTACACCAACTTTGGCAAAGAAGATGACGAGGGCAGGGAACAAGGAGCCC CAGGTGATGTTTGACTTTTCAAAGGGTCTTGAATATCTAGGCTCACACGTTCTGAAGCAAGCGTTATGCAGGTCATGCATCAACGTGTCTTTGAACTGAGGGCGCCAA GGGTGATTTCGAAGCTCAAAGCAACGTGGCCGAAGGACCTGTGGAGGTTTGTAGTTAAGGCAGTTAGGTAGTCACTATATCATTAAATAATGGAAAGATTAGGTGAGTCTA AGAGTGCCGCCAAACGTGCTGCGAAGCGGTATGGTCTCTGTTATAGGTGTGCTAAGTCAGTTTGTGTTTGTGAGAAGAATAATAGTGGCTTTTTGATCGGACTGATTGG AAATGCTACAATGCAATAAGGATGCCTGCGACTAGATATCTGATCGAAAGCAGGGGTACTTATTTGCATAAGGCATCACAGTTAGCTCTTGTGATGATCTTGTGCCATTGG TATTTTCAGGTTATGAAAAATATGTTAAATATAATAAATCCGTAAGGGTTGTAGATCTCCAGAGGAGACTCCAGAGTTCTATATGTTTGTAGTAAATGAGGGGACATGCTT AGCCTTCCCCCTTAGTGATAAGGCCAAATAACACACAGTGCATGTGCGCCG</p>		

Prilog 3. Sekvence GBV-1 izolata utvrđene metodom HTS u okviru provedenog istraživanja.

Oznaka biljke: PMC-235	Sorta: Plavac mali	Duljina sekvence: 7149
Sekvenca		
<p>TACAAAATTGGTATAATAATTCCCGAACCATTAACCTTGAGTACCTTGATCTAGCAGAGAGTGAAAAACCTAACTTAGTCATATTCACAACAACCTAGCAGTACTTTAT GATAGAGTAAGTTTGTAGCAGGGTGAGCATCAAAAATTTCAAAGTATTTTGGAAAACATAGAGAAGATAGAAGAGCGTCTCAAATCTTTGGAAAAAGGTGTA CCTTAACCAGAGAAGTCACGGAAAGCAGGCCCTTAACAGCACAAGAAGTCAAGGCTCTTGTTACAGAGATAGCTAAGCAGCCAAAGTTGGTGAAGAAGAAGCTTTG AGGATTTACAGGAGAGTTAAGCCAAAACTCACAAGAGTTGAGGCTTTACTCCACAGGGTGGAATCTTGGGCTACCACATGAGTAACTACCTTTATTCACAAGGGACAG TTACTTATAAGGAAGCTATCAAAGCAACCGAGTCCATTGAATCACCAGCCCTTGGTTTTGTA AAAGCAAAAACAACCCAGCTGCAGATACTTGTAGGGATTCTGAATCTCTGCGAGATATCAAGGACGATTTGAAAGTAATCAGGGAAAGCCTCAGACAGATT CAAGGAAGGCAGCTCTTCATCATCAGCATTACCTGAAGAGTTAGTAGAGAAGCTTAAACAATCTGAGCCTGGGAGAATCAAACCACCCAGGGAGAAAAGGGGACAGC TCAGGGTTTTCAAAGATCCTTTGAGAATCCTCGAGGAGGAAAAAGGCTAAGCTCAAATGAGTCGAACAGTACTCAGCAGCTGCCAGCAGCAACAACGGCTACTGCAG AAAGACATCCTGGTACTCCTCTTTATGAGGACCAAATCAGGGATTACCGCAGAGGGCAGAGAAGAAGGTTTGTAGCAAGGCAAGCGGCAAGAAGGATAGCAAGCAG GATAACAGGAAGACGGTTCAATCAAACCTTGGAGCAGGTAGTCAACCCAGAGGAAAGCCTGCAGCAGTCTATGCAGGAACGGGCAAACCTAGTTCCAGCAGAAGTC CTGTACAGATCCAGGAGGGATGATATAAACCCAGTGGTATAGTCACCGATCAGAAGAAGCAATCCTATGTGTAGATGGACAGCAGCAAGACCCGGCTGGTAATACAA CCAGACAGTTACGAGTGTGAGAAGAAGTGGATTTTCACTTTTACACCTAGGAATTGAGGTCAGAGTTCAGATAGATGCTTTCATAGAGCAGACGAGGTACAGCTGC CTTTGTGGTTTTCCGAGACAATAGGTGGCAAGGAGATCAGGCCATCTTTGCAACCATGGAGATAGATCTTACCAGTGGAAACACAGCTGGTATATGTCATTCCAGACAC TATGATGACGCTGAGAGATTTCTACCGAAATATTCAGATCTCAATCCTTACAAGGGTTATGAAAACTGGCGAAATGGAGAAGCTAATCTTTGGTCAACCCGAGGAGT GATGGCGCGGTTATCAAATACACCAAATGTTGGATTTGCATACCAGATTCAGCATGTTACTGATCACTTGGAAAGCAAAGGAGTCCGTGCGCTACCGGGAAGGAGATA CAGTGCTGAACACATAAAGGTCAAATTTGATTATTCGCAACCCGAGATCAACATCCCTATGAGGCCATCAGAGTTGACACAAGAAACCTATATGATGGGAGTGT TTCAATCCGATTTAGGGATTATGTGCCTACTGATGAGCAAGCAACCCCAACAATAAGCATGACGAAGAAATCAATGAAGACGAAGAAGAGTTGATCCAAGAACA TCATACGATTGCAGTTCTAAAGGAAGAAGAAGATGGGATACTCTGGGACAGCCATCAGGAAAATATGACTTCTATGTTGCTACTCGGCACCGGAGTCCCTCAAAAT CCCAATTAGCAGCATTACAGACTGGTTGGGAAGATATGGATGATGCAGTAGAAGAAGATGAATATGACCCTGATGCCAGAATGGCTCTGCTCAATCTCATGGGAC GGCCTCCAGAACACCAAATCCCAATTTATGATGAATCTGATGCTGAAATAGATGATTTTATCAATCCATTTGCGGAAGGTGGTGGGAAAGAGGCAGTAAAAACAGTG AAAAACTTTTTGTTTTTCAGGAAGAAGTAGCAGAACCAACTAGACTACCCAGTCATGAAAAAACTGGAAAAGGTCTACTCAACCAGTGAAGTGACGTCCTCCGCTATAC ACCCCAACTGATGCAGTAATGGGTCCTCCTAGTTATCCACCTGCAAGAAACATCAATGGAGCAGGCACAAGCTATGCAGCAGCATCGCCTCCCAATTTCAATAGAAG AGTAACTTCAAAGCAGGCTACAATGATGAACTATGGTCCTTACCACCGGCTCAACAAAAGGGAGGAGCAATGTTTCGTAATCCCAGAACAAATCGGGATGTTCCATGA TGTTTTCTCAAGATGGGAGTCAATAACAAAGAATCATGTCTTCTCAAGTTTTACAGATGTAAGAGACAAGCTAGAATATATGGAGAAGTGGTGGAGAAAGTTGAA AAACTCCTATGGATTCAATGGCGAATGCAGTATAATGCGGAGTATGAGGAGCTGATTAGAACAGGCGAAGGACGAGAAAGGAACTCAAACATCATATCCCAAATGAGA AGGGTATTCTCCCTAGAAGATCCAGCACAAGGCTCGACAGTCATCCAGGAGGAAGCATAACAGGGACTTGGAGAAGCTTTTATGTGACAACATCAAGTACATAGTTCAA TACTTGAACCAGTATTTGAGATTGGCAGCTAAGTCAGGAAGAGCCTATGTGGGAATGGAATCTCTGAGAAGCTGTGGCTTAAAATGCCAGGAGATTTGGGAAATAGG ATGAAGACAGCCTTCGAAGAAAGATACCCTGGTCAACGGTAGGGGTAGCACCAGAATTTTTCGCTACAAATTTCTTGAAGCAGAAATGTAAGAAGCAGCTTTTC AAGAGGTCATTGAAGAATCTATCTTTCTGCAAAGATATCCCAATCCCTGGATATTACAAAGATCAGAAGCGGCTTGGTATCAGGAAATCCCAAAGATATAAAGGGAAAC CTCATGAAAGCCATGCAAGAATAGAGAAGCGCAAACATCTCATTAGAAATAAGAGGTGTAAGTGCTATCTCTGTGGAGAAGAAGGGCACTTCGCGAGGGAATGCCCT AATGATCGAAAAAGTTCAAAGAGGGTGGCAATGTTGCAACAACTGGAATTACCAGAAGACTATGATATAGTCTCGGTAATGAAGGAGAAGATAATAGCGATGCCATT TATAGTCTTTCAGAAGGAGAAGATGGAATGGAAGATCTGGGACAATCACTGAGGAGTCTCATGATCGCAGAAAAGATGTTTATGCTGGGAGAAGAAGATGGAGGCTG GAGGCCTAAGATAAAGGTCAATGATGAACAGCTGGCGTGCCAACATGAGTGGGAACACAACGGTGAATCCAGCAATTTGTATACTTAAAGTGTGGGATGCAAATG CCCAACAATGAAGCGAGCAAGGATACATTGTCCAAGGTGTAAGCCACGGCATGTAACCTGTGCGGTCCTTATTATTTCAAGAAGGAGGTACCAGTAGCACCACCAC CACCCACACCAATGAACCCAAGGAAGTTGATCATGGAGCAACAGAATCATATCCAATGGTGTGAAGTTGAGATAGAAAGACTCGAGAAGGAAGTATCCTACTGGAGG AAACTCTATGAGAACGCCCTAAGAGCAACTGGGTTATCGAAGATCTTCAGAAGGATTACAAGGAGCTGCTCAGTGAAGATGAAGAAAAAAGGAAAAGAAGAGCAAA</p>		

Prilog 3. Nastavak

Oznaka biljke: PMC-282	Sorta: Plavac mali	Duljina sekvence: 7150
Sekvenca		
<p>TACAAAATTGGTATAATAATTCCCGAACCGTAAACTTGAATATCTTGATTTAGCAGAGAGTGAACAACCTAAACTTAGTCATATTCACAATAACCTAGCAGTACTTTATG ATAGAGTAAGTTTTGTGTAGCAGGGTGAGCATCAAAAATTTCAAAGTATTTTTGGAAAAATAGAACAGGTAGAAGAGCGTCTCAAATCTTTGGAAAAAGGTGTA AAAAC CTTAACCAGAGAAGTCACGGAAAGCAGGCCCTTAACAGCACAAGAGGTCAAGACTCTTGTTACAGAGATAGCTAAGCAACCAAAAGTTGGTGGAGAAGAAGCTTTGA GGATTTAGGAGAGTTAAGCCAAAACTTACAAGAGTTGAGGCTTTACTCCACAGGGTGGAAATCTTGGGCTACCGCATGAGTAACTACCTTTATTCACAAGGGACAGT TACTTATAAGGAAGCTATCAAGGCAACTGAGTCCATTGAATCACCAGCCCTTGGTTTTGTAAAACCAGCGGATTATAAAGGAGGAATATCTGCACCGACTGCTCAGATA AAGCAGAACAATACCCAGCTGCAGATACTTGTAGGAATTTCCGAATCTCTGCGAGACATTAAGGACGATCTGAAGGTGATCAGGGAAAAGCCTCAGACAGATTGAGAAC AAGGAAGGCAGCTCTTCATCATCAGCATTACCTGAAGAGTTAGTGGAGAACTTAACAATCTAAGCTTGGGAGAATCAAACCACCCAGGGAGAAAAGGGGACAGCT TAGGGTTTTCAAAGATCCTTTGAGAAATCCTCGAGGAGGAAAAGGCTAAGCTCAAATGAGTCGAACAGTGACTCAGCAGCTGCCAGCAGCAACAACGGCTACTGCAGA AAGACATCCTGGTACTCCTTTATGAGGACCAAATCAGGAATTATCGCAGAGGGCAGAGAAGAAGTTTTGTAGCAAGGCAAGCGGCGAGAAGGATAGCAAGCAGG ATAACAGGAAGGCGGTTCAATCAAACCTTGGAGCAGGTAGTTAACCCAGAGGAAAGCCTGCAGCAGTCTATGCAGGAACGGGCAAACCTAGTTCCAGCAGAAGTCTCT GTACAGATCCAGAAGGGATGATATAAACCATCGAGTTTATAGTCACCGATCAGAGGAAGCAATCCTATGTGTAGATGGGCAGCAGCAAGACCGGCTGGTAATACAAC CAGACAGTTATGAGGTGCTGAGAAGGAGTGGATTTAGTTTACCTAGGGATTATGCAGGTGAGAATTCAGATCTTGCATAGAGCAGATGAGGGAACAGCTGCAC TTGTGGTTTTTCGGGACAATAGGTGGCAAGGAGATCAGGCCATCTTTCGAACCATGGAGATAGATCTCACCAGTGGAAACACAGCTAGTATATGTCATTCCAGACACTA TGATGACGTTGGGAGATTTCTACCGCAATATTCAAATCTCAATCCTTACAAGGGGTTATGAAAACCTGGCGAAATGGAGAAGCTAATCTCTGGTCACCCGAGGAGTAA TGGCGCGGTTATCAAATACACCAAATGTTGGATTTGCATACCAGATTGAGCATGTTACTGACCCTTGGAAAGCAAAGGAGTCCGTGCGCTACCAGGAAGGAGATACA GTGCTGAACAAATACAAGGTCAAATTTGGATTATTCGCCAACACAGATCAACATCCCTATGAGGCCATCAGAGGTGGACACAAGAAACCTATATGATGGGAGTGT CTATCCGATTTAGGGATTATGTACCTACTGATGAGCAAGCAACCCCAACATACAATAAGCATGACGAGGAAGTCAACGAAGACGAAGAAGAGCTGATCCAAGAATC ATACGATAGCAGTTCTAAAGGAAGAACATATATGGGATACTCTGGGACAGCCATCAGGAAAATATGACTTCTATGTTTCGCTACTCGGCACCGGAGTCTCACAAATCC CAATTAGCAGTATTCAGAGTACTGGATGGGAAGATATGGATGATGCAGTAGAAGAAGATGAATATGACCCTGATGCCAGAATGGCTTTGCTTAATCATATGGGACGCG CCCCAGAGCACCAAATCCCAATTTATGATGAATCTGATGCTGAAATGGATGATTTTTATCAATCCATTTGCAGAAGGTGGTGGGAAAGAGACAGAGGCAGTGA AAAACA GTGAAAAACTTTTTGTTTTTCAGGAAGAAGTAGCAGAACCAACACTAGACTACCCAGTCAATGAAAAAACTGGAAAAGGTCTACTCAACCAGCGAAGTGACGTCCCGCT ATACACCCCAACTGATGCAGTAATGGGTCTCTAGTTATCCACCTGCAAGAAACATCAATGGAGCAGGCACAAGCTATGCAGCAGCATCGCCTCCCAATTTCAATA GAAGAGTAAACTTCAAAGCAGGCTACAATGATGAACTATGGTCTTACCACCGGCTCAACAAAAGGGAGGAGCAATGTTTCGTAATCCCAGAACAAATCGGAATGTTCC ATGATGTTTTCTCAAGATGGGAATCGATCACAAGAATCATGTCTCTTCTCAAGTTTTACAGATGTAAGAGACAAGCTAGAATATATGGAGAAGTGGTGGAGAAAGT TGAAAACTCCTATGGATTCAATGGCGAATGCAGTATAATGCGGAGTATGAGGAGCTGGTTAGAACAGGCGAAGGACGAGAAGGAAGTCAAACATCATATCCCAAT GAGAAGGTATTCTCCCTAGAAGATCCAGCACAAGGCTCAACAGTATCCAGGAGGAAAGCATACAGGGACTTTGGAGAAGCTTTTCATGTGACAACATCAAGTACATAG TTCAATACTTGAACCAGTACTTAAGATTGGCAGTAAAGTCAAGGAGGAGGAGGAGTGGGACTCTGTGGAAGCTGTGGCTTAAAATGCCAGGAGACTTGGGAA ACAGGATGAAGACAGCCTTGAAGAAAGATACCCTGGTCTAACGGTAGGGGTAGCACCAGAATTTTTGTTTCGCTTACAAATTCCTTGAAGCAGAATGTAAAGAAGCAG CTTTCAAAGGTCATTGAAGAATCTATCTTTCTGCAAAGATATCCCAATCCCTGGATATTACAAGGATCAGAAACGGCTCGGCATCAGGAAATCCCAAGGTATAAAGG GAAACCTCATGAAAGCCATGCAAGAATAGAGAAGCGCAAACATCTCATCAGAAATAAGAGGTGTAAGTGCTATCTCTGTGGAGAAGAAGGGCAGTTCGCGAGGGAAT GCCCTAATGATCGAAAAAGCGCCAAGAGGGTGGCAATGTTGCAACAACCTGGAATTACCAGAAGACTATGATATAGTCTCGGTAATGAAGGAGAAGATAATAGTGATG CCATTTATAGTCTTTGAGAAGGAGAAGATGGAATGGAAGATTTGGGACAATCACTGAAGAGTCTCATGATCAGGAAAAGATGTTTCATGCTGGGAGAAGAAGATGGAG GCTGGAGGCCTAAGATAAAGGTTAGTGATGAACAGCTGGCGTCCCAACATGAGTGGGAACACAACCGTGAATCCAGCAGTTTCGTATACCTAAAAGTGTGGGATGC AAATGCCCAACAATGAAGCGAGCAAGGATACACTGTCCAAGGTGTAAAGCCACGGCATGTAACCTGTGTGGCCCTTATTATTTCAAGAAGGAGGTACCAGTAGCACC ACCGCCACCAACCAATTAACCCGAGGAAGTTGATCATGGAGCAACAGAATCATATCCCAATGGTGTGAAGTTGAGATAGAAAGACTTGAGAAGGAAGTATCCTACTG GAAGAACTCTATGAGAACGCCCTAAGAGCAACTGGGGTTATCGAAGACCTTCAAGGATTACAAGGAGCTGCTTAGTGAAGATGAAGAAAAGAGGAAAAGAGAG CAAAAAGGGTAAATGATCATAGACTCCAAGGAAGAAGGAGAACAGGCCAATTTCTTGAAGAAGAAAAGGTCCACAAAAGTAGCAGTTCAAGAAGAGCAAAGACCCAAAG</p>		

Prilog 3. Nastavak

Oznaka biljke: PMC-282	Sorta: Plavac mali	Duljina sekvence: 7150
Sekvenca		
<p>AAGATGGTAAGAAATATGCTGTATAATTTTCATTATCAGCATAGACATCCCTGGGGTCGATAAATTCTCAGTCAAAGCTATACTAGATACTGGAGCCACCACATGCTGCATT GATCAGGAATCAATACCAAAAAGGAGCATTGGAGGAAAACACGTATCTGGTTAGGTTTCAGCGAGTTAACTCAACAATGACAGCCAACAAGAAGCTGAAGGGAGGACGTA TGTTTCATTGGTGAAAATATGTTTCAGAATTCGGTACACCTACAGTTTCCCTATCAAGATGGAAGATGGAGTCCAAATGATAGTTGGTTGCAATTTTCATAAGGGCAATGTATG GGGGAGTACGAATAGAAGGCAATGTAGTAACTTTCTACAAGAACCTAACAGTGATCAATACGTCCCAGTCAACAGAGATTGCAAGAATGCTTCAAGAAGATGTTGATGAC GAAGAACTATGGCAGATTCAAGAAGCAGTCTATATCAATATTGGCCAAAAGCAGGGAAAGCTTTTTGAAAAGGTTTGAAGCCTTAATCAATCAGCTAAAAGAAGCAGGCTA CATAGGGGAGAATCCTCTTCAACATTGGGAAAAGAACAGGGTAGTATGCCAGCTAGATATCAAAAACCCTGATTTTATCATTGAAGACAAACCCCTGAAGCATCTCACTC CATCAATGAAGGAGTCATTCAGAAGACACACTGAGGCACTATTAAGCTGGGAGTCATAAGACCTAGCAAAGTTCGTACAGAACAACAGCAATGATAGTCCAGTCAGG AACTGCTATAGATCCAGCACAGGGGAAGGAGACTAGGGGCAAGGAAAGAATGGTCTTCAACTATAAAAAGGCTTAATGATCTAACCAACAAGATCAATATAGCCTTCCTGG AATCAGCACTATCATGAAAAAGGTGGGAAATAGTCGGATTTACTCAAAGTTCGATCTAAAAAGCGGATTCCATCAAGTGGCAATGCACCCAGATTCTATAGAATGGACAG CCTTTTGGGTTCTGTATGGGCTGTATGAATGGCTTGTATGCCATTTGGTCTTAAGAATGCCCTGCAGTTTTCCAAAGAAAAATGGATCATTGTTTCAAAGGCACTGAGG ATTTTCATAGCAGTCTACATAGATGACATCCTGGTCTTCTCAGAAAATGAACAAGATCATGCCAGGCATTTGAAGATAATGCTTCAAATTTGCAAGGAAAATGGGCTTGTCT TGAGCCCAACAAAAATGAAGATAGCAGTCCAAGAGATTGAATTTCTCGGGCAGTGATTGGCAATAGGAAGATTGACTTCAGCCCCACATCATTCAAAGATTGCTGAC TTCAAGAATGAGGAGCTTAAGGAAAGAAAGGGCCTAAGGTCTTGGCTCGGACTACTAAATATGCGAGAACCTACATCCCAATTTAGGCCGATTGCTAAGCCCATTATA CGCAAAAACCAAGTCCAACAGGCGACAAACGGATGAACCTCGCAAGATTGGAACCTAGTGGCCGACATCAAGAATCTTGTACAGAAAACCTGCCAGACCTAGAGGTCCCACCA GAAAGTTGCTATATCGTGCTGGAAACAGACGGATGCATGACAGGCTGGGGAGGAATATGCAAAATGGAAGATGCTAAAGCATGACCCCAAAAAGCAGTGAAGAAATTTGCG CATATGCGAGTGGAAAATTCATCCAGTTAAATCCACAATAGATGCTGAGATCTATGCCGTAATGAACACGCTGGAATCTCTCAAAATCTATTACTTTGGATAAGAAGGAAG TCACTATCAGGACTGATTGCCAAGCCATTATTTCTTCTTCAACAAATCTGCACAGAACAACCTTCTAGGGTAAGATGGTTATCTTTTACTGACTATATAACTGGAGTCG GAGTCCCTATAAACTTCGAACATATCGAGGGAAAGGATAATCTACTAGCTGACAACCTGTCAAGACTAGTAAGCACACTTTGCCTAGGATGGAGCACACCAGAGAAGGA GCAACAGCTACAATTCCTGGAAACAGCCATGGAGGAAGTAAAACAGAAACCAACAAGGGCATCTCATTACAACCTCAACCAACAATTGGGAAAATGGTGAGCTTTTTTCG AAGCTACTCAAACACAGTGCAGAGAGGGCATGAACCAGGAGGAATTTCAATGTCAGAATTCACAAACTCAGAGCCCAACTTAAAGAAAATTGAGTCCCTGGCAATCACA CGAGCGCTCGTATGCCTCAAAGAACTCAGGGATATACACACAATCAAGTTGGATGAATGCAGGAAATCAAGCTCCCCAGGAAGAGATGGGAATTACTGGTCAGACCACC GCCATCGTGTCAACACCATGACAGAGAACTGGAAGAAATCCTTAGCAAGCTGGAAGGGTAGCAGCTGATGTTCAAAGTTCTCACTTTAGCGGGAAGTGGTGGACCC AACCAAAAGGCTGAGCCGACCTTCATCATCGGCCTTATCTGTTTGTGGGATGCGTCAGCCCACCTTGTGTTGTCTGACAATACCATGGGAGCCTCATGTTTTGGCCC CTGGTTTTCTTTAAGTGGTTTTGCTTTTAAATCATTAAAGGGAATCGTCTTTTGGACTCAAAGTGGCCGCCCATGTGCCATGATTCCTGTTGTTTGGTTTTAGTAGAAGTT TGAGCTGTTCATGGGGCCAGTGAGCACCCGAGCTCCCTTCTATATAAGACCTTACATATCTCATTGCAGACATCAAGCCAGAAGCTTAGAGTCTACTTTGAGGAAGA AGTCTTGTATTGTAAGTCTTGTGAGTTTTCTTTGTATTTCTTTGAATGAATAAAGTCTGTGATTAGTTCTTATCTTTATTTGTTTAAAGAAGCCGCGCTTCCATTTAT GGTATCAGAGCTAGTTTCAGTTATGAGTGGCTAATTTTCTTATAAAGGTATTCAGGTTAAGGGGAAGGTTTTATTATGCCAGTAGTGTATTCAAGTTCTTCTAATCAGATC TTGATTTTCAATATGGTCTGATCCTCTAAGTTGTAGTGCCTAGACAAAAGTATCAAAGCAGCTACCGATAAGGCAGGAGGCCGTGAGATCGGGAATACCTTTGATTGA GTCTATGAAAGGCATGAGTTATGATCAGAAAATAGTTTGAATATGAGTCATGTCTGAAAGTGGAACAAGAAA</p>		

Prilog 3. Nastavak

Oznaka biljke: PMC-313

Sorta: Plavac mali

Duljina sekvence: 7145

Sekvenca

TACAAAATTGGTATAATAATTCCCGAACCATAAAACCTTGAGTATCTTGATTTAGCAGAGAGTGAAAAACCTAATCTTAGTCATATTCACAACAACCTAGCAGTACTTTATG
 ATAGAGTAAGTTTTGTGTAGCAGGGTGAGCATCAAAAATTTCAAAGTATTTTTGGAAAAATAGAAAAAGATAGAAGAGCGTCTCAAATCTTTGGAAAAAGGTGTA
 CTTAACAGAGAAGTCACGGAAAGCAGGCCCTTAACAGCACAAGAAGTCAAGGCTCTTGTTACAGAGATAGCTAAGCAGCCAAAGTTGGTAGAAGAAGAAGCTGTGA
 GAATTTACAGGAGAGTTAAGCCAAAACTTACAAGAGTTGAGGCTTTACTCCTCAGGGTAGAATCTTGGGCTACCACATGAGTAACTACCTTTATTCACAAGGGACAGTT
 ACTTATAAGGAAGCCATCAAAGCAACCGAGTCCATTGAATCACCAGCCCTTGGTTTTGTA
 AAGCAAAAACAACACCCAGCTGCAAATACTCGTAGGAATTTCTGAATCTCTGCGAGACATCAAGGACGATCTGAAGGTGATCAGGGAAAACCTCAGGCAGATTCAAAG
 CAAGGAAGGCAGCTCTTCATCATCAGCATTACCTGAAGAATTAGTAGAAAAGCTTAAACAGTCTAAGCTTTGGGAGAATCAAACCACCCAGGGAGAAAAGGGGACAGC
 TCAGGGTTTTCAAAGATCCTTTGAGAACTCCTCGAAGAGGAAAAGGCTAAGCTCAAATGAGTCGAACAGTGAAGTCAAGCAGCTGCCAGCAGCAACAACGGCTACTGCAG
 AAAGACATCCTGGTACTCCTCTTTATGAGGACCAAATCAGGAATTATCGCAGAGGGCAGAGAAGAAGGTTTGTAGCAAGGCAAGCGGCAAGAAGGATAGCAAGCAGG
 ATAACAGGAAGGCGGTACAATCAAACCTTGGAGCAGGTAGTTAACCCAGAGGAAAGCCTGCAGCAGTCTATGCAGGAACGGGCAAACCTAGTTCCAGCAGAAGTCTCT
 GTACAGATCCAGAAGGGATGATATAAACCATCGAGTTTATAGTCACCGATCAGAAGAAGCAATCTTATGTGTAGATGGGCAGCAGCAAGACCGGCTGGTAATACAAAC
 AGACAGTTATGAGGTGCTGAGAAGGAGTGGATTTAGTTTATCCACCTGGGGATTATGCAGGTCAGAATTCAGATCTTGCATAGAGCAGACGAGGGTACAGCTGCAC
 TTGTGGTTTTTCGGGACAATAGGTGGCAAGGAGATCAGGCCATCTTTGCAACCATGGAGATAGATCTCACCAGGGGAACACAGCTGGTATATGTCATTCCAGACACTA
 TGATGACGCTGAGGGATTTCTACCGAAATATTCAAATCTCAATCCTTACAAGGGGTTATGAAAACCTGGCGAAATGGAGAAGCTAATCTCTTGGTCAACCGAGGAGTAA
 TGGCGCGGTTATCAAATACACCAAATGTTGGATTTGCATACCAGATTACAGCATGTTACTGATCACTTGGAAAGCAAAGGAGTCCGTGCACTACCGGGAAGGGGATACA
 GTGCTGAACAAATACAAGGTCAGAATTGGATTATTCGCCAACCCGACATCAACATCCCTATGAGGCCATCAGAGGTTGACACAAGAAATCTATATGATGGGAGTGT
 CTATCCGATTTAGGGATTATGTCACCTACTGATGAGCAAGCAACCCGACATACAATAAGCATACGAGGAGGTCAACGAAGACGAAGAAGATTGATCCGAACATC
 ATACGATTGCAGTTCTACAGGAAAAAGAAAGATGGGACTCTGGGACAGCCATCAGGAAAAATATGACTTCTATGTTCCGCTACTCGGCACCAGAATCCTCACAAATCC
 CAATTAGTAGTATTCAGAGTACTGGATGGGAAGATATGGACGATGCAGTAGAAGAAGATGAATATGACCCTGATGCCAGAATGGCTCTGCTTAATTTTTATGGGACGCG
 CCCCAGATCACCAATCCCGATTTATGACGAATCTGATGATGAAATGAATGATTTTTATCAATCCATTTGCAGAAGGTGGTGGGGAAGAGGCAGTGAACACAGTGA
 AACTTTTTGTTTTTCAGGAGGGCAGAACCAACACTAGACTACCCAGTCATGAAAAACTGGAAAAAGTCTACTCAACCAGCGAAGTGACGTCCCGCTATACACCCCA
 ACTGATGCAGTAATGGGTCTCCTAGTTATCCACCTGCAAGAAACATCAATGGAGCAGGCACAAGCTATGCAGCAGCATCGCCTCCCAATTTCAATAGAAGAGTAAAC
 TTCAAAGCAGGCTACAATGATGAACATGGTCTTACCACCGGCTCAACAAAAGGGAGGAGCAATGTTCCGTAATCCCGAAACAAATCGGGATGTTCCATGATGTTTT
 TCAAGATGGGAGTCAATCACAAGAATCACGTCTCTTCTCAAGGTTTTACAGATGTAAGAGACAAGCTAGAATATATGAAAACTTGTAGGAGAAGTTGAAAAACTCC
 TATGGATTCAATGGCGAATGCAGTATAATGCGGAGTATGAGGAGCTGGTTAGAACAGGTGAAGGACGGGAAGGAACCTCAAACATCATATCCCAAATGAGAAGAGTA
 TTCTCCCTAGAAGATCCAGCACAAGGCTCAACAGTCAATCCAGGAGGAAGCATAACAGGGATTTGGAGAACTTTTATGTGACAATATCAAGTACATAGTTCAATACTTGA
 ACCAGTACTTAAGATTGGCAGCTAAGTCAGGAAGAGCCTATGTGGGGATGGAGCTCTCTGAGAAGCTGTGGCTTAAATGCCAGGAGACTTTGGGAAACAGAATGAAG
 ACAGCCTTTGAAGAAAGATACCCTGGTCTAACGGTAGGGGTAGCACAAGAAATTTGTTCTCTTACAAATCCTTGAAGCAGAATGTAAGAAGCAGCTTTCAAAGGT
 CATTGAAGAATCTATCTTTCTGCAAAGATATCCCAATCCCTGGATATTACAAGACAGCAAGCGGCTCGGTATCAGGAAATCCCAAAGGTATAAAGGGAAACCTCATGA
 AAGCCATGCAAGAATAGAGAAGCGCAAAACATCTCATTAGAAATAAGAGGTGTAAGTCTATCTGTGGGAAGAAGGGCACTTCGCGAGGGAATGCCCTAATGATC
 GAAAAAGTACAAAGAGGGTGGCAATGTTGCAACAACCTGGAATTACCAGAAGACTATGATATAGTCTCGGTAAACGAAGGAGAAGATAATAGTGATGCCATTTATAGTC
 TTTCAGAAGGAGAAGATGGAATGGAAGATTTGGGACAATCACTGAAGAGTCTCATGATCGCAGAAAAGATGTTTATGCTGGGAGAAGAAGATGGAGGCTGGAGGCCT
 AAGATAAAGGTCAGTGAACAGCTGGCGTGCCAACATGAGTGGGAACACAACGGTGAATCCAGCAGTTCGTATATTCAAAGTGTGGGATGCAAATGCCAAC
 AATGAAGCGCGCAAGGATACATTGTCAAAGGTGTAAGCCACGGCATGTAACCTGTGCGGTCCTTATTATTTCAAGAAGGAGGTACCAGTAGCACCACCGCCACCAA
 CACCAATGAACCCGAGGAAGTTGATTATGGAACAACAGAATCATATCCCAATGGTGTGAAGTTGAGATAGAAAAGACTTGAGAAGGAAGTATCCTACTGGAAGAACTCT
 ATGAGAACGCCCTAAGAGCAACTGGGGTTATCGAAGACCTTCAGAAAAGATTACAAGGAGCTGCTCAGTGAAGATGAAGAAAAAGGAAAAAGAAGAGCAAAAAGGGGTA
 ATGATCATAGACTCCAAAGAAGAAGGAGAACAGGCCAATTTCTTGAAGAAGAAGGTTCCATAAAGTAGCAGTTCAAGAAGAACAAGACCCAAAGAAGATGGTAAGA

Prilog 3. Nastavak

Oznaka biljke: PMC-313

Sorta: Plavac mali

Duljina sekvence: 7145

Sekvenca

AACATGCTGTATAATTTTCATTATCAGCATAGACATCCCTGGGGTCGATAAATCTCAGTCAAAGCTATACTGGATACTGGAGCCACCACATGCTGCATTGATCAAGAATCA
ATACCAAAAAGAAGCATTGGAGGAAAATACGTATCTGGTTAGGTTTCAGCGGAGTTAACTCAACAATGACAGCCAATAAGAAGCTGAAGGGAGGACGTATGTTTATTGGTGA
AAATATGTTTCAGAATTCGGTACACCTACAGTTTCCCTATCAAAATGGAAGATGGAGTCCAAATGATAGTCCGGTTGCAATTTTCATAAGGGCAATGTATGGAGGAGTACGAAT
AGAAGGTAATGTAGTAACTTTCTACAAGAACCTAACAGTGATCAATACGTCCCAGTCAACAGAGATTGCAAGGATGCTTCAGGAGGATGTTGATGATGAAGAACTATGGC
AGATTCAAGAAGCAGTCTATATCAACATTGGTCAAAGCAGGGAAAGCTTTCTGAAGAAGTTTGAAGCCTTAATCAATCAGCTAAAAGAAGCAGGCTACATAGGGGAGAAT
CCTCTTCAACATTTGGAAAAGAACAGGGTAGTATGCCAGCTAGATATCAAAAACCCTGATTTTATCATTGAAGACAAAACCTCTAAAGCATCTCACTCCAGCAATGAAGGA
GTCATTCAGAAGACACACTGAGGCACTGTTAAAGCTGGGAGTCATAAGGCCTAGCAAAAAGTCGTACAGAACAAACAGCAATGATAGTCCAGTCAGGGACTGCTATAGAT
CCAGTCACAGGGAAGGAGACTAGGGGCAAGGAAAAGAATGGTCTTCAACTATAAAAGGCTTAATGATCTAACCAACAAAAGATCAATATAGCCTTCTGGAATCAGTACTAT
CATGAAGAAAAGTGGGAAATAGTCGGATTTACTCAAAGTTTCGATCTAAAGAGCGGATTCCATCAAGTGGCAATGCACCCAGATTCTATAGAATGGACAGCCTTTTGGGTTT
CTGATGGGCTGTATGAATGGCTTGTTATGCCATTTGGTCTCAAGAATGCCCTGCAGTTTTCCAGAGAAAAATGGATCATTGTTTCAAAGGCACTGAGGATTTTCATAGCA
GTCTACATTGATGACATCCTAGTCTTCTCAGAAAATGAGCAAGATCATGCCAGACATTTGAAGATAATGCTTCAGATTTGCAAGGAAAACGGGCTTGTCTTGAGCCCAAC
AAAAATGAAGATAGCAGTCCAAGAGATTGAATTTCTCGGGCAGTGATTGGCAATAGGAAGATTGACTTCAGCCCCACATCATTTCAAAGATTGCGAGCTTCAAGGATG
AGGAGCTTAAGGAAAGAAAGGGCCTAAGATCTTGGCTCGGGCTACTAAATTATGCGAGAACCTACATCCCGAATTTGGGCCGATTGCTAAGCCCATTATACGCAAAGAC
CAGTCCACAGGCGACAAAACGGATGAAGTCTGCAAGATTGGAAGTCTGAGGCGGACATCAAGAATCTTGTACAGAACTGCCAGACCTGGAGTCCCACCAGAAAAGTTG
CTATATCGTGCTGGAAACAGATGGATGCATGACAGTTGGGGAGGAATATGCAAATGGAAGATGCTAAAGCATGACCCAAAAGCAGTGAAAAGATTTGCGCATATGCA
AGTGGTAAATTCATCCAGTTAAATCCACAATAGATGCTGAGATCTATGCCGTAATGAACACGCTAGAATCTCTCAAAATCTATTATTTGGATAAGAAGGAAGTCACTATCA
GGACTGACTGTCAAGCCATTATTTCTTCTTCAACAAGTCTGCACAGAACAAAACCTTCTAGGGTAAGGTGGTTATCCTTCACTGACTATATAACCGGAGTCGGAGTCCCT
ATAAGCTTCGAACACATTGAGGGAAGGATAATCTACTAGCTGACAACCTGTCAAGACTAGTAAGCACACTTTGCTAGGATGGAGCACACCGGAGAAGGAGCAACAGC
TACAATTCCTGGAACAGCCATGGAAGAAGTAAAACAGAAACCAACAAGGGCATCTCATTACAACCTCAACCAACAATTGGGAAAATGGTGAGCTTTTTCGAAGCTACT
CAAACACAGTGCAGAGAGGACATGAACCAGGAGGAATTTCTATGTCAGAATTCACCAAGCTCAGAGCCCAGCTCAAAGAAAATTGAGTCCATGGCAATCACACGAGCACT
CGTATGCCTCAAAGAACTCAGGGATATACACACAATCAAGTTGGATGAATGCAGAAAATCAAGCTCCCCAGGAAGAGATGGGAATTAAGTCTGAGTCCAGACCACCGCCATCA
TGTAACACCATGACAGAGATCTGGAAGAGATCCTTAGCAAGCTGGAAGGGTAGCAGCAGATGTTCAAAGGTTCTCACTTTAGGCGGAAGTGGTGGACCAACCAAAAG
GCTGAGCCGACCTTCATCATCGGCCTTATCTGTTTGTGGGATGTGTGAGCCACTTTGTGTTGTCTGACAATACCATGGGAGCCTCATGTTTTGGCCCTGGTTTT
CTTTAAGCGGTTTTGCTTTTAAATCATCAAAGGGAATCGTCTTTTGGACTCAAAGTGGCCGCCCATGTGCCATGATTCCTGTTGCTTGGTCTTCAGTGAAGTTTTGAGCT
GTCGATGGGGCCCAATGAGCACCCGAGCTCCCTTCTATATAAGACCTTCACATATCTCATTGCAGACATCAAGCCAGAAGCTTAGAGTCTACTTTGAGGAAGAAGTCTTA
TTATTGTAAGTCTTGTGAGTTTTCTTTGTAAGTTTTCTTTGAATGAAATAAAGTCTGTGATTAGTTCTTTATTTTGTAAAGAAGCCGCGCTTCCCTTAATGGT
ATCAGAGCTAGTTTCAGTTATGAGTGGCTAATTTTTCTTAAAAGGTATTCAGGTTAAGGGGAAGGTTTTATTATGCCAGTAGTGTATTTCAAGTCTTCTAATCAGATCTTG
TATTTCCAATTATGGTCTGATCCTCTAAGTTGTAGTGCCTAGACAAAAGTATCAAAGCAGCTACCGATAAGGCAGGAGGCCGTGAGATCGGGAATACCTTTGATTGAGTC
TATGAAAGGCATGAGTTATGATCAGAAAATAGTTTGAATATGAGTCATGTCTGAAAGGTGGGAACAAGAAA

Prilog 3. Nastavak

Oznaka biljke: VG-102	Sorta: Glavinuša	Duljina sekvence: 7144
Sekvenca		
<p>TACAAAATTGGTATAATAATTCCCGAACCATAAAACTTGAGTATCTTGATCTAGCGGAGAGTGAAAAACCTAATCTTAGTCATATTTACAACAACCTAGCAGTACTTTAT GATAGAGTAAGTTTGTGTAGCAGGGTGAGCATCAAAAATTTCAAATATTTTTGAAAAAATAGAAAAGGTGGAAGAGCGTCTCAAATCTTTGAAAAAGGTGTA AAAA CCTTAACCCAGAGAAGTCACGGAAGCAGGCCCTTAACAGCACAAGAAGTCAAGACTCTTGTACAGAGATAGCTAAGCAGCCAAAGTTGGTGAAGAAGAAGCTTTG AGGATTTTCAGGAGAGTTAAGCCAAAAACTTACAAGAGTTGAGGCTTTACTCCACAGGGTGGAAATCTTGGGCTACCACATGAGTAACCTTTATTACAAGGGACAG TTACTTATAAGGAAGCTATCAAAGCAACCGAGTCCATTGAATCACCAGCCCTTGGTTTTGTAAAACCATCGGACTATAAAGGAGGAATATCTGCACCAACTGCTCAGAT AAAGCAAAAACAACCCAGCTGCAGATACTTGTAGGAATTTCTGAATCGTGCAGACATCAAGGACGATCTGAAGGTGATCAGGGAAAGCCTCAGACAGATTCAGA GCAAGGAAGGCAGCTCTTCATCAGCAGCATTACCTGAAGAGTTAGTGGAAGAAGCTTAACAATCTGAGCTTGGGAGAATCAAAAACCACCCAGGGAGAAAAGGGGACAG CTCAGGGTTTTCAAAGATCCTTTGAGAATCCTCGAGGAGGAAAAGGCTAAGCTCAAATGAGTCGAACAGTGACTCAGCAGCTGCCAGCAGCAACAACGGCTACTGCA GAAAGGCATCCTGGTACTCCTCTTTATGAGGACCAAATCAGGGATTATCGCAGAGGGCAGAGAAGAAGGTTTGTAGCAAGGCAAGCGGCAAGAAGGATAGCAAGCA GGATAACAGGAAGGCGGTTCAATCAAACCTTGGAGCAGGTAGTTAACCAGAAGAAAGCCTGCAGCAGTCTATGCAGGAACGGGCAAACCTAGTTCCAGCAGAAGT CCTGTACAGATCTAGAAGGGATGATATAAACCATCGAGTTTATAGTCACCGATCAGAAGAAGCAATCCTATGTGTAGATGGGCAGCAGCAAGACCGGCTGGTAAATACA ACCAGACAGTTATGAGGTACTGAGAAGGAGTGGATTTTCAGTTTATCCACCTGGGAATTATGCAAGTCAAGATCTTGCATAGAGCAGCAGGGTACAGTACAGT CACTTGTGGTTTTCCGGGACAATAGGTGGCAAGGAGATCAGGCCATCTTTGCAACCATGGAGATAGATCTCACCAGTGGAAACACAGCTGGTATATGTCATTCCAGACA CTATGATGACGCTGAGAGATTTCTACCGAAATATTCAAATCTCAATCCTTACAAGGGGTTATGAAAACCTGGCGAAATGGAGAAGCTAATCTCTTGGTCACCCGAGGAG TAATGGCGCGGTTATCAAATACACCAAATGTTGGATTTGCATACCAAATTCAGCATGTTACTGATCACTTGGAAAGCAGAGGAGTCCGTGCGCTATCGGGAAGGAGAT ACAGTGCTGAACAAATACAAGGTCAGAATTGGATTATTCGCCAACCGCAGATCAACATCCCTATGAGGCCATCAGAAGTTGACACGAGAAACCTATATGATGGGAGTG TTTCTGTCCGATTTAGGGATTATGTACCTACTGATGAGCAAGCAACCCCAACATACAATAAGCATGACGAGGAAATCAATGAAGACGAAGAAGAATTGATCCAAGAACA GCATACGATTGCAGTCTAAAGGAAGAAGAAAGATGGGATACTCTGGGACAGCCATCAGGAAAATATGACTTCTATGTTCCGCTACTCGGCACCGGAGTCCCTCAAAAT CCCAATTAGCAGTATTCAGAGTACTGGATGGGAAGATATGGATGAAGCAGAAGAAGAAGATGAATATGACCCTGATGCCAGAATGGCTCTGCTTAATATCATGGGACG CGCCCCAGAGCACCAAATCCAATTTATGATGAATCTGATGCTGAAATGGATGATTTTATCAATCCATTTGCGGAAGGTGGTGGGAAAGAGAAAAACAGTAAAAACT TTTTGTTTTTCAGGAAGAAGTAGCAGAACCAGAACCAACTAGACTACCCAGTCAATGAAAAACTGGAAAAGGTCTACTCAACCAGTGAAGTGACGTCCCGCTATAC ACCCCAACTGATGCAGTAATGGGTCTCTAGTTACCCACTGCAAGAAACATCAATGGAGCAGGCACAAGTTATGCAGCAGCATCACCTCCAATTTCAATAGAAG AGTAAACTTCAAAGCAGGCTACAATGATGAATATGGTCTTACCACCGGCTCAACAGAAGGGAGGAGCAATGTTGTAATCCCAGAACAAATCGGGATGTTCCATGA TGTTTTCTCAAGATGGGAGTCAATCACAAGAATCATGTCTTCTCAAGTTTTACAGATGTAAGAGACAAGCTAGAATATATGGAGAAGTTGCTAGGAGAAGTTGAA AAACTCCTATGGATTCAATGGCGAATGCAGTATAATGCGGAGTATGAGGAGCTGGTTAGAACAGGCGAAGGACGAGAAGGAACTCAAAAACATCATATCCCAAATGAG GAGGGTATTCTCCCTAGAAGATCCAGCACAAGGCTCAACAGTCAATCCAGGAGGAAGCATAACAGGGACTTGGAGAAGCTTTTATGCGACAACATCAAGTACATAGTTT AATACTTGAACCAAGTACTTAAGATTGGCAGCTAAGTCAGGAAGAGCCCTATGTGGGGATGGAACCTCTGAGAAGCTGTGGCTTAAAATGCCAGGAGACTTGGGAAATA GGATGAAGACAGCCTTTCGAAGAAAGATACCCTGGTCTAACGGTAGGAGTAGCACCAGAATTTTGTTCGCCTACAAATTTCTTGAAGCAGAATGTAAAGAAGCAGCTT TCAAAGGTCATTGAAGAATCTATCCTTCTGCAAAGATATCCCAATCCCTGGATATTACAAGGATCAGAAGCGGCTCGGTATCAGGAAATCCCAAAGGTATAAAGGGA AACCTCATGAAAGCCATGCAAGGATAGAAAAGCGCAAACATCTCATTAGAAATAAGAGGTGTAAGTGCTATCTCTGTGGAGAAGAAGGACACTTCGCGAGGGAAATGC CCTAATGATCGAAAAAGTGCAAAGAGGGTGGCAATGTTTGAACAACCTGGAACCTACCAGAAGACTATGATATAGTCTCGGTAATGAAGGAGAAGATAATAGCGATGCC ATTTATAGTCTTTCAGAAGGAGAAGATGGAATGGAAGATTTGGGGCAATCACTGAAGAGTCTCATGATCGCAGAAAAGATGTTTATGCTGGGAGAAGAAGATGGAGG CTGGAGGCCTAAGATAAAGGTGAGGATGAACAGCTGGCGTGCCAACATGAGTGGGAACACAACGGTGAATCCAGCAGTTTCGTACACTTAAAGTGTTTGGGATGCA AATGCCAACCAATGAACCGAGCAAGGATGACTGTTCAAGGTGTAAGCCACTGCATGTAACCTGTGCGGCTCTTATTATTTCAAGAAGGAGGTACCAGTACACCAC CGCCACCAACCAATGAACCCGAGGAAGTTGATGCTGGAGCAACAGCAATCATAATGGTGTGAAGTTGAGATAGAAAAGACTTGAAGAAGGAAAGTATCCTACTGG AAGAACTCTATGAAAACGCCCTAAGAGCAACTGGGGTTATCGAAGACCTTCAGAAGGATTATAAGGAGCTACTCAGTGAAGATGAAGAAAAGAGGAAAAGAAGAGC AAAAGGGTAAATGATCATAGACTCCAAGGAAGAAGGAGAACAAGCCAATTTCTTGAAGAAGAAAAGGTCCATAAAGTAGCAGTTCAAGAAGAACAAGACCCAAGAA</p>		

Prilog 3. Nastavak

Oznaka biljke: VG-102	Sorta: Glavinuša	Duljina sekvence: 7144
Sekvenca		
<p>GATGGTAAGAAATATGCTGTATAATTCATTATCGGCATAGACATCCCTGGGGTCGAAAAATTCAGTCAAAGCTATACTGGATACTGGAGCCACCACATGCTGCATTG ATCAGGAATCAATACCAAAAAGAAGCATTGGAGGAAAATACGTATCTGGTTAGGTTACAGCGGAGTTAACTCAACAATGACAGCCAACAAGAAGCTGAAGGGAGGACGTAT GTTTATTGGTGAAAATATGTTTCAAGATTCCGTACACCTACAGCTTCCCTATCAAAATGGAAGATGGAGTCCAGATGATAGTCCGGTTGCAATTTTATAAGGGCAATGTATGG AGGAGTACGAATAGAAGGCAATGTAGTAACCTTTCTACAAGAACCTAACGGTGATCAATACGTCCCAGTCAACAGAGATTGCAAGAATGCTTCAAGAGGATGTTGATGATG AAGAAGTATGGCAGATTCAAGAAGCAGTCTATATCAACATTGGCCAAAGCAGGGAAAGCTTTCTAAAAAGGTTTGAAGCCTTAATCAATCAGCTAAAAGAAGCAGGCTAC ATAGGGGAGAATCCTCTTCAACATTGGGAAAAGAACAGGGTAGTATGCCAGCTAGATATCAAAAACCCTGATTTTATCATTGAAGACAAAACCCTTAAAGCATCTCACTCCA TCAATGAAGGAGTCATTGAGAAGACACACTGAGGCACTATTAAGCTGGGAGTCATAAGACCTAGCAAAAAGTCGTACAGAACAACAGCAATGATAGTCCAGTCAGGGA CTGCTATTGACCCAGTCACAGGGAAGGAGACTAGGGGTAAGGAAAAGAAATGGTCTTCAACTATAAAAGGCTTAATGATCTAACCAACAAGATCAATATAGCCTTCCCTGGA ATCAGTACTATCATGAAGAAAGTGGGAAATAGTCGGATCTACTCAAAGTTCGATCTAAAAAGCGGATTCATCAAGTGGCAATGCACCCAGATTCTATAGAATGGACAGC CTTTTGGGTTCTGATGGGCTGTATGAGTGGCTTGTATGCCATTTGGTCTCAAGAATGCCCTGCAGTTTTCCAGAGAAAAATGGATCATTGTTTCAAAGGCACTGAGG ATTTTCATAGCAGTCTACATAGATGACATCCTAGTCTTCTCAGAAAATGAGCAAGATCATGCCAGACACTTGAAGAAAATGCTTCAGATTTGCAAGGAAAATGGGCTTGTCC TGAGCCCAACAAAAATGAAGATAGCAGTCCAGGAGATTGAATTTCTCGGGCAGTAATTGGCAATAGGAAGATTGACTTCAGCCCCACATCATTCAAAGATTGCGAGC TTCAAGAATGAGGAGCTCAAGGAAAGAAAAGGGCCTAAGATCTTGGCTCGGGCTACTAAATTATGCGAGAACCTACATCCCAAATTTGGGCCGATTGCTAAGCCCATTATA CGCAAAGACCAGTCCAACAGGCGACAAACGGATGAACTCGCAAGATTGGAAGACTAGTGGCCGACATTAAGAATCTTGTACAAAAACTGCCAGACCTGGAGGTCCCACCA GAAAGTTGCTATATCGTGCTGGAAACAGATGGATGCATGACAGGCTGGGGAGGAATATGCAAATGGAAGATGCTAAAGCATGACCCCAAAAGCAGTGAAGGATTTGCG CATATGCAAGTGGTAAATCAATCCAGTTAAATCCACAATAGATGCCGAGATCTATGCCGTAATGAACACGCTAGAATCTCTCAAAATCTACTACTTGGATAAGAAGGAAG TCACTATCAGGACTGATTGTCAAGCCATTAATTCCTTCTTCAACAAGTCTGCACAGAATAAACCTTCTAGGGTAAGATGGTTATCCTTTACTGATTATATAACTGGAGTCGG AGTTCTATAAACTTGAACACATCGAGGGAAAGGATAATCTACTAGCTGACAACCTGTCAAGACTAGTAAGCACACTTTGCCTAGGATGGAGCACACCCGGAGAAGGAG CAACAGCTACATTTTCTGGAACAGCCATGGAAGAAGTAAAACAGAAACCCAACAAGGGCATCTCATTACAACCAACCAAAACAATTGGGAAAATGGTGAGCTTTTTCGA AGTACTCAAACACAGTGCAGAGAGGGCATGAACCGGGAGGAATTTCAATGTCAGAATTCACCAAACCTCAGAGCCCAGCTTAAAGAAATTTGAATCCCTGGCAATCACAC GAGCACTCGTATGCCTCAAAGAAGTCAAGGATATACACACAACCAAGTTGGATGAATGCAGGAAATCAAGCTCCACAGGAAGAGATGGGAATTAAGTGGTCAAGACCACCA CCCATCATGTCAACTCCATGACAGAGATCTCGAAGAAATCCTTAACAAGCTGGAAAGGGTAGCAGCAGATGTTCAAAGTTCTCACTTTAGGCGGAAGTGGTGGACCCA ACCAAGGCTGAGCCGACCTTCATCATCGGCCTTATCTGCTTGTGTTGGGATGTGTGAGCCACTTTGTGTTGTCTGACAATACCTTGGGAGCCTCATGTTTTGGCCCC TGGTTTTCTTAAAGCGTTTTGCTTTAATCATCAAAGGGAATCGTCTTTTAGGACTCAAAGTGGCCGTCCATGTGCCATGGTTCTGTTGCTTGGTCTTCAATGGAAG TTTGAAGCTGTGATGGGGCCCAATGAGCACCCGAGCTCCCTTCTATATAAGACCTTCACTTATCTCATTGCAGACATCAAGCCAGAAGCTTAGAGTCTACTTTGAGGAAA AGTCTTATAAGTCTTGAAGTTTTCTTTGTAAGTTTTCTTTGAATGAAATAAAGTCTGTGATTAGTTCCTTATCTTTATTTTGTGTTGAAGAAGCCGCGCTTTTCAATTTATGG TATCAGAGCTAGTTTCAAGTAAAGTGGCTAATTTTCTTATAAAGTACTCAGGTTAAGGGGAAGGTCTTATTATACTAGTAGTGTATTCAATTTCTGCTAATCAGATCTT GTATTTCAATTATGGTCTGATCCTCTAAGTTGTAGTGCCTAGACAAAAGTATCAAAGCAGCTACCGATAAGGCAGGAGCCGTGAGATCGGGAATACCTTTGATTGAGT CTATGAAAGGCATGAGTTATGATCAGAAAATAGTTTGAATATGAGTCATGTCTGAAAGGTGGGAACAAGAAA</p>		

Prilog 4. Cq vrijednosti dobivene metodom RT-qPCR za GVG (gore) i 18S rRNA (dolje) testiranjem pet zaraženih biljaka sorte Vlaška (VVL-112, VVL-113, VVL-114, VVL-122 i VVL-123) tijekom 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala (rozgve: 26.11. – 01.03.; mladice: 04.04.; peteljke: 18.05. – 13.11.) u vegetacijskoj sezoni 2019. godine, uključujući srednje vrijednosti aritmetičkih sredina, standardne devijacije i standardne pogreške aritmetičkih sredina. Najmanje Cq vrijednosti prema terminima uzorkovanja su označene crveno, a najveće zeleno.

GVG	01.03.	04.04.	18.05.	01.06.	20.06.	10.07.	20.07.	01.08.	20.08.	01.09.	21.09.	10.10.	23.10.	13.11.	26.11.	15.12.	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna pogreška aritmetičke sredine
VVL-112	27,83	27,81	27,66	26,54	24,12	24,37	24,55	25,32	25,56	25,35	25,46	26,18	25,26	25,81	24,77	27,03	25,85	1,22	0,30
VVL-113	28,11	28,05	26,42	24,67	23,23	23,35	24,03	24,10	26,37	24,14	23,29	24,72	24,03	24,17	25,41	27,42	25,09	1,67	0,42
VVL-114	28,21	29,94	28,52	25,69	23,86	21,81	25,36	23,97	26,59	25,63	24,30	25,93	24,59	25,60	28,21	28,69	26,06	2,18	0,54
VVL-122	n.t.	28,91	30,50	33,18	28,99	31,87	25,54	29,61	27,05	26,31	26,09	25,41	27,03	27,14	25,61	29,60	28,19	2,42	0,63
VVL-123	26,93	29,49	31,73	29,34	25,18	25,60	26,78	24,99	26,89	24,95	24,98	25,85	25,48	25,42	25,85	28,59	25,96	1,06	0,30
Aritmetička sredina	27,78	28,84	28,97	27,89	24,10	23,78	25,25	24,60	26,35	25,28	24,83	25,62	24,84	25,25	25,41	28,26			
Standardna devijacija	0,58	0,91	2,15	3,43	0,81	1,60	1,05	0,66	0,57	0,80	1,08	0,57	0,66	0,74	0,46	1,04			
Standardna pogreška aritmetičke sredine	0,29	0,41	0,96	1,53	0,41	0,80	0,47	0,33	0,29	0,36	0,48	0,26	0,33	0,37	0,23	0,46			
18S rRNA	01.03.	04.04.	18.05.	01.06.	20.06.	10.07.	20.07.	01.08.	20.08.	01.09.	21.09.	10.10.	23.10.	13.11.	26.11.	15.12.	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna pogreška aritmetičke sredine
VVL-112	11,87	11,33	12,74	14,97	14,43	13,84	13,82	16,18	15,03	14,59	17,81	17,12	17,56	20,37	12,05	11,88	14,72	2,55	0,64
VVL-113	11,66	9,87	12,39	14,33	14,23	13,44	14,01	13,88	14,88	14,07	15,68	16,39	19,77	20,62	12,19	11,98	13,50	1,73	0,46
VVL-114	12,12	9,43	12,93	13,78	14,12	13,41	13,88	14,03	14,86	14,39	16,38	18,91	19,99	21,64	13,87	11,92	13,57	0,91	0,28
VVL-122	n.t.	10,73	13,25	12,02	15,34	11,97	11,28	14,06	13,01	13,07	16,43	15,60	21,01	21,73	12,12	12,27	13,16	1,74	0,48
VVL-123	12,66	9,24	13,00	14,18	14,45	13,00	13,45	13,21	14,39	14,92	16,77	17,42	16,96	20,59	12,23	12,11	14,20	1,76	0,47
Aritmetička sredina	12,08	10,12	12,86	14,31	14,31	13,42	13,79	13,99	14,79	14,49	16,53	17,09	19,06	20,99	12,15	12,03			
Standardna devijacija	0,44	0,88	0,32	0,49	0,16	0,35	0,24	0,10	0,28	0,35	0,21	1,24	1,72	0,64	0,08	0,16			
Standardna pogreška aritmetičke sredine	0,22	0,40	0,14	0,25	0,08	0,17	0,12	0,06	0,14	0,18	0,12	0,55	0,77	0,29	0,04	0,07			

n.t. – nije testirano

Prilog 5. Cq vrijednosti dobivene metodom qPCR za GBV-1 testiranjem pet zaraženih biljaka sorte 'Plavac mali' (PMC-022, PMC-235, PMC-245, PMC-282 i PMC-313) tijekom 16 razdoblja uzorkovanja biljnog materijala (rozgve: 26.11. – 01.03.; mladice: 04.04.; peteljke: 18.05. – 13.11.) u vegetacijskoj sezoni 2019. godine, uključujući srednje vrijednosti aritmetičkih sredina, standardne devijacije i standardne pogreške aritmetičkih sredina. Najmanje Cq vrijednosti prema terminima uzorkovanja su označene crveno, a najveće zeleno.

GBV-1	01.03.	04.04.	18.05.	01.06.	20.06.	10.07.	20.07.	01.08.	20.08.	01.09.	21.09.	10.10.	23.10.	13.11.	26.11.	15.12.	Aritmetička sredina	Standardna devijacija	Standardna pogreška aritmetičke sredine
PMC-022	29,89	N	N	26,78	28,32	29,77	29,08	25,80	29,00	29,07	30,28	29,47	31,02	28,90	25,09	25,38	28,42	1,89	0,51
PMC-235	20,48	28,10	33,99	23,07	21,33	22,75	31,08	23,68	26,20	22,51	22,52	22,63	22,75	23,75	22,56	19,70	22,91	0,48	0,16
PMC-245	24,63	27,81	23,86	26,59	26,26	28,89	26,43	29,11	29,33	24,70	25,99	26,14	27,49	25,74	23,93	24,14	26,31	1,82	0,45
PMC-282	21,53	29,02	27,96	25,19	28,12	26,70	24,27	24,54	26,89	26,11	25,14	27,46	25,85	29,14	21,01	21,21	25,63	2,62	0,66
PMC-313	n.t.	N	25,79	23,19	22,39	26,36	23,50	27,94	26,17	21,48	23,62	21,65	25,13	23,25	23,58	23,99	24,25	1,95	0,52
Aritmetička sredina	24,13	28,31	27,90	24,96	25,29	26,89	26,87	26,21	27,52	24,77	24,32	25,47	26,45	26,15	23,23	22,88			
Standardna devijacija	4,22	0,63	4,39	1,79	3,25	2,73	3,20	2,28	1,53	3,01	1,55	3,28	3,07	2,78	1,53	2,34			
Standardna pogreška aritmetičke sredine	2,11	0,37	2,20	0,80	1,45	1,22	1,43	1,02	0,69	1,35	0,77	1,47	1,37	1,24	0,69	1,05			

n.t. – nije testirano

N – negativno

Prilog 6. Nastavak

	76	150
VID561 NC_040616	A AAAAGAGCTT AACCAT AATATACTTAGTAATATATT CGGTAATATAGGTATAAATAGGTACTAGTGCTAAGATAA	
VID567 MF405925		
VID499 MF405924		
VLJ-178 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF781081 (K)	G	T
VVL-101 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993575 (K)	G	T
VD-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993574 (K)	G	T
VB-108 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993573 (K)	G	T
VVL-150 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON000923 (K)	A	T
VM-160 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON112087 (K)		C
PI8938 MK017693	G	T
PI8936 MK017692	G	T
PI8932 MK017690	G	T
CH8935 MK017691	G	T
otok Krk-Pod Moču (Žlahtina 7) OM960634 (V)		T
otok Rava-Mala Rava (Plavina 28) OM960635 (V)	G	T
otok Rava-Mala Rava (Plavina 35) OM960636 (V)	G	T
otok Rava-Mala Rava (Plavina 36) OM960637 (V)	G	T
otok Rava-Mala Rava (Plavina 41) OM960638 (V)	G	T
otok Rava-Vela Rava (Plavina 40) OM960639 (V)		T
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM960640 (V)		T
otok Rava-Vela Rava (Plavina 55) OM960641 (V)		T
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 2) OM960642 (V)		T
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 3) OM960643 (V)		T
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 20) OM960644 (V)		T
Kaštela-Radun (Ljutun 38) OM960645 (V)		T
Kaštela-Radun (Ljutun 53) OM960646 (V)		T
Kaštela-Radun (Ljutun 54) OM960647 (V)		T
Kaštela-Furnaže (Mladenka 50) OM960648 (V)		T
Kaštela-Marceline (Vlaška 51) OM960649 (V)	A	T
Kaštela-Marceline (Vlaška 52) OM960650 (V)	A	T
Kaštela-Marceline (Vlaška 53) OM960651 (V)	A	T
Kaštela-Marceline (Vlaška 54) OM960652 (V)	A	T
Kaštela-Stomarija (Babica 25) OM960653 (V)		T
Kaštela-Stomarija (Babica 30) OM960654 (V)		T
Kaštela-Stomarija (Babica 45) OM960655 (V)		T
Kaštela-Bristi 2 (Babica 17) OM960656 (V)	G	T
Kaštela-Bristi 2 (Babica 19) OM960657 (V)	G	T
Split (Cipar) OM960658 (K)	G	T
Split (Silbijanac) OM960659 (K)	G	T
Split (Gegić) OM960660 (K)		T
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Silbijanac 1) OM960661 (K)	G	T
otok Pag-Pag 3 (Gegić 5) OM960662 (V)	G	T
otok Šolta-Srednje Selo 2 (Dobričić 11) OM960663 (V)		T
otok Šolta-Gornje Selo 2 (Dobričić 22) OM960664 (V)		T
Nin (Maraština 9) OM960665 (V)	G	T
Zemunik (Plavina 15) OM960666 (V)	G	T
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 15) OM960667 (V)		T
Primošten-Bucavac (Babić 20) OM960668 (V)	G	T

Prilog 6. Nastavak

	301	375
VID561 NC_040616	C AACCCCTGCGTCAAATGTTGTAACCTTTTGCAAATGAGGCTTACCATTATCTGAAGGCTGCAGCTAATAGTGGAG	
VID567 MF405925		
VID499 MF405924		
VLJ-178 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF781081 (K)	T A	T
VVL-101 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993575 (K)	T A	T C
VD-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993574 (K)	A T A	C C G C
VB-108 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993573 (K)	T A	T T C C
VVL-150 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON000923 (K)	T A	T C C
VM-160 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON112087 (K)	A A	T C
PI8938 MK017693	T A T C G G G	T C T C C
PI8936 MK017692	T A T C G G	T C T C C
PI8932 MK017690	T A T C G G	T C T C C
CH8935 MK017691	T A T C G G	T C T C C
otok Krk-Pod Moču (Žlahtina 7) OM960634 (V)	T A A G	T T C C
otok Rava-Mala Rava (Plavina 28) OM960635 (V)	A T A	T T C G
otok Rava-Mala Rava (Plavina 35) OM960636 (V)	A T A	T T C G
otok Rava-Mala Rava (Plavina 36) OM960637 (V)	A T A	T T C G
otok Rava-Mala Rava (Plavina 41) OM960638 (V)	A T A	T T C G
otok Rava-Vela Rava (Plavina 40) OM960639 (V)	A A G	T T C C
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM960640 (V)	A A G	T T C C
otok Rava-Vela Rava (Plavina 55) OM960641 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 2) OM960642 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 3) OM960643 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 20) OM960644 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Radun (Ljutun 38) OM960645 (V)	A A G C	T T C C
Kaštela-Radun (Ljutun 53) OM960646 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Radun (Ljutun 54) OM960647 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Furnaže (Mladenka 50) OM960648 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Marceline (Vlaška 51) OM960649 (V)	T A G C C	T T C C T
Kaštela-Marceline (Vlaška 52) OM960650 (V)	T A G C C	T T C C T
Kaštela-Marceline (Vlaška 53) OM960651 (V)	T A G C C	T T C C T
Kaštela-Marceline (Vlaška 54) OM960652 (V)	T A G C C	T T C C T
Kaštela-Stomarija (Babica 25) OM960653 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Stomarija (Babica 30) OM960654 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Stomarija (Babica 45) OM960655 (V)	A A G	T T C C
Kaštela-Bristi 2 (Babica 17) OM960656 (V)	A T A C G	T T C C G
Kaštela-Bristi 2 (Babica 19) OM960657 (V)	A T A C G	T T C C G
Split (Cipar) OM960658 (K)	A T A C G	T T C C G
Split (Silbijanac) OM960659 (K)	A T A C G	T T C C G
Split (Gegić) OM960660 (K)	A A G	T T C C
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Silbijanac 1) OM960661 (K)	A T A C G	T T C C G
otok Pag-Pag 3 (Gegić 5) OM960662 (V)	A T A C	T T C C G
otok Šolta-Srednje Selo 2 (Dobričić 11) OM960663 (V)	A A G	T T C C
otok Šolta-Gornje Selo 2 (Dobričić 22) OM960664 (V)	A A G	T T C C
Nin (Maraština 9) OM960665 (V)	A T A C	T T C C G
Zemunik (Plavina 15) OM960666 (V)	A T A C A	T T C C G
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 15) OM960667 (V)	A A G	T T C C
Primošten-Bucavac (Babić 20) OM960668 (V)	A T A C	T T C C G

Prilog 6. Nastavak

	451																			525																	
VID561 NC_040616	G	T	C	T	C	G	C	A	A	T	A	T	C	T	A	G	G	C	T	T	A	C	C	G	T	T	C	T	T	C	G	A	A	C	T	G	
VID567 MF405925																																					A
VID499 MF405924																																					A
VLJ-178 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF781081 (K)	T																																				A
VVL-101 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993575 (K)	T																																				A
VD-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993574 (K)	T																																			A	
VB-108 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993573 (K)	T																																			A	
VVL-150 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON000923 (K)	T																																			A	
VM-160 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON112087 (K)	T																																			A	
PI8938 MK017693																																					
PI8936 MK017692																																					
PI8932 MK017690																																					
CH8935 MK017691																																					
otok Krk-Pod Moču (Žlahtina 7) OM960634 (V)	T																																				
otok Rava-Mala Rava (Plavina 28) OM960635 (V)	T																																				
otok Rava-Mala Rava (Plavina 35) OM960636 (V)	T																																				
otok Rava-Mala Rava (Plavina 36) OM960637 (V)	T																																				
otok Rava-Mala Rava (Plavina 41) OM960638 (V)	T																																				
otok Rava-Vela Rava (Plavina 40) OM960639 (V)	T																																				
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM960640 (V)	T																																				
otok Rava-Vela Rava (Plavina 55) OM960641 (V)	T																																				
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 2) OM960642 (V)	T																																				
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 3) OM960643 (V)	T																																				
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 20) OM960644 (V)	T																																				
Kaštela-Radun (Ljutun 38) OM960645 (V)	T																																				
Kaštela-Radun (Ljutun 53) OM960646 (V)	T																																				
Kaštela-Radun (Ljutun 54) OM960647 (V)	T																																				
Kaštela-Furnaže (Mladenka 50) OM960648 (V)	T																																				
Kaštela-Marceline (Vlaška 51) OM960649 (V)	T																																				
Kaštela-Marceline (Vlaška 52) OM960650 (V)	T																																				
Kaštela-Marceline (Vlaška 53) OM960651 (V)	T																																				
Kaštela-Marceline (Vlaška 54) OM960652 (V)	T																																				
Kaštela-Stomarija (Babica 25) OM960653 (V)	T																																				
Kaštela-Stomarija (Babica 30) OM960654 (V)	T																																				
Kaštela-Stomarija (Babica 45) OM960655 (V)	T																																				
Kaštela-Bristi 2 (Babica 17) OM960656 (V)	T																																				
Kaštela-Bristi 2 (Babica 19) OM960657 (V)	T																																				
Split (Cipar) OM960658 (K)	T																																				
Split (Silbijanac) OM960659 (K)	T																																				
Split (Gegić) OM960660 (K)	T																																				
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Silbijanac 1) OM960661 (K)	T																																				
otok Pag-Pag 3 (Gegić 5) OM960662 (V)	T																																				
otok Šolta-Srednje Selo 2 (Dobričić 11) OM960663 (V)	T																																				
otok Šolta-Gornje Selo 2 (Dobričić 22) OM960664 (V)	T																																				
Nin (Maraština 9) OM960665 (V)	T																																				
Zemunik (Plavina 15) OM960666 (V)	T																																				
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 15) OM960667 (V)	T																																				
Primošten-Bucavac (Babić 20) OM960668 (V)	T																																				

Prilog 6. Nastavak

	526											564																					
VID561 NC_040616	A	A	G	G	G	G	C	C	A	A	G	G	T	G	T	T	G	A	A	G	C	C	A	A	G	C	A	A	T	G	T	G	G
VID567 MF405925
VID499 MF405924
VLJ-178 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF781081 (K)	.	.	C	G	A	.	C	C	
VVL-101 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993575 (K)	.	.	C	G	A	.	C	C	
VD-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993574 (K)	G	.	C	A	.	C	C	
VB-108 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993573 (K)	.	.	C	G	A	.	C	C	
VVL-150 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON000923 (K)	.	.	C	G	A	.	C	C	
VM-160 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON112087 (K)	G	.	C	G	A	.	C	C	
PI8938 MK017693
PI8936 MK017692
PI8932 MK017690
CH8935 MK017691
otok Krk-Pod Moču (Žlahtina 7) OM960634 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
otok Rava-Mala Rava (Plavina 28) OM960635 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
otok Rava-Mala Rava (Plavina 35) OM960636 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
otok Rava-Mala Rava (Plavina 36) OM960637 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
otok Rava-Mala Rava (Plavina 41) OM960638 (V)	G	.	C	C	.	.	A	.	C	C	
otok Rava-Vela Rava (Plavina 40) OM960639 (V)	G	.	C	G	A	.	C	G	C	
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM960640 (V)	G	.	C	G	A	.	C	G	G	C	
otok Rava-Vela Rava (Plavina 55) OM960641 (V)	G	.	C	G	A	.	C	G	C	
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 2) OM960642 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 3) OM960643 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 20) OM960644 (V)	G	.	C	C	.	.	A	.	C	C	
Kaštela-Radun (Ljutun 38) OM960645 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Radun (Ljutun 53) OM960646 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Radun (Ljutun 54) OM960647 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Furnaže (Mladenka 50) OM960648 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Marceline (Vlaška 51) OM960649 (V)	.	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Marceline (Vlaška 52) OM960650 (V)	.	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Marceline (Vlaška 53) OM960651 (V)	.	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Marceline (Vlaška 54) OM960652 (V)	.	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Stomarija (Babica 25) OM960653 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Stomarija (Babica 30) OM960654 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Stomarija (Babica 45) OM960655 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Kaštela-Bristi 2 (Babica 17) OM960656 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
Kaštela-Bristi 2 (Babica 19) OM960657 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
Split (Cipar) OM960658 (K)	G	.	C	C	
Split (Silbijanac) OM960659 (K)	G	.	C	A	.	C	C	
Split (Gegić) OM960660 (K)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Silbijanac 1) OM960661 (K)	G	.	C	A	.	C	C	
otok Pag-Pag 3 (Gegić 5) OM960662 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
otok Šolta-Srednje Selo 2 (Dobričić 11) OM960663 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
otok Šolta-Gornje Selo 2 (Dobričić 22) OM960664 (V)	G	.	C	G	A	.	C	C	
Nin (Maraština 9) OM960665 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
Zemunik (Plavina 15) OM960666 (V)	G	.	C	A	.	C	C	
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 15) OM960667 (V)	G	.	C	G	A	.	C	G	C	
Primošten-Bucavac (Babić 20) OM960668 (V)	G	.	C	A	.	C	C	

Prilog 7. Nastavak

	66	130
VID561 NC_040616	L N P N L L K G E D I K L G E I L V T M I V V S K A A D G P P M G G A T L R Q M C E P F A N E A Y H Y L K A A A N S G V Y T N L A	
VID567 MF405925		
VID499 MF405924		
VLJ-178 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF781081 (K)	A	C
VVL-101 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993575 (K)	A	
VD-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993574 (K)	A	
VB-108 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993573 (K)	A	
VVL-150 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON000923 (K)	A	R
VM-160 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON112087 (K)		
PI8938 MK017693		
PI8936 MK017692		
PI8932 MK017690		
CH8935 MK017691		
otok Krk-Pod Moču (Žlahtina 7) OM960634 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 28) OM960635 (V)	R	E
otok Rava-Mala Rava (Plavina 35) OM960636 (V)	R	E
otok Rava-Mala Rava (Plavina 36) OM960637 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 41) OM960638 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 40) OM960639 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM960640 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 55) OM960641 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 2) OM960642 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 3) OM960643 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 20) OM960644 (V)	K	
Kaštela-Radun (Ljutun 38) OM960645 (V)		
Kaštela-Radun (Ljutun 53) OM960646 (V)		C
Kaštela-Radun (Ljutun 54) OM960647 (V)		C
Kaštela-Furnaže (Mladenka 50) OM960648 (V)	K	
Kaštela-Marceline (Vlaška 51) OM960649 (V)	A	R
Kaštela-Marceline (Vlaška 52) OM960650 (V)	A	R
Kaštela-Marceline (Vlaška 53) OM960651 (V)	A	R
Kaštela-Marceline (Vlaška 54) OM960652 (V)	A	R
Kaštela-Stomarija (Babica 25) OM960653 (V)	R	
Kaštela-Stomarija (Babica 30) OM960654 (V)		
Kaštela-Stomarija (Babica 45) OM960655 (V)		
Kaštela-Bristi 2 (Babica 17) OM960656 (V)		
Kaštela-Bristi 2 (Babica 19) OM960657 (V)		
Split (Cipar) OM960658 (K)		
Split (Silbijanac) OM960659 (K)		
Split (Gegić) OM960660 (K)		
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Silbijanac 1) OM960661 (K)		
otok Pag-Pag 3 (Gegić 5) OM960662 (V)		
otok Šolta-Srednje Selo 2 (Dobričić 11) OM960663 (V)	R	
otok Šolta-Gornje Selo 2 (Dobričić 22) OM960664 (V)		
Nin (Maraština 9) OM960665 (V)		
Zemunik (Plavina 15) OM960666 (V)		
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 15) OM960667 (V)		
Primošten-Bucavac (Babić 20) OM960668 (V)		

Prilog 7. Nastavak

	131	187
	VID561 NC_040616	K K M T R A G N K E P Q V M F D F S K G L A I S R L T R S E A S V M Q V M H Q R V F R T E G A K G V F E A Q S N V
	VID567 MF405925	
	VID499 MF405924	
VLJ-178 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF781081 (K)		
VVL-101 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993575 (K)		
VD-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993574 (K)		
VB-108 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) MF993573 (K)		
VVL-150 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON000923 (K)		
VM-160 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) ON112087 (K)		
	PI8938 MK017693	
	PI8936 MK017692	
	PI8932 MK017690	
	CH8935 MK017691	
otok Krk-Pod Moču (Žlahtina 7) OM960634 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 28) OM960635 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 35) OM960636 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 36) OM960637 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 41) OM960638 (V)		Q
otok Rava-Vela Rava (Plavina 40) OM960639 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM960640 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 55) OM960641 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 2) OM960642 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 3) OM960643 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 20) OM960644 (V)		Q
Kaštela-Radun (Ljutun 38) OM960645 (V)		
Kaštela-Radun (Ljutun 53) OM960646 (V)		
Kaštela-Radun (Ljutun 54) OM960647 (V)		
Kaštela-Furnaže (Mladenka 50) OM960648 (V)		
Kaštela-Marceline (Vlaška 51) OM960649 (V)		
Kaštela-Marceline (Vlaška 52) OM960650 (V)		
Kaštela-Marceline (Vlaška 53) OM960651 (V)		
Kaštela-Marceline (Vlaška 54) OM960652 (V)		
Kaštela-Stomarija (Babica 25) OM960653 (V)		
Kaštela-Stomarija (Babica 30) OM960654 (V)		
Kaštela-Stomarija (Babica 45) OM960655 (V)		
Kaštela-Bristi 2 (Babica 17) OM960656 (V)		
Kaštela-Bristi 2 (Babica 19) OM960657 (V)		
Split (Cipar) OM960658 (K)		
Split (Silbijanac) OM960659 (K)		
Split (Gegić) OM960660 (K)		
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Silbijanac 1) OM960661 (K)		
otok Pag-Pag 3 (Gegić 5) OM960662 (V)		
otok Šolta-Srednje Selo 2 (Dobričić 11) OM960663 (V)		
otok Šolta-Gornje Selo 2 (Dobričić 22) OM960664 (V)		
Nin (Maraština 9) OM960665 (V)		
Zemunik (Plavina 15) OM960666 (V)		
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 15) OM960667 (V)		
Primošten-Bucavac (Babić 20) OM960668 (V)		

Prilog 8. Usporedba djelomične nukleotidne sekvence gena reverzne transkriptaze (RT, 375 nts) od 54 istraživanjem utvrđenih GBV-1 izolata i referentnog izolata VLJ-178 (NC_055481). Izolati su prikazani po mjestu i lokaciji podrijetla u Hrvatskoj, pripadajućim imenima sorata, brojem uzorkovane biljke u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.

	1	75
VLJ-178 NC_055481 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	A C T A T A A G A G G C T T A A T G A T C T A A C C A A C A A A G A T C A A T A T A G C C T T C C T G G A A T C A G T A C T A T C A T G A A G A A A G	
PMC-235 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	A	
PMC-282 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	A	C A G
PMC-313 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	A	
VG-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	A	
otok Hvar-Crkvenik (Plavac mali 44) OM320512 (V)	A	G A
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 5) OM320509 (V)	A	
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 6) OM320510 (V)	A	G
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 25) OM320511 (V)	A	
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 6) OM320497 (V)	A	
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 7) OM320498 (V)	A	
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 36) OM320499 (V)	C	
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac Mali 6) OM320505 (V)	A	C G
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 23) OM320506 (V)	A	
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 24) OM320507 (V)	A	
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 46) OM320508 (V)	A	C
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 20) OM320491 (V)	A	
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 30) OM320492 (V)	A	
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 31) OM320493 (V)	A	
Kaštela-Furnaže (Mladenka 32) OM320503 (V)	A	
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 6) OM320500 (V)	A	
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 7) OM320501 (V)	A	
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 19) OM320502 (V)	A	
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crijenak kaštelanski 1) OM320529 (V)	A	
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 26) OM320494 (V)	A	
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 50) OM320495 (V)	A	G
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 34) OM320496 (V)	A	
Kaštela-Radun (Ljutun 5) OM320522 (V)	C	
Kaštela-Stomorija (Babica 41) OM320504 (V)	A	C C G
Nin (Maraština 18) OM320527 (V)	T	
Poreč-Kršete (Borčonja 61) OM320482 (V)	A	
Primošten-Bucavac (Babić 2) OM320530 (V)	A	
otok Rava-Mala Rava (Plavina 100) OM320485 (V)	A	
otok Paq-Paq 4 (Paška maraština 17) OM320524 (V)	A	C A
otok Rava-Mala Rava (Plavina 101) OM320486 (V)	A	
otok Rava-Mala Rava (Plavina 29) OM320483 (V)	A	
otok Rava-Mala Rava (Plavina 55) OM320484 (V)	T	C
otok Rava-Vela Rava (Plavina 76) OM320490 (V)	A	
otok Rava-Vela Rava (Plavina 1) OM320488 (V)	A	
otok Rava-Vela Rava (Plavina 3) OM320489 (V)	A	
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM320487 (V)	A	
otok Šolta-Gornje Selo 3 (Dobričić 38) OM320526 (V)	A	
otok Šolta-Srednje Selo 3 (Plavac mali 22) OM320525 (V)	A	T G
Split (Bak) OM320516 (K)	A	
Split (Dobričić) OM320519 (K)	A	
Split (Plavina) OM320520 (K)	A	G
Split (Šarica trišnjeвица) OM320517 (K)	A	T G
Split (Topol) OM320521 (K)	A	C
Split (nepoznata) OM320518 (K)	A	G
otok Vis (Plavac mali 115) OM320515 (V)	A	G
otok Vis (Plavac mali 27) OM320513 (V)	A	T
otok Vis (Plavac mali 28) OM320514 (V)	A	T
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Galac) OM320523 (K)	A	
Zbirka virusa vinove loze SZAF (Plavac mali 22) OM320531 (K)	A	G
Zemunik Donji (Plavina 29) OM320528 (V)	A	

Prilog 8. Nastavak

	76	150
VLJ-178 NC_055481 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	TGGGAAATAGTTCGGATTTACTCAAAATTTCGAC	TTAAAAAGCGGATTCCATCAAGTAGCGGATGCACCCAGATTCTA
PMC-235 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		G
PMC-282 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		T
PMC-313 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		T
VG-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		G
otok Hvar-Crkvenik (Plavac mali 44) OM320512 (V)	A	C
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 5) OM320509 (V)		G
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 6) OM320510 (V)		G
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 25) OM320511 (V)		G
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 6) OM320497 (V)		G
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 7) OM320498 (V)		G
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 36) OM320499 (V)		G
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac Mali 6) OM320505 (V)		G
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 23) OM320506 (V)		G
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 24) OM320507 (V)		G
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 46) OM320508 (V)		G
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 20) OM320491 (V)		A
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 30) OM320492 (V)		A
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 31) OM320493 (V)		A
Kaštela-Furnaže (Mladenka 32) OM320503 (V)	T	G
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 6) OM320500 (V)		C
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 7) OM320501 (V)		C
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 19) OM320502 (V)		C
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crijenak kaštelanski 1) OM320529 (V)	C	G
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 26) OM320494 (V)	C	A
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 50) OM320495 (V)		A
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 34) OM320496 (V)		T
Kaštela-Radun (Ljutun 5) OM320522 (V)		A
Kaštela-Stomorija (Babica 41) OM320504 (V)		T
Nin (Maraština 18) OM320527 (V)		T
Poreč-Kršete (Borqonja 61) OM320482 (V)		A
Primošten-Bucavac (Babić 2) OM320530 (V)		G
otok Rava-Mala Rava (Plavina 100) OM320485 (V)		A
otok Paq-Paq 4 (Paška maraština 17) OM320524 (V)		T
otok Rava-Mala Rava (Plavina 101) OM320486 (V)		A
otok Rava-Mala Rava (Plavina 29) OM320483 (V)		G
otok Rava-Mala Rava (Plavina 55) OM320484 (V)		A
otok Rava-Vela Rava (Plavina 76) OM320490 (V)		A
otok Rava-Vela Rava (Plavina 1) OM320488 (V)		G
otok Rava-Vela Rava (Plavina 3) OM320489 (V)		A
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM320487 (V)		G
otok Šolta-Gornje Selo 3 (Dobričić 38) OM320526 (V)		T
otok Šolta-Srednje Selo 3 (Plavac mali 22) OM320525 (V)	C	A
Split (Bak) OM320516 (K)		C
Split (Dobričić) OM320519 (K)		A
Split (Plavina) OM320520 (K)		G
Split (Šarica trišnjeвица) OM320517 (K)		A
Split (Topol) OM320521 (K)		G
Split (nepoznata) OM320518 (K)		T
otok Vis (Plavac mali 115) OM320515 (V)	A	
otok Vis (Plavac mali 27) OM320513 (V)		C
otok Vis (Plavac mali 28) OM320514 (V)		A
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Galac) OM320523 (K)	C	T
Zbirka virusa vinove loze SZAF (Plavac mali 22) OM320531 (K)		G
Zemunik Donji (Plavina 29) OM320528 (V)		T

Prilog 8. Nastavak

	151	225
VLJ-178 NC_055481 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	T A G A A T G G A C A G C C T T T T G G G T T C C T G A T G G G C T G T A T G A A T G G C T T G T T A T G C C A T T T G G T C T C A A G A A T G C C C	
PMC-235 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
PMC-282 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		T
PMC-313 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
VG-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		G
otok Hvar-Crkvenik (Plavac mali 44) OM320512 (V)		A
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 5) OM320509 (V)	T	
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 6) OM320510 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 25) OM320511 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 6) OM320497 (V)		A
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 7) OM320498 (V)		A
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 36) OM320499 (V)		A
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac Mali 6) OM320505 (V)		C
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 23) OM320506 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 24) OM320507 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 46) OM320508 (V)		T
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 20) OM320491 (V)		
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 30) OM320492 (V)		
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 31) OM320493 (V)		
Kaštela-Furnaže (Mladenka 32) OM320503 (V)	A	
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 6) OM320500 (V)		G
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 7) OM320501 (V)		G
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 19) OM320502 (V)		G
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crijenak kaštelanski 1) OM320529 (V)		T
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 26) OM320494 (V)		A
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 50) OM320495 (V)		A
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 34) OM320496 (V)		A
Kaštela-Radun (Ljutun 5) OM320522 (V)		C
Kaštela-Stomorija (Babica 41) OM320504 (V)		G
Nin (Maraština 18) OM320527 (V)		
Poreč-Kršete (Borqonja 61) OM320482 (V)		C
Primošten-Bucavac (Babić 2) OM320530 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 100) OM320485 (V)		T
otok Paq-Paq 4 (Paška maraština 17) OM320524 (V)		A
otok Rava-Mala Rava (Plavina 101) OM320486 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 29) OM320483 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 55) OM320484 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 76) OM320490 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 1) OM320488 (V)		C
otok Rava-Vela Rava (Plavina 3) OM320489 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM320487 (V)		
otok Šolta-Gornje Selo 3 (Dobričić 38) OM320526 (V)		
otok Šolta-Srednje Selo 3 (Plavac mali 22) OM320525 (V)		
Split (Bak) OM320516 (K)	T	
Split (Dobričić) OM320519 (K)		
Split (Plavina) OM320520 (K)		
Split (Šarica trišnjeвица) OM320517 (K)		
Split (Topol) OM320521 (K)		
Split (nepoznata) OM320518 (K)		
otok Vis (Plavac mali 115) OM320515 (V)	T	
otok Vis (Plavac mali 27) OM320513 (V)		
otok Vis (Plavac mali 28) OM320514 (V)		
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Galac) OM320523 (K)		T
Zbirka virusa vinove loze SZAF (Plavac mali 22) OM320531 (K)	T	
Zemunik Donji (Plavina 29) OM320528 (V)		

Prilog 8. Nastavak

	301	375
VLJ-178 NC_055481 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	T C C T G G T C T T C T C A G A A A A T G A G C A A G A T C A T G C C A G A C A T T T G A A G A T A A T G C T T C A G A T T T G C A A G G A A A A T G	
PMC-235 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		T
PMC-282 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		A
PMC-313 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	A	
VG-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	A	
otok Hvar-Crkvenik (Plavac mali 44) OM320512 (V)		A
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 5) OM320509 (V)		A
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 6) OM320510 (V)		G
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 25) OM320511 (V)		C
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 6) OM320497 (V)		A
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 7) OM320498 (V)		G
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 36) OM320499 (V)		A
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac Mali 6) OM320505 (V)		A
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 23) OM320506 (V)		A
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 24) OM320507 (V)		A
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 46) OM320508 (V)	T	G
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 20) OM320491 (V)		A
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 30) OM320492 (V)		A
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 31) OM320493 (V)		A
Kaštela-Furnaže (Mladenka 32) OM320503 (V)	T	G
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 6) OM320500 (V)	A	C
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 7) OM320501 (V)	A	C
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 19) OM320502 (V)	A	C
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crijenak kaštelanski 1) OM320529 (V)	T	
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 26) OM320494 (V)		T
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 50) OM320495 (V)		C
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 34) OM320496 (V)		C
Kaštela-Radun (Ljutun 5) OM320522 (V)		G
Kaštela-Stomorija (Babica 41) OM320504 (V)		C
Nin (Maraština 18) OM320527 (V)		A
Poreč-Kršete (Borqonja 61) OM320482 (V)		G
Primošten-Bucavac (Babić 2) OM320530 (V)		A
otok Rava-Mala Rava (Plavina 100) OM320485 (V)		A
otok Paq-Paq 4 (Paška maraština 17) OM320524 (V)		C
otok Rava-Mala Rava (Plavina 101) OM320486 (V)		C
otok Rava-Mala Rava (Plavina 29) OM320483 (V)		C
otok Rava-Mala Rava (Plavina 55) OM320484 (V)	A	G
otok Rava-Vela Rava (Plavina 76) OM320490 (V)		T
otok Rava-Vela Rava (Plavina 1) OM320488 (V)		A
otok Rava-Vela Rava (Plavina 3) OM320489 (V)		A
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM320487 (V)		A
otok Šolta-Gornje Selo 3 (Dobričić 38) OM320526 (V)		C
otok Šolta-Srednje Selo 3 (Plavac mali 22) OM320525 (V)		C
Split (Bak) OM320516 (K)		A
Split (Dobričić) OM320519 (K)		T
Split (Plavina) OM320520 (K)		C
Split (Šarica trišnjevica) OM320517 (K)		
Split (Topol) OM320521 (K)		A
Split (nepoznata) OM320518 (K)		
otok Vis (Plavac mali 115) OM320515 (V)	T	G
otok Vis (Plavac mali 27) OM320513 (V)		G
otok Vis (Plavac mali 28) OM320514 (V)		G
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Galac) OM320523 (K)		G
Zbirka virusa vinove loze SZAF (Plavac mali 22) OM320531 (K)	T	G
Zemunik Donji (Plavina 29) OM320528 (V)		C

Prilog 9. Usporedba djelomične aminokiselinske sekvence gena reverzne transkriptaze (RT, 124 aa) od 54 istraživanjem utvrđenih GBV-1 izolata i referentnog izolata VLJ-178 (NC_055481). Izolati su prikazani po mjestu i lokaciji podrijetla u Hrvatskoj, pripadajućim imenima sorata, brojem uzorkovanja u komercijalnom vinogradu (V) ili kolekcijskom nasadu (K) te pristupnim brojem u bazi GenBank.

	1	62
VLJ-178 NC 055481 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	YKRLNDLTKDQYSLPGISTIMKKVGNRSRIYSKFDLKSGFHVAMHPDSIEWTAFWVPDGLY	
PMC-235 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
PMC-282 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
PMC-313 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
VG-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
otok Hvar-Crkvenik (Plavac mali 44) OM320512 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 5) OM320509 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 6) OM320510 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 25) OM320511 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 6) OM320497 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 7) OM320498 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 36) OM320499 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac Mali 6) OM320505 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 23) OM320506 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 24) OM320507 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 46) OM320508 (V)		
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 20) OM320491 (V)		
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 30) OM320492 (V)		
Proložac-Vučija Draga (Trnjak 31) OM320493 (V)		
Kaštela-Furnaže (Mladenka 32) OM320503 (V)		
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 6) OM320500 (V)		
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 7) OM320501 (V)		
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 19) OM320502 (V)		
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 1) OM320529 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 26) OM320494 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 50) OM320495 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 34) OM320496 (V)		
Kaštela-Radun (Liutun 5) OM320522 (V)		
Kaštela-Stomorija (Babica 41) OM320504 (V)		
Nin (Maraština 18) OM320527 (V)		
Poreč-Kršete (Borqonja 61) OM320482 (V)		
Primošten-Bucavac (Babić 2) OM320530 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 100) OM320485 (V)		
otok Paq-Paq 4 (Paška maraština 17) OM320524 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 101) OM320486 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 29) OM320483 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 55) OM320484 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 76) OM320490 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 1) OM320488 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 3) OM320489 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM320487 (V)		
otok Solta-Gornje Selo 3 (Dobričić 38) OM320526 (V)		
otok Solta-Srednje Selo 3 (Plavac mali 22) OM320525 (V)		
Split (Bak) OM320516 (K)		
Split (Dobričić) OM320519 (K)		
Split (Plavina) OM320520 (K)		
Split (Sarica trišnjeвица) OM320517 (K)		
Split (Topol) OM320521 (K)		
Split (nepoznata) OM320518 (K)		
otok Vis (Plavac mali 115) OM320515 (V)		
otok Vis (Plavac mali 27) OM320513 (V)		
otok Vis (Plavac mali 28) OM320514 (V)		
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Galac) OM320523 (K)		
Zbirka virusa vinove loze SZAF (Plavac mali 22) OM320531 (K)		
Zemunik Donji (Plavina 29) OM320528 (V)		

Prilog 9. Nastavak

	63	124
VLJ-178 NC_055481 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)	EWLVMPFGLKNAPAVFQRKMDHCFKGTEDFIAVYIDDILVFSENEQD HARHLKIMLQICKEN	
PMC-235 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		V
PMC-282 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
PMC-313 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		
VG-102 (Zbirka virusa vinove loze SZAF) (K)		K
otok Hvar-Crkvenik (Plavac mali 44) OM320512 (V)		K
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 5) OM320509 (V)		V
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 6) OM320510 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 1 (Plavac mali 25) OM320511 (V)		
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 6) OM320497 (V)		H
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 7) OM320498 (V)		K
otok Hvar-Ivan Dolac 2 (Plavac mali 36) OM320499 (V)		K
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac Mali 6) OM320505 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 23) OM320506 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 24) OM320507 (V)		
otok Hvar-Velo Vijelo (Plavac mali 46) OM320508 (V)		
Proložac-Vučija Draqa (Trnjak 20) OM320491 (V)		
Proložac-Vučija Draqa (Trnjak 30) OM320492 (V)		
Proložac-Vučija Draqa (Trnjak 31) OM320493 (V)		
Kaštela-Furnaže (Mladenka 32) OM320503 (V)		
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 6) OM320500 (V)		
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 7) OM320501 (V)		K
Kaštela-Kaštel Lukšić (Glavinuša 19) OM320502 (V)		K
Kaštela-Kaštel Stari 2 (Crljenak kaštelanski 1) OM320529 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 26) OM320494 (V)		
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 50) OM320495 (V)		D
Kaštela-Kaštel Sućurac (Mladenka 34) OM320496 (V)		
Kaštela-Radun (Liutun 5) OM320522 (V)		
Kaštela-Stomorija (Babica 41) OM320504 (V)		
Nin (Maraština 18) OM320527 (V)		
Poreč-Kršete (Borqonia 61) OM320482 (V)		
Primošten-Bucavac (Babić 2) OM320530 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 100) OM320485 (V)		K
otok Paq-Paq 4 (Paška maraština 17) OM320524 (V)		
otok Rava-Mala Rava (Plavina 101) OM320486 (V)		T
otok Rava-Mala Rava (Plavina 29) OM320483 (V)		T
otok Rava-Mala Rava (Plavina 55) OM320484 (V)		
otok Rava-Vela Rava (Plavina 76) OM320490 (V)	I	G
otok Rava-Vela Rava (Plavina 1) OM320488 (V)		E
otok Rava-Vela Rava (Plavina 3) OM320489 (V)		H
otok Rava-Vela Rava (Plavina 42) OM320487 (V)		K
otok Šolta-Gornje Selo 3 (Dobričić 38) OM320526 (V)		
otok Šolta-Srednje Selo 3 (Plavac mali 22) OM320525 (V)		
Split (Bak) OM320516 (K)		
Split (Dobričić) OM320519 (K)		
Split (Plavina) OM320520 (K)		
Split (Šarica trišnjeвица) OM320517 (K)		
Split (Topol) OM320521 (K)		
Split (nepoznata) OM320518 (K)		
otok Vis (Plavac mali 115) OM320515 (V)		
otok Vis (Plavac mali 27) OM320513 (V)		
otok Vis (Plavac mali 28) OM320514 (V)		
Nacionalna kolekcija autohtonih sorata SZAF (Galac) OM320523 (K)		
Zbirka virusa vinove loze SZAF (Plavac mali 22) OM320531 (K)		
Zemunik Donji (Plavina 29) OM320528 (V)		