Alternativni domaćini uvijenosti lista vinove loze pridruženog virusa 3 i A - virusa vinove loze

Jagunić, Martin

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:293656

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

ALTERNATIVNI DOMAĆINI UVIJENOSTI LISTA VINOVE LOZE PRIDRUŽENOG VIRUSA 3 I A-VIRUSA VINOVE LOZE

DIPLOMSKI RAD

Martin Jagunić

Zagreb, veljača, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Fitomedicina

ALTERNATIVNI DOMAĆINI UVIJENOSTI LISTA VINOVE LOZE PRIDRUŽENOG VIRUSA 3 I A-VIRUSA VINOVE LOZE

DIPLOMSKI RAD

Martin Jagunić

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

Zagreb, veljača, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Martin Jagunić**, JMBAG 0178100255, rođen 09.11.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

ALTERNATIVNI DOMAĆINI UVIJENOSTI LISTA VINOVE LOZE PRIDRUŽENOG VIRUSA 3 I A-VIRUSA VINOVE LOZE

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta Martina Jagunića, JMBAG 0178100255, naslova

ALTERNATIVNI DOMAĆINI UVIJENOSTI LISTA VINOVE LOZE PRIDRUŽENOG VIRUSA 3 I A-VIRUSA VINOVE LOZE

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	izv. prof. dr. sc. Darko Vončina	mentor	_____
2.	izv. prof. dr. sc. Edyta Đermić	član	_____
3.	doc. dr. sc. Darija Lemić	član	_____

Zahvala

Zahvala na početku moga diplomskoga rada nije samo poštivanje pravila o pisanju stručnih radova, već je i simbol da bez ljudi kojima je ona posvećena, ne bi bilo niti njega kao krune mog studija. Stoga se ovom prilikom želim zahvaliti svima koji su pridonijeli nastanku ovog rada i mom završetku diplomskog studija Fitomedicina na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Prije nego ostalima, želim se zahvaliti svojoj obitelji na nesebičnoj pomoći, razumijevanju i strpljenju prema meni u sve vrijeme mojega studija. Oduvijek ste na mom akademskom putu, kao i u mom životu, bili moja najveća podrška i oslonac. I kada se činilo teško ili nedostižno ili nemoguće, uz vas je bilo lako, dostižno i uvijek će sve biti moguće. Sve vas jako volim i nadam se da ću i dalje imati snage i volje da mogu opravdavati vaše povjerenje, koje je sigurno veće od onog kojeg ja imam u sebe. Stoga vam još jednom hvala!

Nadalje, želio bih zahvaliti svim svojim kolegama i prijateljima na fakultetu, ali i izvan njega. Mnogo smo vremena provodili zajedno na predavanjima, ali i zvan njih te sam kroz njihovu motivaciju, požrtvovnost i strast prema ovoj struci i životu, ja često puta pronalazio svoju.

Želio bih zahvaliti svim profesorima Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, mentorima, docentima i asistentima na uloženom trudu, znanju i iskustvu, kako bi od mene učinili barem sjenu onoga što bi trebala biti agronomska struka, ali i dobar čovjek. Posebice moram istaknuti sve djelatnice i djelatnike Zavoda za fitopatologiju Agronomskog fakulteta, na kojemu se odvijala eksperimentalna faza ovog rada, koja nije kratko trajala. Kroz to vrijeme oni su svojom ljubaznošću i susretljivošću doprinijeli tome da se među njima osjećam ugodno i prihvaćeno, kao da sam dio njih, a ne tek prolazni student. Uvijek ste bili spremni pomoći, otvoriti vrata Zavoda i ostati sa mnom do kad god je trebalo, a sve u svrhu ovog rada. Posebno se želim zahvaliti jednom djelatniku tog zavoda, „tehničaru“, kako ga oni među sobom vole zvati, iako je njegova uloga u ovom radu puno veća od tog, gospodinu Mladenu Polettiju Kopešiću, koji mi je svojim znanjem i iskustvom puno pomagao oko pripreme i samih izvođenja eksperimenata, ali me podučio i mnogim stvarima koje nisu u opsegu ovog rada, ali ulaze u spektar poželjnih i primjenjivih agronomskih i životnih vještina. Još jednom Vam svima puno hvala!

Na kraju želim zahvaliti čovjeku čije je ime na početku ovoga rada kao začetnika ideje, voditelja provedbe i motivatora da rad postane ovo što jest, svom mentoru izv. prof. dr. sc. Darku Vončini. Hvala Vam na povjerenju u mene i vjeri u mogućnost obostrane uspješne suradnje, koja se dogodila tijekom ovog projekta. Kroz taj sam period rada s Vama shvatio što znači voljeti svoj posao, biti vrhunski stručnjak u svojoj struci, ali svejedno biti uvijek na raspolaganju kolegama na fakultetu, ali još i više svojim učenicima studentima. Bila mi je čast s Vama dijeliti ideje, misli, ali i poneku poteškoću koja nas je znala zadesiti na tom putu.

Nadam se da će nas naša struka i dalje povezivati na obostrano zadovoljstvo i da ovim radom naša suradnja ne prestaje. Bili ste i ostat ćete moj mentor i zato Vam puno hvala.

Želio bih još na kraju zahvaliti svima koji su dali dio sebe i svog vremena za ovaj rad, a koje sam nenamjerno zaboravio spomenuti.

Hvala svima!

Sadržaj

1. Uvod 1

1.1. Cilj istraživanja 1

1.2. Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) 2

1.3. Virusi vinove loze 2

1.3.1. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3) 2

1.3.2. A-virus vinove loze (*Grapevine virus A*, GVA) 4

1.4. Štitaste uši 5

1.4.1. Lozina štitasta uš (*Planococcus ficus*) 6

2. Materijali i metode rada 8

2.1. Izvor virusa i detekcija 8

2.2. Osnivanje kolonije štitastih uši i determinacija 9

2.3. Sjetva test biljaka/korova 9

2.4. Prijenos virusa štitastim ušima 12

2.4.1. Prijenos nevirulentnih uši na virusima zaražene sadnice loze 12

2.4.2. Prijenos uši s inficirane loze na zeljaste test biljke/korove 13

2.4.3. Testiranje test biljaka/korova na GLRaV-3 i GVA 15

2.4.4. Prijenos neinficiranih ličinki na inficirane test biljke/korove 18

2.4.5. Prijenos ličinki sa inficiranih korova na bezvirusnu lozu 19

3. Rezultati istraživanja 21

4. Rasprava 25

5. Zaključci 27

6. literatura 28

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Martina Jagunića**, naslova

ALTERNATIVNI DOMAĆINI UVIJENOSTI LISTA VINOVE LOZE PRIDRUŽENOG VIRUSA 3 I A-VIRUSA VINOVE LOZE

Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV) i A-virus vinove loze (GVA) smatraju se ekonomski važnim virusima vinove loze. Europska vinova loza (*Vitis vinifera* L.) i američke autohtone vrste te njihovi hibridi smatraju se njihovim glavnim domaćinima, ali su također zabilježeni prijenosi na neke zeljaste test biljke. Pored prijenosa sadnim materijalom, oba virusa su prenosiva štitastim ušima. Pokusi u laboratorijskim uvjetima, pomoću lozine štitaste uši (*Planococcus ficus*), pokazali su upješan prijenos GVA sa vinove loze na dva česta korova u hrvatskim vinogradima: mračnjak (*Abuthilon theophrasti*) i oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus*) te na dvije test biljke: *Chenopodium murale* i *Nicotiana benthamiana*; te prijenos GLRaV-3 na korove: bijela loboda (*Chenopodium album*), sitnocvjetna konica (*Galinsoga parviflora*) i test biljke *Nicotiana benthamiana* i *Chenopodium murale*. Također, utvrđena je i mogućnost povratnog prijenosa na lozu i to sa oštrodlakavog šćira za GVA te sitnocvjetne konice i *Chenopodium murale* za GLRaV-3. Uspješnost prijenosa potvrđena je metodom ELISA i/ili lančanom reakcijom polimeraze nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR). Navedena otkrića mijenjaju dosadašnja saznanja o epidemiologiji ova dva virusa vinove loze.

Ključne riječi: korovi, test biljke, štitaste uši, prijenos, ELISA, RT-PCR

Summary

Of the emaster's thesis – student **Martin Jagunić,** entitled

ALTERNATIVE HOSTS OF *GRAPEVINE LEAFROLL-ASSOCIATED VIRUS 3* AND *GRAPEVINE VIRUS A*

Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) and Grapevine virus A (GVA) are considered economically important viruses of grapevine. The European grapevine (*Vitis vinifera* L.) and American grapevine species and their hybrids are considered to be their main hosts, but also transfer to some test plants was recorded. In addition to the transmission by infected planting material, both are transmitted by mealybugs. Experiments in laboratory conditions, using vine mealybug (*Planococcus ficus*), showed successful transmision of GVA from grapevine to two common weeds in Croatian vineyards: velvetleaf (*Abuthilon theophrasti*) and redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) and two test plants: *Chenopodium murale* and *Nicotiana benthamiana*; and transfer of GLRaV-3 to common weeds: common lambsquarters (*Chenopodium album*), and smallflower galinsoga (*Galinsoga parviflora*) and test plants *Nicotiana benthamiana* and *Chenopodium murale*. Also, the possibility of retransmission to the grapevine was determined from redroot pigweed for the GVA and smallflower galinsoga and *Chenopodium murale* for GLRaV-3. The success of transmission was confirmed by the ELISA and/or polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR). These findings give additional knowledge to the epidemiology of these two grapevine viruses.

Keywords: weeds, herbaceous hosts, mealybugs, transmission, ELISA, RT-PCR

1. Uvod

Virusni patogeni smatraju se važnim uzročnicima biljnih bolesti diljem svijeta. Na vinovoj lozi parazitiraju brojni virusi, no ne iziskuju svi ekonomski opravdane mjere njihove kontrole. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3), koji se smatra najznačajnijim članom i glavnim uzročnikom bolesti uvijenosti lista vinove loze (GLD) i A-virus vinove loze (*Grapevine virus A*, GVA), koji pripada kompleksu naboranosti drva, ekonomski su važni virusi rasprostranjeni u svim vinogradarskim regijama svijeta. Ovi virusi na vinovoj lozi uzrokuju brojne simptome koji imaju kvantitativan i kvalitativan utjecaj na prinos. Dugo se vremena smatralo kako je vegetativno razmnožavanje, uključujući i cijepljenje, jedini način njihova širenja. Velik doprinos ka boljem razumijevanju njihove epidemiologije, dali su Rosciglione i suradnici (1983) iznoseći dokaze da se GVA može prenijeti s loze na lozu te na vrstu *Nicotiana clevelandi* pomoću imaga i ličinki štitaste uši *Pseudococcus longispinus.* Druga vrsta štitaste uši, odnosno lozina štitasta uš (*Planococcus ficus*), pokazala se kao prvi priznati biološki vektor GLRaV-3 (Rosciglione i Gugerli, 1989; Tanne i sur., 1989). Ovi nalazi bili su poticaj za istraživanja koja su utvrdila čitav spektar kukaca iz porodice Pseudococcidae, kao i drugih štitastih uši, koje imaju ulogu u prijenosu GLRaV-3 i GVA na nespecifičan i semiperzistentan način (Almeida i sur., 2013; Krűger i sur., 2006; La Notte i sur., 1997, Martelli, 2014). Ovi rezultati imali su utjecaj na razvoj strategija kontrole, koje se u slučaju virusnih bolesti oslanjaju na preciznu detekciju te, posljedično, uklanjanje zaraženih biljaka i kontrolu vektora.

Ovo istraživanje inspirirano je činjenicom da bi GLRaV-3 i GVA mogli biti prenosivi vektorima s vinove loze na druge, prije svega korovne, domaćine. U prilog tome ide činjenica da je GLRaV-3 prenosiv štitastim ušima na vrstu *Nicotiana benthamiana* (Prator i sur., 2017), a i relativno brza reinfekcija novih vinograda podignutih korištenjem bezvirusnog sadnog materijala i to na lokacijama bez blizine drugih vinograda, potencijalnih izvora infekcije. Novi rezultati i saznanja u tom području mogli bi razjasniti i pobliže opisati spektar mogućih biljaka kao alternativnih domaćina ovih virusa, što bi zasigurno pomoglo boljem razumijevanju epidemiologije ovih virusa, a time i osiguralo bolje preventivne mjere zaštite.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mogućnost prijenosa GLRaV-3 i GVA lozinom štitastom uši (*Planococcus ficus*) sa zaražene vinove loze na zeljaste test biljke i korovne vrste. U slučaju pozitivnih rezultata utvrditi mogućnost povratnog prijenosa, odnosno s test biljaka/korova na bezvirusnu lozu.

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

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najznačajnijih drvenastih poljoprivrednih kultura u svijetu. Prema podacima Međunarodne organizaciju za vinovu lozu i vino (OIV), u 2017. godini je pod vinovom lozom bilo 7 534 000 ha svjetskih poljoprivrednih površina, a svjetska proizvodnja grožđa iznosila je 73 000 000 tona, sa udjelom od 37 % u Europi. Dok površine pod vinovom lozom pokazuju silazni trend, proizvodnja vina u svijetu pokazuje uzlazni trend u posljednje dvije godine te u 2018. iznosi 279 000 000 hl, uključujući sokove i mošt, a tu proizvodnju i dalje predvode tri Europske zemlje: Italija (17,4 %), Francuska (16,6 %) i Španjolska (14,7 %) (OIV, 2018).

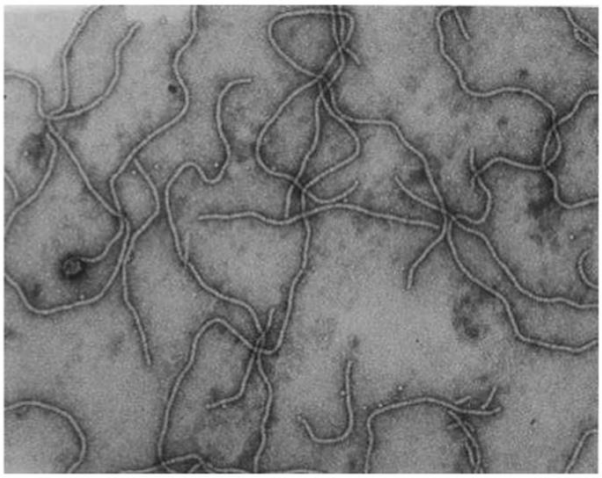
U Republici Hrvatskoj je, prema Državnom zavodu za statistiku, u 2017. godini proizvedeno 116 307 tona grožđa na površini od 21 900 ha pod vinovom lozom (DZS, 2018).

1.3. Virusi vinove loze

Prema Mengu i sur. (2017) vinova loza je kultura koju parazitira najveći broj biljnih virusa, njih više od 70, specifičnih ili nespecifičnih za vinovu lozu, koji su istraženi u proteklih 60 godina. Svi oni pripadaju u 27 opisanih rodova iz 17 različitih porodica i puno njih može biti istovremeno prisutno u jednoj biljci bez jasne patogene uloge. Dok jedni ne predstavljaju opasnost za rentabilnu proizvodnju grožđa, drugi su ekonomski i gospodarski vrlo značajni. Oni su široko rasprostranjeni te uzrokuju čitav niz simptoma na osnovu kojih govorimo o kompleksima bolesti kao što su: infektivna degeneracija, uvijenost listova, naboranost drveta i inkompatibilnost podloge i plemke. Sve ove bolesti u uznapredovalom stadiju imaju veliki utjecaj na prinos.

1.3.1. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3)

GLRaV-3 se smatra najznačajnijim članom i glavnim uzročnikom kompleksa bolesti uvijenosti lista vinove loze (GLD), uz još četiri preostala virusa. Po svom utjecaju na proizvodnju grožđa, uvrštava se u istu kategoriju sa najvažnijim gljivičnim bolestima vinove loze, kao što su pepelnica (*Uncinula necator*) ili plamenjača (*Plasmopara viticola*). Ovaj virus se prenosi vegetativnim razmnožavanjem, a uz to pripada porodici Closteroviridae, koja se s obzirom na mogućnost vektorskog prijenosa, dijeli na četiri roda. Tako ovaj virus pripada rodu Ampelovirus koji se uspješno prenosi štitastim ušima. Prema Baltimoreovoj klasifikaciji pripada šestoj skupini virusa koji sadrže jednolančanu +RNA molekulu kao nukleinsku kiselinu, poznati i kao retrovirusi. Izgled čestica je nitast i vrlo izdužen, u rasponu od 1400 - 2000 nm te je drugi najveći od svih opisanih biljnih virusa (Slika 1.). Trenutno je opisano osam različitih filogenetskih grupa koje pripadaju GLRaV-3, ali još uvijek nije poznat njihov individualni doprinos razvitku kompleksa bolesti uvijenosti lista vinove loze (GLD) (Meng i sur., 2017).



Slika 1. Negativno kontrastirane čestice GLRaV-3 virusa pod svjetlosnim mikroskopom
(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Transmission-electron-micrograph-of-negatively-stained-purified-GLRaV-3-particles-using_fig6_236173215)

Većina kultivara vinove loze (*Vitis vinifera* L.) je osjetljiva na GLRaV-3 te nakon infekcije pokazuju tipične simptome GLD-a, koji se većinom javljaju kasnije tijekom vegetacije neovisno o prisutnosti virusa tijekom duljeg razdoblja u biljci, a mogu se zamijeniti sa nekim gljivičnim bolestima, poput crvene paleži vinove loze (*Pseudopeziza tracheiphila*). Tipični simptomi su međužilno crvenilo listova i nekroza uz uvijanje listova kod crnih sorata (Slika 2.) te klorotična mjesta na listu uz njegovo uvijanje kod bijelih sorata (Slika 3.).

Glavni utjecaji na proizvodnju očituju se preko: smanjenog prinosa (5 do 70 %), slabijeg vigora trsa (20 do 70 %), zakašnjelog dozrijevanja grožđa, i slabije kvalitete grožđa (šećer: 0 do – 2,5 Brix°, kiseline: 0 do + 1,5 g/L). Neke studije provedene u New Yorku (SAD) pokazuju da se gospodarski gubici zbog zaraze ovim virusom kreću od 25,000 - 40,000 $ po ha/godišnje (Fuller i sur., 2015).



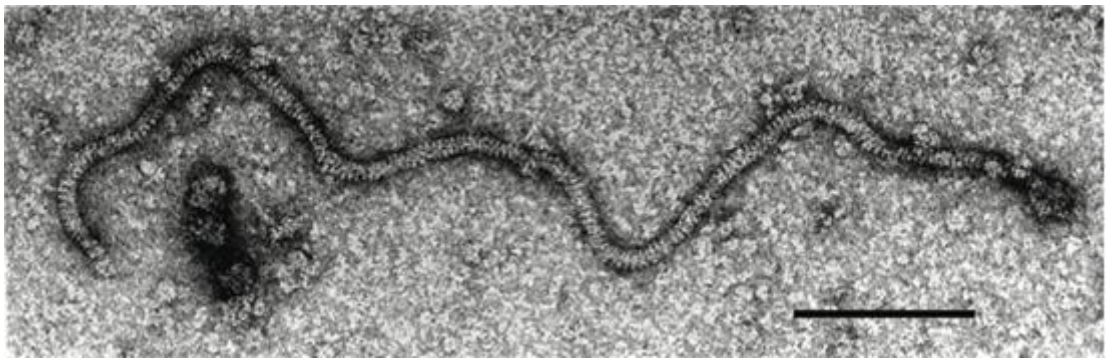
Slika 2. Tipični simptomi GLRaV-3 na listu crnih sorata vinove loze (izvor: https://www.frontiersin.org/files/Articles/45092/fmicb-04-00082-HTML/image_m/fmicb-04-00082-g001.jpg)



Slika 3. Tipični simptomi GLRaV-3 na listu bijelih sorata vinove loze (izvor: https://www.frontiersin.org/files/Articles/45092/fmicb-04-00082-HTML/image_m/fmicb-04-00082-g001.jpg)

1.3.2. A-virus vinove loze (*Grapevine virus A*, GVA)

Prema Mengu i sur. (2017) GVA je jedan od članova roda Vitivirus koji je uzročnik kompleksa naboranosti drveta. Osim što ima isti tip nukleinske kiseline kao GLRaV-3, jednolančanu +RNA molekulu, čestica ovog virusa također je nitasto izdužena, ali puno kraća (duljine 700 nm i promjera 12 nm) (Slika 4.) te se uz vegetativno prenošenje, može prenijeti i vektorski, štitastim ušima.



Slika 4. Negativno kontrastirana čestica GVA virusa pod elektronskim mikroskopom. Oznaka predstavlja 100 nm.
(izvor: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/242/betaflexiviridae-figures)

Simptomi sindroma naboranosti drveta očituju se na centralnom cilindru debla, tkivu kambija i kore, u vidu oticanja i plutavosti tkiva (Slika 5.) mladih sadnica nakon presađivanja, pucanja kore uz više ili manje izraženu proliferaciju i jamičavost drveta (Slika 6.).

I dok su učinci GLRaV-3 na prinos vinove loze istraženi i opisani, učinci GVA na prinos još nisu potpuno razjašnjeni.



Slika 5. Zdravo drvo (lijevo) i simptom jamičavosti drveta (desno) nakon infekcije virusom iz roda Vitivirus (izvor: https://www.researchgate.net/figure/Symptoms-observed-in-some-grapevine-cultivars-in-Brazilian-vineyards-leaf-without_fig1_316534719)



Slika 6. Plutavost kore nakon inekcije virusima iz roda Vitivirus (izvor: https://www.researchgate.net/figure/Symptoms-observed-in-some-grapevine-cultivars-in-Brazilian-vineyards-leaf-without_fig1_316534719)

1.4. Štitaste uši

Štitaste uši vrlo su sitni kukci, dugi najčešće 2 - 5 mm, a samo rijetki i više. Po taksonomskoj klasifikaciji pripadaju nadredu Hemiptera (rilčari), redu Homoptera, podredu Sternorrhyncha i nadporodici Coccoidea (štitaste uši). Kod svih vrsta izražen je spolni dimorfizam. Prema Maceljskom (2002.) ženka ima zdepasto tijelo, uglavnom bez nogu i krila, a tijelo im je pokriveno različitim voštanim izlučinama ili štitićem, koji je većinom izgrađen od voska, svlakova i raznih izlučina. Usni ustroj im se sastoji od rila koji je podešen za sisanje. Mužjaci imaju tijelo s jasnom člankovitošću, dobro razvijenim nogama, jednim parom krila, žive vrlo kratko i gotovo se ne hrane. Štitaste uši mogu se razmnožavati spolno i partenogenetski.

Štitaste uši ubrajaju se u primarne i sekundarne štetnike poljoprivrednih kultura, uglavnom drvenastih vrsta. Primarne štete uzrokuju sisanjem sokova sa nadzemnih organa biljke što na kraju rezultira slabljenjem opće kondicije i vigora biljke. Sekundarne štete očituju se kroz obilno izlučivanje medne rose koja pokriva listove i izboje, a na koje se potom naseljavaju gljive čađavice smanjujući asimilacijsku sposobnost biljke. Ista medna rosa i gljive čađavice na plodovima smanjuju njihovu tržišnu vrijednost i mogućnost upotrebe. Unatoč tome, primarne i sekundarne štete katkad nisu toliko izražene kao njihova vektorska uloga u širenju

pojedinih biljnih patogena, kao što su virusi. Najčešći vektori su ličinački stadiji štitastih uši jer su najpokretljiviji i najviše se hrane na biljci (Maceljski, 2002).

Suzbijanje štitastih uši treba usmjeriti na prevenciju unošenja u nasad i sprječavanje širenja kroz certificirani sadni materijal. Od kurativnih mjera na raspolaganju su mehaničko uništavanje naseljenih dijelova biljaka i biološke metode borbe, budući da se zbog svojih specifičnih morfoloških osobina i rezistentnosti vrlo teško suzbijaju kemijski.

1.4.1. Lozina štitasta uš (*Planococcus ficus*)

Vrsta *Planoccocus ficus* pripada porodici Pseudococcidae i ubraja se u štetnike poljoprivrednih kultura iz ukupno 12 porodica, primarno na vinovoj lozi, smokvi i šipku. Vrsta je široko rasprostranjena u tropskom, suptropskom i mediteranskom klimatu Amerike, Europe, Afrike i Azije.

Unutar vrste izražen je spolni dimorfizam. Ženka je veća od mužjaka s duljinom tijela od 2 – 4 mm, tijelo je pokriveno bijelo-sivim voskom te je pokretna zbog svojih produljenih nogu. Ličinke ženki i prva dva stadija ličinki mužjaka slični su odrasloj ženki. Duljina tijela mužjaka iznosi 1,5 mm, imaju jedan par krila i žive svega 1 – 2 dana. Slika 7. prikazuje odraslu ženku i mužjaka vrste *Planococcus ficus*.



Slika 7. Odrasli mužjak (lijevo) i odrasla ženka (desno) vrste *Planococcus ficus*
(izvor: https://www.researchgate.net/figure/Adult-mealybug-males-are-winged-as-shown-here-for-Planococcus-fi-cus-next-to-an-adult_fig2_267521901)

Tijekom svog životnog ciklusa odrasle ženke migriraju između donjih dijelova trsa za vrijeme vegetacijskog mirovanja te gornjih dijelova početkom kretanja vegetacije. Lozine štitaste uši (*P. ficus*) mogu imati 4 – 7 generacija godišnje. Glavnu štetu pričinjavaju ličinke koje sišu na lišću i grožđu te izlučuju mednu rosu, što rezultira višim sadržajem kiselina i smanjenim sadržajem šećera u grožđu. Iako štete prouzrokovane ishranom ne bi trebalo zanemariti, glavna njihova štetnost očituje se u činjenici da kao vektori prenose viruse na vinovu lozu (Plant Pests of the Middle East, 2018).

2. Materijali i metode rada

Istraživanje je provedeno na Zavodu za fitopatologiju (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, AFZ), u razdoblju od travnja do listopada 2018. godine. Prva faza istraživanja odnosila se na rad u stakleniku, a druga je uključivala laboratorijski rad. Oba prostora zahtijevala su kontrolirane uvjete rada i postupanja s test biljkama/korovima i sadnicama vinove loze. Korovi/test biljke uzgajane su isključivo za potrebe ovog istraživanja, korištenjem zbirke sjemena Zavoda za herbologiju (AFZ). U testovima prijenosa oba virusa korištene su ličinke prvog razvojnog stadija lozine štitaste uši (*Planococcus ficus*). Istraživanje je provedeno na 6 zeljastih biljnih vrsta (*Nicotiana* i *Chenopodium*) te 13 korovnih vrsta, čestih u vinogradima Hrvatske. Sadnice vinove loze dobivene su od bezvirusnih matičnih biljaka sorte Pinot crni i Chardonnay, koje su dio lozne kolekcije Zavoda za Fitopatologiju AFZ-a.

2.1. Izvor virusa i detekcija

Kao izvor GLRaV-3 i GVA virusa upotrijebljena je biljka vinove loze sorte Vlaška, koja je dio zavodske *„in vivo“* kolekcije pod internim kodom VVL-112 (Slika 8.). Prisutnost oba virusa potvrđena je enzimatsko-serološkom metodom na čvrstoj fazi (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) i metodom lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (eng. *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT- PCR). Detaljniji opis obje metode nalazi se u nastavku rada. Od te matične biljke dobivene su sadnice inficirane virusom koje su kasnije korištene u postupku vektorskog prijenosa.



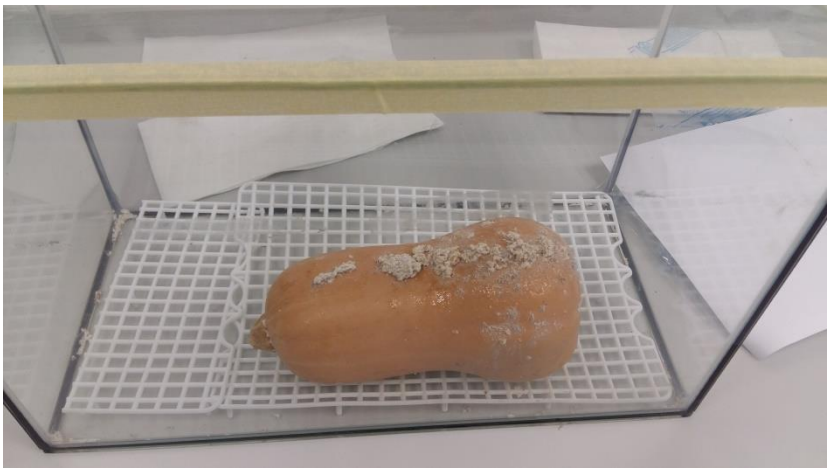
Slika 8. Biljka vinove loze sorte Vlaška (VVL-112) upotrijebljena kao izvor GLRaV-3 i GVA (Izvor: M. Poletti Kopešić)

2.2. Osnivanje kolonije štitastih uši i determinacija

Za potrebe vektorskog prijenosa virusa korištena je lozina štitasta uš (*Planococcus ficus*) koja je prisutna i u našim vinogradarskim krajevima, poglavito u Dalmaciji. Jedna je ženka ove vrste prenesena na tikvu poznatiju i pod imenom *„Butternut“* tikva (*Cucurbita moschata*), gdje je osnovala vlastitu koloniju uši. Tikva je sa ušima držana u staklenom terariju sa perforiranom mrežicom na vrhu, koja je omogućavala dovod zraka, ali i onemogućavala izlazak ličinki (Slika 9.).

Prije postupka prijenosa virusa, obavljena je determinacija vrste korištenjem 10 jedinki različitih razvojnih stadija iz kojih je izolirana DNA korištenjem DNeasy Plant mini kit (Qiagen, SAD), a sama determinacija provedena je pomoću PCR metode prema protokolu Daane i sur. (2011).

U istraživanju su korištene samo ličinke prvog stadija, jer uz najveću pokretljivost i kapacitet ishrane od svih ostalih stadija, pokazuju najveću vektorsku sposobnost za istraživane viruse.



Slika 9. Kolonija štitastih uši (*P. ficus*) na vrsti *Cucurbita moschata* u staklenom terariju (Izvor: original)

2.3. Sjetva test biljaka/korova

Sjetva test biljaka/korova započela je u travnju 2018. godine u stakleniku Zavoda za fitopatologiju. Od povećeg broja posijanih vrsta, nakon nicanja odabrano je šest zeljastih test biljaka *(Nicotiana* i *Chenopodium*) te 13 korovnih vrsta, za koje se procijenilo da su pogodnog zdravstvenog stanja i brojnosti za daljna istraživanja. Odabrane biljke podijeljene su u dvije skupine: a) uobičajno korištene test biljke u virološkim istraživanjima: *Chenopodium foetidum*, *Chenopodium murale*, *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana*, *N. rustica* i *N. tabacum var. Samson*; b) korovne vrste često prisutne u hrvatskim vinogradima: europski mračnjak (*Abutilon theophrasti*), oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus*), ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia*), poljski jarmen (*Anthemis arvensis*), rusomača (*Capsela bursa-pastoris*), bijela loboda (*Chenopodium album*), bodljikavi osjak (*Cirsium arvense*), kužnjak

(*Datura stramonium*), divlja mrkva (*Daucus carota*), sitnocvjetna konica (*Galinsoga parviflora*), kiseli dvornik (*Polygonum lapathifolium*), štavelj (*Rumex crispus*) i crna pomoćnica (*Solanum nigrum*). Po karakteristikama lista sve ove biljke su širokolisne, a po životnom ciklusu višegodišnje biljke su: štavelj, bodljikavi osjak i divlja mrkva, dok su sve ostale jednogodišnje.

Prije sjetve, kod pojedinih vrsta, provedeni su laboratorijski tretmani prekidanja dormantnosti sjemena koji su uključivali mehaničku skarifikaciju te umakanje sjemena u otopinu kalijeva nitrata (KNO_3). Tablica 1. prikazuje popis korištenih korovnih vrsta u istraživanju te provedene tretmane za prekidanje dormantnosti.

Tablica 1. Popis korovnih vrsta/test biljaka i provedenih tretmana sjemena

R. br.	Korovna vrsta	Tretman sjemena	R. br.	Test biljka	Tretman sjemena
1.	*Abuthilon theophrasti*	skarifikacija	**1.**	*Chenopodium foetidum*	-
2.	*Amaranthus retroflexus*	2%-tna KNO_3 - 24 h	**2.**	*Chenopodium murale*	-
3.	*Ambrosia artemisifolia*	KNO_3	**3.**	*Chenopodium quinoa*	-
4.	*Anthemis arvensis*	-	**4.**	*Nicotiana benthamiana*	-
5.	*Capsela bursa-pastoris*	KNO_3	**5.**	*Nicotiana rustica*	-
6.	*Chenopodium album*	KNO_3	**6.**	*N. tabacum var. Samson*	-
7.	*Cirsium arvense*	KNO_3			
8.	*Datura stramonium*	skarifikacija			
9.	*Daucus carota*	KNO_3			
10.	*Galinsoga parviflora*	-			
11.	*Poligonum lapathifolium*	KNO_3			
12.	*Rumex crispus*	skarifikacija			
13.	*Solanum nigrum*	KNO_3			

Sjetva je izvršena u lončiće napunjene humusnim supstratom (Slika 10.) na optimalu dubinu (1 cm), nakon čega se klijanje i nicanje odvijalo na optimalnim i kontroliranim uvjetima temperature (20 – 25 °C) i vlage (poljski vodni kapacitet). Nakon početnog razdoblja klijanja, biljke su presađene u 15 zasebnih lončića (Slika 11.) uz održavanje uvjeta i izolacijom klijanaca od ostatka plastenika, zbog mogućeg napada štetnika uobičajenih za zaštićene prostore.

Naposljetku je odabrano 10 biljaka iste vrste + dvije biljke po vrsti kao negativne kontrole, koje su korištene u daljnjem istraživanju. Svaka biljna vrsta dobila je svoj broj kao indetifikacijski interni kod, a ujedno je i svaka jedinka unutar vrste dobila svoju oznaku, kako bismo mogli točno pratiti njezin pedigre kroz istraživanje. Ukupno je u istraživanju korišteno 174 jedinki test biljaka/korova korištenih za prijenos i 38 biljaka kao negativne kontrole.

U optimalnom periodu za inokulaciju virusom (4 - 6 dobro razvijenih listova) obično mjesec dana nakon klijanja (Slika 12.), klijanci su unošeni u laboratorij, gdje se pristupilo postupku inokulacije pomoću ličinki koje su se hranile na virusom zaraženoj lozi. Samo je u iznimnim slučajevima prirodne smrtnosti unutar pojedinih biljnih vrsta, prijenos obavljen na manje od 10 jedinki.



Slika 10. Sjetva vrste *Nicotiana clevalendi*
(Izvor: original)



Slika 11. Presađeni klijanci vrste *A. theophrasti*
(Izvor: original)



Slika 12. *Rumex crispus* u optimalnom stadiju za inokulaciju
(Izvor: original)

2.4. Prijenos virusa štitastim ušima

Svi testovi vektorskog prijenosa kao i detekcije virusa u biljkama rađeni su u virološkom laboratoriju Zavoda za fitopatologiju AFZ-a u kontroliranim uvjetima. Oni se prije svega odnose na sprječavanje kontaminacije testirane kolonije štitastih uši drugim populacijama, kao i adekvatno tretiranje inokuliranih biljaka insekticidom te njihovu daljnju izolaciju do testiranja na viruse.

2.4.1. Prijenos nevirulentnih uši na virusima zaražene sadnice loze

Ličinke prvog stadija lozine štitaste uši prenošene su pomoću kista i lupe s tikve na virusom zaražene listove vinove loze (Slika 13.). Na svaku loznu sadnicu prenešeno je 300-tinjak štitastih uši, čime su se za potrebe istraživanja osigurale četiri virusima zaražene lozne sadnice. Nakon prijenosa osiguran je period akvizicije u trajanju od 48 sati.



Slika 13. Ličinke lozine štitaste uši na listu loze nakon prijenosa (Izvor: original)

2.4.2. Prijenos uši s inficirane loze na zeljaste test biljke/korove

Nakon dva dana akvizicije, uši su s loze premještane na zeljaste test biljke/korove istom tehnikom. Po jednoj biljci/korovu stavljeno je 10 ličinki. Nakon prijenosa ličinki na zeljaste biljke/korove (Slika 14.) određeno je dvodnevno (48 sati) inokulacijsko razdoblje, unutar kojeg je, kako bi se simulirali stvarni poljski uvjeti, omogućeno ličinkama da se slobodno kreću po biljci dajući im mogućnost da napuste biljku. Ujedno je uspostavljena i prostorna izolacija između vrsta biljaka/korova, ali i jedinki unutar vrste. Po završetku inokulacijskog perioda, uši su mehanički uklonjene, a biljke dodatno tretirane insekticidom na bazi aktivne tvari imidakloprid (Slika 15.).



Slika 14. Ličinke *P. ficus* na licu lista vrste *G. parviflora* nakon prijenosa sa loze (Izvor: original)



Slika 15. Tretiranje biljaka insekticidom nakon završetka perioda inokulacije (Izvor: original)

U Tablici 2. nalaze se test biljke/korovi korišteni u prijenosu, broj jedinki po vrsti i dan inokulacije.

Tablica 2. Popis test biljaka/korova, njihov broj i dan inokulacije

R. br.	Korovne vrste	Dan inokulacije (br. biljaka)	R.br.	Test biljke	Dan inokulacije (br. biljaka)
1.	*Abuthilon theophrasti*	04.05.2018. (10)	**1.**	*Chenopodium foetidum*	25.05.2018. (10)
2.	*Amaranthus retroflexus*	09.05.2018. (10)	**2.**	*Chenopodium murale*	23.05.2018. (10)
3.	*Ambrosia artemisifolia*	09.05.2018. (2)	**3.**	*Chenopodium quinoa*	21.05.2018. (10)
4.	*Anthemis arvensis*	11.05.2018. (10)	**4.**	*Nicotiana benthamiana*	23.05.2018. (10)
5.	*Capsela bursa-pastoris*	14.05.2018. (11)	**5.**	*Nicotiana rustica*	25.05.2018. (10)
6.	*Chenopodium album*	02.05.2018. (10)	**6**	*N. tabacum var. Samson*	28.05.2018. (10)
7.	*Cirsium arvense*	04.05.2018. (1)			
8.	*Datura stramonium*	25.05.2018. (10)			
9.	*Daucus carota*	14.05.2018. (10)			
10.	*Galinsoga parviflora*	07.05.2018. (10)			
11.	*Poligonum lapathifolium*	11.05.2018. (10)			
12.	*Rumex crispus*	04.05.2018. (10)			
13.	*Solanum nigrum*	28.05. (10)			

Inkubacijski period za umnažanje virusa u test biljkama/korovima trajao je dva mjeseca, nakon čega se pristupilo njihovoj detekciji, najprije metodom ELISA, a zatim su biljke koje su se pokazale pozitivne dodatno testirane i metodom RT-PCR.

Slika 16. prikazuje jedan dio test biljaka/korova korištenih u prijenosu za vrijeme inkubacijskog perioda.



Slika 16. Test biljke/korovi za vrijeme inkubacijskog perioda
(Izvor: original)

2.4.3. Testiranje test biljaka/korova na GLRaV-3 i GVA

ELISA

Za potrebe detekcije virusa metodom ELISA odvagano je 0.1 g biljnog tkiva (uglavnom peteljke lista) (Slika 17.) koje je uz pomoć tekućeg dušika smrvljeno u tarioniku korištenjem tučka u fini prah. Izmrvljeno biljno tkivo korišteno je kao potencijalni izvor antigena u detekciji uz primjenu ELISA pribora proizvođača Agritest (Valenzano, Italija). U detekciji oba virusa korištena je dvostruka protutijelno-sendvič metoda, a svi koraci testa provedeni su sukladno uputama proizvođača (Slike 18 - 20.). Rezultati metode ELISA očitani su na spektrofotometru ElX800 (Biotek, SAD) dva sata nakon dodavanja supstrata pri valnoj duljini od 405 nm (Slika 21.). Spektrofotometrijska očitanja barem tri puta veća od prosječne vrijednosti negativnih kontrola smatrana su pozitivnima. Kod ELISA-pozitivnih uzoraka prisutnost GLRaV-3 i/ili GVA dodatno je provjerena metodom RT-PCR.



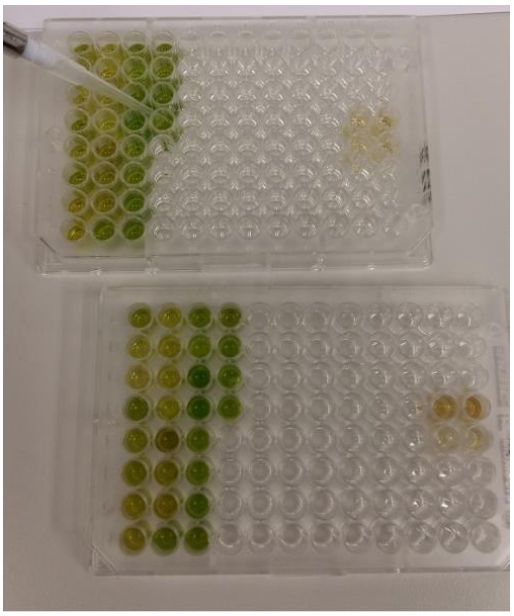
Slika 17. Određena masa biljnog materijala za detekciju virusa
(Izvor: original)



Slika 18. Uzorci biljnog tkiva spremni za usitnjavanje korištenjem tekućeg dušika
(Izvor: original)



Slika 19. Uzorak u tubici sa ELISA kodom
(Izvor: original)



Slika 20. Priprema uzoraka za testiranje biljaka metodom ELISA (Izvor: original)



Slika 21. Spektrofotometar ELX800 (Biotek, SAD)
(Izvor: original)

RT-PCR

Za izolaciju ukupnih ribonukleinskih kiselina (RNA) odvagnuto je 0,1 g peteljki lista koje su smrvljene u tarioniku pomoću tučka korištenjem tekućeg dušika te pomiješane s 1,8 ml ekstrakcijskog pufera - GGB (1,59 g / l Na2C03, 2,93 g / l NaHC03, pH 9,6 koji sadrži 2% PVP-40, 0,2% serum albumin, 0,05% Tween 20). Nakon toga je svaki uzorak pretočen u vlastitu tubicu s posebnom oznakom.

Za potrebe RT-PCR reakcije, usitnjeni uzorci stavljeni su na centrifugiranje na 10 min pri brzini od 16000 okretaja/min (centrifuga 5415 R, Eppendorf, Njemačka). Nakon toga 8 µl supernatanta pomiješano je sa 100 µl pufera za denaturaciju - GES (7.51 g/l glicina, 0.05 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.5 % Triton X, pH 9,0), nakon čega je uslijedila denaturacija u termocikleru (Eppendorf, Njemačka) na 95°C tijekom 10 minuta. Jedan mikrolitar denaturirane RNA korišten je u reakciji lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) pri reakcijskom volumenu od 10 µl, pri čemu se reakcijska smjesa sastojala od: 5.8 µl mikrobiološki čiste vode, 0.4 µl dNTP (10 µM), 0.6 µl svake početnice (10 µM), 0.4 µl enzimske smjese i 1 µl reakcijskog pufera. Pri dokazivanju virusa korištene su slijedeće početnice: GLRaV-3 Glr3s: 5'-GCGTCGTTGTTGAACAGAT-3' i Glr3as: 5'-GTACTTCACACCAACCTTCATC-3' (Saldarelli, osobni kontakt) te za GVA H587: 5'-GACAAATGGCACACTACG -3' i C995: 5'- AAGCCTGACCTAGTCATCTTGG -3' (Minafra i Hadidi, 1994), pri čemu su očekivani produkti bili veličine 150 i 430 parova baza (pb). Uvjeti RT-PCR reakcije uz korištenje one-step RT-PCR pribora (Qiagen, SAD) su bili kako slijedi: reverzna transkripcija 50°C u trajanju od 30 min, inicijalna deaktivacija 95°C 15 min; 35 ponavljanja: denaturacija 94°C 1 min, prilijeganje početnica 55°C 30 s, izduživanje lanaca 72°C 1 min; završno izduživanje lanaca 72°C u trajanju od 10 min.

Dobiveni produkti vizualizirani su elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu u trajanju od 60 min pri 70 V/cm. U gel je prije hlađenja i razlijevanja dodana 1 kapljica GelRed tekućine (Olerup, Švedska). Nakon elektroforeze gel je prenesen na UV transiluminator (Bio-Rad, SAD) te snimljen fotoaparatom, a slika prebačena u crno-bijelu verziju.

Na isti je ovaj način testirana ishodišna (matična) biljka vinove loze po kodom VVL-112, koja je poslužila kao izvor GLRaV-3 i GVA korištenih u istraživanju, kao i kasnije testirane sadnice loze korištene za prijenos radi utvrđivanja mogućnosti povratnog prijenosa virusa s korova na lozu.

2.4.4. Prijenos neinficiranih ličinki na inficirane test biljke/korove

Virusima zaražene pojedinačne jedinke test biljaka/korova izdvojene su od ostalog bezvirusnog materijala u laboratorij (Slika 22.) nakon čega se pristupilo prijenosu neinficiranih ličinki iz kontroliranih uvjeta na inficirane biljke, po istom prethodno opisanome postupku. Po završetku prijenosa, osiguran je dvodnevni akvizicijski period, uz mogoćnost slobodne pokretljivosti ličinki po biljci (Slika 23.).



Slika 22. Izdvojene inficirane biljke u virološkom laboratoriju
(Izvor: original)



Slika 23. Ličinke u akvizicijskom periodu na listu vrste *A. theophrasti*
(Izvor: original)

2.4.5. Prijenos ličinki sa inficiranih korova na bezvirusnu lozu

Nakon perioda akvizicije pristupljeno je prijenosu uši, koje su se hranile na inficiranim test biljkama/korovima, na bezvirusne sadnice loze. U tu svrhu osigurano je 10 sadnica vinove loze (sorata Chardonnay i Pinot crni) za prijenos po jednoj inficiranoj korovnoj jedinki/test biljci. Svaka sadnica vinove loze prethodno je testirana na viruse, po gore navedenim metodama i protokolima te je dobila vlastitu oznaku temeljenu na sorti, broju i oznaci korovne jedinke/test biljke s koje su uši prenošene (Slika 24.). Na svaku sadnicu prenešeno je po 10 ličinki pomoću kista. Inokulacijski period trajao je dva dana (Slika 25.) nakon čega su uši sa loznih sadnica uklonjene mehanički u kombinaciji s kemijskim tretiranjem insekticidom imidaklopridom. Nakon tretmana proveden je dvomjesečni inkubcijski period unutar kojeg se vodilo računa o svim mjerama njege i kontrole štetnika i bolesti vinove loze.



Slika 24. Inficirani korov (lijevo) i njemu pridružena neinficirana lozna sadnica (desno) sa svojim internim oznakama (Izvor: original)

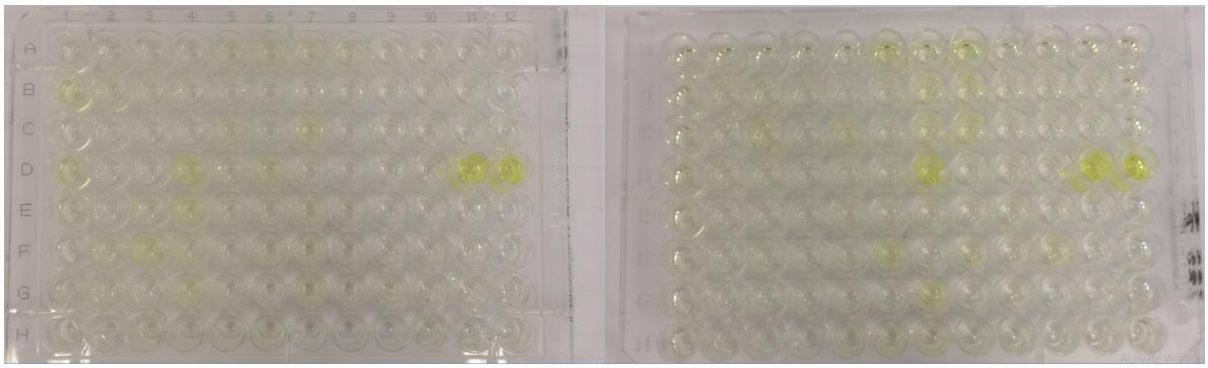


Slika 25. Lozne sadnice za vrijeme inokulacijskog perioda (Izvor: original)

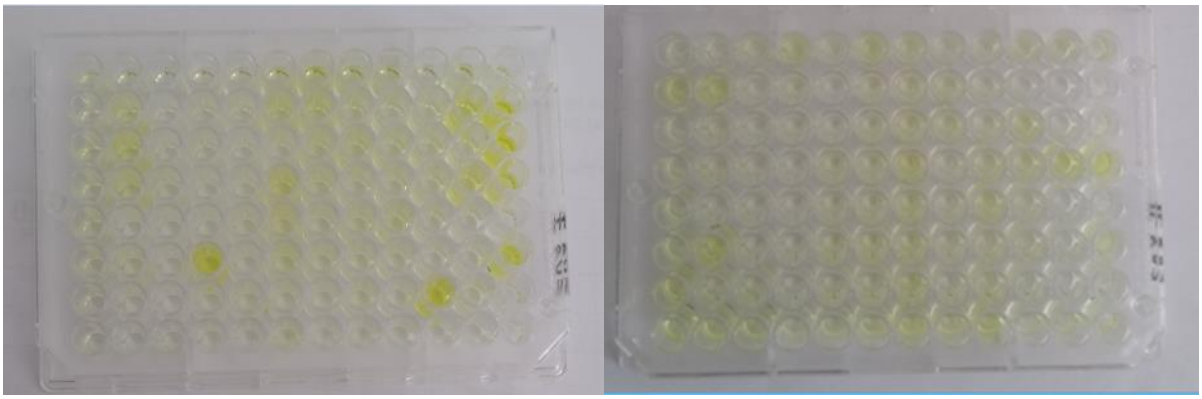
3. Rezultati istraživanja

Prijenos virusa vektorskim putem od inficirane loze na korove/test biljke dokazan je metodom ELISA, a kasnije potvrđen metodom RT-PCR. Ispitivanja su pokazala različitu osjetljivost korova/test biljaka na GLRaV-3 i GVA, odnosno različit spektar njihovih potencijalnih domaćina.

Fotografije mikrotitarskih pločica snimljene 2 sata nakon dodavanja supstrata prikazane su na Slikama 26. i 27.

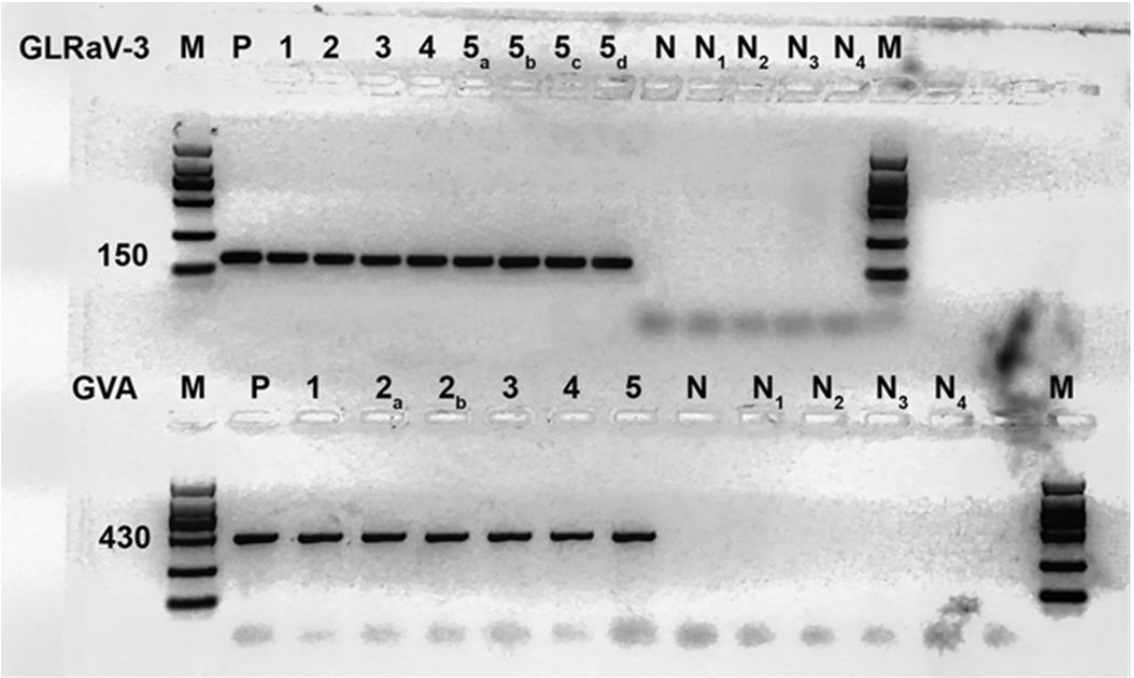


Slika 26. Mikrotitarska pločica broj 1 (lijevo) i broj 2 (desno) nakon ELISA reakcije za GLRaV-3 (Izvor: original)



Slika 27. Mikrotitarska pločica broj 1 (lijevo) i broj 2 (desno) nakon ELISA reakcije za GVA (Izvor: original)

Rezultati RT-PCR reakcije dobivene testiranjem pojedinih ELISA-pozitivnih uzoraka korova/test biljaka prikazani su na Slici 28., ukupni pregled rezultata dobivenih metodom ELISA i RT-PCR kod različitih korovnih vrsta/test biljaka prikazan je u Tablici 3., dok su rezultati prijenosa sa zaraženih test biljaka/korova na bezvirusnu vinovu lozu prikazani u Tablici 4.



Slika 28. Rezultati RT-PCR reakcija nakon elektroforeze na 1.5% agaroznom gelu. M = 100-500 DNA marker (Bio Basic Inc., Kanada). Gornij red (GLRaV-3, veličina produkta 150 parova baza): P – izvorišna biljka vinove loze (VVL-112), 1 - *Chenopodium album* (14-10), 2 - *Galinsoga parviflora* (11-4), 3 - *Chenopodium murale* (27-1), 4 – *Nicotiana benthamiana* (34-8), 5 – inokulirane test biljke vinove loze (5a CH6-29, 5b CH6-34, 5c CH6-14, 5d PN5-8), N – negativna kontrola vinova loza, N1 – negativna kontrola *Chenopodium album*, N2 - negativna kontrola *Galinsoga parviflora*, N3 - negativna kontrola *Chenopodium murale*, N4 – negativna kontrola *Nicotiana benthamiana*. Donji red (GVA, veličina produkta 430 parova baza): P – izvorišna biljka vinove loze (VVL-112), 1 – Abuthilon theophrasti (16-4), 2 – *Amaranthus retroflexus* (2a 3-1, 2b 3-2), 3 - Chenopodium murale (27-1), 4 – *Nicothinana benthamiana (*34-8), 5 – inokulirana test bilja vinove loze (PN5-3), N – negativna kontrola vinova loza, N1 - negativna kontrola *Abuthilon theophrasti*, N2 - negativna kontrola *Amaranthus retroflexus*, N3 - negativna kontrola *Chenopodium murale*, N4 - negativna kontrola *Nicothiana benthamiana*. (Izvor: D. Vončina)

Tablica 3. Rezultati prijenosa GLRaV-3 i GVA s vinove loze na korove/test biljke korištenjem štitastih uši vinove loze (*Planococcus ficus*). U prijenosu je korišteno 10 ličinki štitastih uši po biljci, a uspješnost prijenosa je provjerena metodom ELISA i RT-PCR dva mjeseca nakon inokulacije. Biljke sa spektrofotometrijskim očitanjima većima najmanje tri puta od očitanja negativnih kontrola smatrane su pozitivnima.

			GLRaV-3				GVA			
R.br	**Korovi/zeljaste test biljke**	**Broj biljaka**	**ELISA Prosječna vrijednost negativne kontrole**	**ELISA pozitivne**	**Interni kod biljke (ELISA očitanje)**	**RT-PCR**	**ELISA Prosječna vrijednst negative kontrole**	**ELISA pozitiv -ne**	**Interni kod biljke (ELISA očitanje)**	**RT-PCR**
Korovi										
1.	Europski mračnjak *(Abuthilon theophrasti)*	10	0,124	0	-	nt[5]	0,098	1	16-4 (0,298)	+
2.	Oštrodlakavi šćir *(Amaranthus retroflexus)*	10	0,115	0	-	nt	0,103	3	3-1 (1,127) 3-2 (3,194) 3-3 (0,678)	+ + -
3.	Ambrozija *(Ambrosia artemisifolia)*	2	0,148	0	-	nt	0,099	0	-	nt
4.	Poljski jarmen (*Anthemis arvensis)*	10	0,165	0	-	nt	0,100	0	-	nt
5.	Rusomača *(Capsella bursa-pastoris)*	11	0,152	1	10-6 (0,503)	-	0,095	0	-	nt
6.	Bijela loboda *(Chenopodium album)*	10	0,141	1	14-10 (0,431)	+	0,102	0	-	nt
7.	Bodljikavi osjak *(Cirsium arvense)*	1	0,122	0	-	nt	0,092	0	-	nt
8.	Kužnjak *(Datura stramonium)*	10	0,124	1	20-3 (0,406)	-	0,088	0	-	nt
9.	Divlja mrkva *(Daucus carota)*	10	0,126	0	-	nt	0,097	0	-	nt
10.	Sitnocvjetna konica *(Galinsoga parviflora)*	10	0,165	2	11-4 (1,1) 11-9 (0,507)	+ *	0,101	0	-	nt nt
11.	Kiseličasti dvornik (*Poligonum lapathifolium)*	9	0,123	1	7-9 (0,327)	-	0,092	0	-	nt
12.	Štavelj *(Rumex crispus)*	10	0,133	1	12-1 (0,401)	-	0,094	0	-	nt
13.	Crna pomoćnica *(Solanum nigrum)*	12	0,118	0	-	-	0,091	0	-	nt
Test biljke										
1.	*Chenopodium foetidum*	9	0,124	0	-	nt	0,094	0	-	nt
2.	*Chenopodium murale*	8	0,109	1	27-1 (0,333)	+	0,097	2	27-1 (1,495) 27-7 (0,383)	+ -
3.	*Chenopodium quinoa*	6	0,135	0	-	nt	0,095	0	-	nt
4.	*Nicotiana benthamiana*	10	0,112	2	34-4 (0,393) 34-8 (0,495)	- +	0,098	1	34-8 (1,549)	+
5.	*Nicotiana rustica*	10	0,118	0	-	nt	0,109	0	-	nt
6.	*N. tabacum var. samson*	10	0,120	2	31-2 (0,422) 31-4 (0,363)	- -	0,100	0	-	nt

Biljke označene plavo korištene su kao izvor virusa u prijenosu na bezvirusne biljke vinove loze. Oznake: + pozitivna, - negativna, nt – nije provedeno testiranje; * biljka uginula prije RT-PCR testiranja.

Tablica 4. Prijenos GVA i GLRaV-3 s korova/test biljaka na vinovu lozu. Prisutnost virusa je testirana metodom RT-PCR (dva mjeseca nakon inokulacije) i metodom ELISA (tri mjeseca nakon inokulacije).

		GVA		GLRaV-3	
Biljke izvor virusa	**Kod lozne sadnice**	**ELISA**	**RT-PCR**	**ELISA**	**RT-PCR**
Sitnocvijetna konica (*Galinsoga parviflora*) 11-4 (GLRaV-3)	CH6-30	N/A	N/A	0,125	-
	CH6-37	N/A	N/A	0,157	-
	CH6-29	N/A	N/A	0,139	+
	CH6-34	N/A	N/A	0,158	+
	CH6-28	N/A	N/A	*	-
	CH6-23	N/A	N/A	*	-
	CH6-26	N/A	N/A	*	-
Chenopodium murale 27-1 (GVA, GLRaV-3)	CH6-2	0,101	-	0,139	-
	CH6-14	0,107	-	0,181	+
	PN5-8	0,119	-	0,133	+
Prosječna vrijednost negativne kontrole/prazno		0,099/0,093		0,114/0,105	
Oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus*) 3-2 (GVA)	PN5-2	0,098	-		
	PN5-1	0,104	-		
	PN5-3	0,095	+		
	PN5-4	0,093	-		
	PN5-5	0,095	-		
	PN5-6	0,145	-		
	PN5-7	0,095	-		
Nicotiana benthamiana 34-8 (GVA)	PN5-11	0,099	-		
	PN5-12	0,095	-		
	PN5-13	0,097	-		
	PN5-15	0,096	-		
	PN5-16	0,098	-		
	PN5-17	0,102	-		
	PN5-18	*	-		
	PN5-19	0,101	-		
Europski mračnjak (*Abuthilon theophrasti*) 16-4 (GVA)	CH6-14	0,098	-		
	CG6-17	0,168	-		
	CH6-16	0,100	-		
	CH6-18	0,095	-		
	CH6-20	*	-		
	CH6-21	*	-		
Prosječna vrijednost negativne kontrole/prazno		0,099/0,093			

* – biljke uginule od gljivičnih bolesti prije testiranja.

Nakon ELISA i RT-PCR testa, potvrđen je prijenos GVA na dva česta korova u našim vinogradima: mračnjak (*Abuthilon theophrasti*) i oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus*) te na dvije test biljke: *Chenopodium murale* i *Nicotiana benthamiana*; te vektorski prijenos GLRaV-3 na korove: bijela loboda (*Chenopodium album*), sitnocvjetna konica (*Galinsoga parviflora*) i test biljke *Chenopodium murale i Nicotiana benthamiana*.

Povratni prijenos virusa vektorskim putem od inficiranih test biljaka/korova na neinficirane lozne sadnice također je dokazan spomenutim detekcijskim metodama. A-virus vinove loze (GVA) uspješno je prenesen štitastim ušima na lozu preko inficiranog korova *Amaranthus retroflexus*, a uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3) preko korova *Galinsoga parviflora* i test biljke *Chenopodium murale.*

4. Rasprava

Dokazano je da širenju virusa u vinogradima mogu doprinijeti različite uzgojne mjere (obrezivanje, vršikanje, strojne radnje i sl.) te vektorske vrste štitastih uši (Cabaleiro 2009, Charles i sur., 2006; Jooste i sur., 2011). Ovo istraživanje pokazuje potencijalni utjecaj korova, često prisutnih u vinogradima, kao potencijalnih izvora virusnog inokuluma za GLRaV-3 i GVA.

Do današnjih dana je kao primarni način širenja virusa, osobito u novo podignutim vinogradima, smatran sadni materijal, dok se širenju pomoću štitastih uši davala sekundarna uloga, odnosno uloga u širenju unutar istog ili susjednih vinograda. I dan danas, kontrola oba istraživana virusa oslanja se na uporabu certificiranog sadnog materijala, zbog čega su oba uključena u certifikacijske programe većine zemalja kod kojih vinogradarstvo predstavlja značajnu granu nacionalne ekonomije. Ponovna infekcija novopodignutih vinograda korištenjem zdravog sadnog materijala u relativno kratkom periodu (5 - 10 godina) i to na područjima bez blizine starih vinograda, upućivala je na sumnju da moraju postojati i alternativni izvori virusnih inokuluma. Na to upućuju i prijašnja istraživanja koja govore kako se osim na biljke iz roda *Vitis*, GVA može uspješno mehanički prenijeti s nekoliko vrsta štitastih uši na biljke *Nicotiana benthamiana* i *N. clevelandii* (Conti i sur., 1980; Minafra i sur., 1998; Monette i James, 1990a, b), dok je je prijenos GLRaV-3 dokazan korištenjem vrste *Planococcus ficus* na vrstu *Nicotiana benthamiana* (Prator i sur., 2017).

Ovo istraživanje zamišljeno je na način da simulira stvarne agroekološke uvjete u vinogradu. Stoga su u pokusu korištene različite biljne vrste (korovi), kakve se u sustavu danas vrlo popularnog „ekološko vinogradarstva“ toleriraju kao biljni pokrovi. Također, postavljanjem ličinki vrste *P. ficus* na otvoreno područje listova (bez kaveza), dajući im mogućnost da napuste biljku bez hranjenja, simulirani su prirodni uvjeti i situacije do kojih može doći u vinogradima. Korištenom metodom nije se željela dobiti infekcija korova pod svaku cijenu, već se kroz pozitivne rezultate u laboratoriju ujedno željela procijeniti mogućnost zaraze do koje može doći u prirodi. Dobiveni rezultati pokazali su da se u slučaju GLRaV-3 uspješan prijenos može postići i sa znatno manjim brojem kukaca (njihovih ličinki) i to uz njihovo slobodno kretanje po biljci u odnosu na prethodne rezultate i korištenje zatvorenog sustava prijenosa tj. kaveza (Prator i sur., 2017).

Utjecaj i značaj korova u pojavi, prijenosu i širenju virusnih oboljenja poljoprivrednih kultura već ranije je poznat i dokazan kod brojnih viroza (Duffus, 2003), no kod viroza vinove loze ne pridaje im se veći značaj. Rezultati ovog istraživanja daju nova saznanja o biologiji i epidemiologiji GLRaV-3 i GVA kroz spektar njihovih sekundarnih domaćina te postavljaju pitanje o sveukupnosti i učinkovitosti trenutno korištenih mjera kontrole. Naime, kako je ekološka poljoprivreda postala suvremeni trend u svijetu, ne zaobilazeći ni vinogradare, postavljeni su standardi u proizvodnji koji naglašavaju potrebu za očuvanjem ekosustava u

neposrednoj blizini poljoprivrednog sustava, čija uravnotežena interakcija dovodi do određene razine samoodrživosti u proizvodnji. Nesumnjivo je da su dio takvog agro-ekosustava i korovi te ostala vegetacija, kojima se u takvom gospodarenju okolišem daje nezaobilazna važnost. Uz sve dobrobiti i nedostatke koje zeleni pokrov unutar vinograda donosi samoj proizvodnji, ovo istraživanje definitivno stavlja upitnik na utjecaj korova u prijenosu viroza vinove loze. Za istražiti je predstavljaju li korovi u vinogradu svojevrsni most za širenje virusa sa zaražene na nezaraženu lozu pomoću štitastih uši, koje u velikom periodu svog životnog ciklusa imaju vrlo ograničenu pokretljivost te vektorsku sposobnost, koju posjeduju gotovo isključivo kao ličinke. To posebice dolazi do izražaja u slučajevima u kojima se vinograd iskrči i gdje nije prisutan niti vektor niti kultura kao primarni domaćin, ali gdje postoji mogućnost da virus opstane u korovu. Budući da u istraživanju na korovima zaraženima s GVA i/ili GLRaV-3 nisu primijećeni nikakvi simptomi, dodatno je otežano njihovo vizualno prepoznavanje u vinogradima. Ukoliko se u obzir uzme činjenica da se na lozi simptomi zaraze primjećuju tek u godini nakon infekcije i ovdje bi se moglo raditi o istom efektu. Simptomi koji bi upućivali na virusnu infekciju nisu zabilježeni niti kod ranije ostvarenog prijenosa GLRaV-3 na vrstu *N. benthamiana* (Prator i sur., 2017).

Trenutno u nedostatku kurativnih mjera za kontrolu virusnih bolesti vinove loze, naglasak je stavljen na preventive mjere. U prevenciji se poseban naglasak daje pravodobnim i preciznim dijagnostičkim metodama virusa, bilo u biljkama domaćina ili u njihovim vektorima, koje onda posljedično uključuju kontrolu/suzbijanje vektora ili krčenje pojedinačnih zaraženih biljaka. Cjelovite i sveobuhvatne epidemiološke studije na razini virus-domaćin-vektor vrlo su zahtjevne, ali i važne, jer objašnjavaju epidemiološke mehanizme preko kojih virusi ostvaruju infekciju. Osim osnovnog razumijevanja tog sustava, te nam studije služe za odabir odgovarajućih mjera kontrole, koje ne uključuju samo pravodobnu detekciju virusa, već i mogućnosti sprječavanja njihovog širenja.

Rezultati provedenog istraživanja ostavljaju otvorena pitanja koliko su u vinogradima česte korovne biljke zaražene sa GLRaV-3 i/ili GVA te u kojem postotku je moguć prijenos na zdravu/nezaraženu lozu pomoću vektora. Navedeni rezultati mogli bi imati utjecaj na bolju kontrolu virusnih bolesti vinove loze kroz moguću potrebu implementacije mjera usmjerenih na kontrolu korova kao izvora virusnog inokuluma. Time bismo mogli značajno produljiti vijek ekonomske eksploatacije vinograda u područjima visoko rizičnim za virusne zaraze, ali i spriječiti prijenos na područja izvan epidemiološkog kruga djelovanja ekonomski značajnih virusa.

5. Zaključci

1. U laboratorijskim uvjetima, uz simulaciju prirodnih uvjeta, potvrđen je prijenos GVA i GLRaV-3 pomoću ličinki prvog stadija štitastih uši *Planoccocus ficus* na četiri korova česta u hrvatskim vinogradima: GVA na europski mračnjak (*Abuthilon theophrasti*) i oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus*); GLRaV-3 na bijelu lobodu (*Chenopodium album*) i sitnocvjetnu konicu (*Galinsoga parviflora*). Kumulativno, GVA se uspješno prenio na pet jedinki test biljaka/korova iz četiri različite vrste, a GLRaV-3 na četiri jedinke test biljaka/korova iz četiri različite vrste (od 174 jedinke iz 19 vrsta korištenih u testovima prijenosa).

2. U istim uvjetima i uz korištenje istih vektora dokazan je prijenos GVA i GLRaV-3 na test biljke vrste *Chenopodium murale* i *Nicotiana benthamiana*.

3. Korovne/test biljke zaražene sa GLRaV-3 i GVA nisu iskazivale nikakve znakove infekcije pored onih koji bi mogli upućivati na nedostatak hranjivih tvari, budući su isti primijećeni i kod negativnih kontrola.

4. Moguć je povratni prijenos sa zaraženih korova/test biljaka na vinovu lozu. Navedeni prijenos dokazan je sa *Galinsoga parviflora* i *Chenopodium murale* u slučaju GLRaV-3 te *Amaranthus retroflexus* u slučaju GVA.

6. literatura

1. Almeida, R. P. P., Daane, K. M., Bell, V. A., Blaisdell, K., Cooper, M. L., Herrbach, E., Pietersen, G. 2013. Ecology and management of grapevine leafroll disease. Frontiers in Microbiology 4: 94.
2. Cabaleiro, C. 2009. Current advances in the epidemiology of grapevine leafroll disease. In Proceedings of 16th International Council for the Study of Viruses and Virus-Like Diseases of the Grapevine (ICVG). Dijon, France, 31 August – 4 September: 264-268.
3. Charles, J. G., Cohen, D., Walker, J. T. S., Forgie, S. A., Bell, V. A. Breen, K. C. 2006. A review of the ecology of Grapevine leafroll associated virus type 3 (GLRaV-3). New Zealand Plant Protection 59: 330-337.
4. Conti, M., Milne , R. G., Luisoni, E., Boccardo, G. 1980. A closterovirus from a stem-pitting-diseased grapevine. Phytopathology 70(5): 394-399.
5. Daane, K. M., Middleton, M. C., Sforza, R., Cooper, M. L., Walton, V. M.,, Walsh, D. B., Zaviezo, T., Almeida, R. P. 2011. Development of a multiplex PCR for identification of vineyard mealybugs. Environ Entomol. 40(6): 159-1603.
6. Duffus, J. E. 2003. Role of weeds in the incidence of virus diseases. Annual Review of Phytopathology 9 (1): 319-340.
7. DZS (2018), DZS – Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske.
   Proizvodnja Povrća, voća i grožđa U 2017. – privremeni podaci <https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2017/01-01-28_01_2017.htm>
   Pristupljeno 27. siječnja 2019.
8. Fuller, K. B., Alston, J. M., Golino, D. A. 2015. The economic benefits from virus-screening: A case study of grapevine leafroll in the North Coast of California. Am. J. Enol. Vitic. 66: 112-119.
9. Jooste, A. E. C.; Pietersen, G.; Burger, J. T. 2011. Distribution of grapevine leafroll associated virus-3 variants in South African vineyards. European Journal of Plant Pathology 131: 371-381.
10. Krűger, K., Saccaggi, D., Douglas, N. 2006. *Grapevine leafroll-associated virus 3*-vector interactions: Transmission by the mealbugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: Pseudoccocidae). In Extended abstracts 15th meeting of ICVG, Stelenbosch, South Africa, 130-131.
11. La Notte, P., Buzkan, N., Choueiri, E., Minafra, A., Martelli, G. P. 1997. Acquisition and transmission of *Grapevine virus A* by the mealbug *Psudococcus longispinus*. Journal of Plant Pathology 79: 79-85.
12. Maceljski M. (2002). Poljoprivredna entomologija, *II.* nadopunjeno izdanje,. Zrinski, Čakovec
13. Martelli, G. P. 2014. Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Journal of Plant Pathology 96 (1S): 1-136.

14. Martelli, G. P., Boscia, D., Choueiri, E., Digiaro, M., Castellano, M. A., Savino, V. 1994. Occurrence of filamentous viruses and rugose wood of grapevine in Yemen. Phytopathologia Mediterranea 33: 146-151.
15. Meng, B., Martelli, P. G., Golino, D. A., Fuchs, M. 2017. Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management 978: 167-197, 229-257
16. Minafra, A., Guilles, R., Machado, A. C., Saldarelli, P., Buzkan, N., Savino, V., Martelli, G. P., Katinger, H., Machado, M. C. 1998. Expression of the coat protein genes of grapevine virus A and B in Nicotiana species and evaluation of the resistance conferred on transgenic plants. Journal of Plant Pathology 80(3): 197-202.
17. Minafra, A., 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(1-2): 175-187.
18. Monette, P. L., James, D. 1990. Detection of two strains of grapevine virus A. Plant Disease 74(11): 898-900.
19. Monette, P. L., James, D. 1990. Use of in vitro cultures of *Nicotiana benthamiana* for the purification of grapevine virus A. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23(2): 131-134.
20. OIV 2018. OIV - The International Organisation of Vine and Wine <http://www.oiv.int/public/medias/6372/oiv-report-on-the-world-vitivinicultural situation-2018.pdf> Pristupljeno: 27. siječnja 2019.
21. Plant Pests of the Middle East 2018. U. Gerson, S. Applebaum: The Robert H Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment The Hebrew University of Jerusalem <http://www.agri.huji.ac.il/mepests/> Pristupljeno 29. studenog 2018.
22. Prator, C. A., Kashiwagi, C. M., Vončina, D., Almeida, R. P. 2017. Infection and colonization of *Nicotiana benthamiana* by *Grapevine leafroll-associated virus 3*. Virology 510: 60-66.
23. Rosciglione, B., Castellano, M. A., Martelli, G. P., Savino, V., Cannizzaro, G. 1983. Mealybug transmission of *Grapevine virus A*. Vitis:22: 331-347.
24. Rosciglione, B., Gugerli, P. 1989. Transmission of grapevine leafroll disease and as associated closterovirus to healthy grapevines by the mealybug *Planococcus ficus* Signoret. In Proceedings of the 9th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Kiryat Anavim, Israel: 13-14.
25. Tanne, E., Ben-Dov, Y., Raccah, B. 1989. Transmission of clostero-like particles associated with grapevine leafroll by mealybugs (Pseudococcidae) in Israel. In Proceedings of the 9th Congress of the International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine (ICVG), Kiryat Anavim, Israel: 15-16.

Slike:

1. Slika 1. <https://www.researchgate.net> Pristupljeno 25. studenog 2018.
2. Slike 2. i 3. <https://www.frontiersin.org> Pristupljeno 25. studenog 2018.
3. Slika 4. <https://talk.ictvonline.org> Pristupljeno 25. studenog 2018.
4. Slike 5., 6. i 7. <https://www.researchgate.net> Pristupljeno 27. siječnja 2019.

Životopis



Martin Jagunić, rođen 9. studenog 1995. godine u Zagrebu, živi u mjestu Plešivica nedaleko grada Jastrebarskog, u osmeročlanoj obitelji. 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.

Martin je rođen kao pripadnik 4. generacije obiteljskih vinara i od malih nogu sudjeluje u svim važnijim poslovima obiteljske vinarije, koja je poglavito orijentirana na proizvodnju pjenušavih vina. Kao ljubitelj prirode i živog svijeta, a poučen iskustvom proizvodnje, 2014. godine upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu studij "Zaštita bilja". Titulu univ. bacc. ing. agr. stječe 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. Iste godine upisuje studij "Fitomedicina" na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. U akademskoj godini 2018/2019 izrađuje diplomski rad pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Darka Vončine na Zavodu za fitopatologiju.

Slobodno vrijeme Martin voli provoditi s prijateljima, sa životinjama i biljkama, s gitarom te s ponekom amaterskom glumačkom ulogom.