

In vitro metode ozdravljenja tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira

Rohrbacher, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

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:204:123002>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

***In vitro* metode ozdravljenja tradicijskog kultivara
krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira**

DIPLOMSKI RAD

Valentina Rohrbacher

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Biljne znanosti

***In vitro* metode ozdravljenja tradicijskog kultivara
krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira**

DIPLOMSKI RAD

Valentina Rohrbacher

Mentor:

prof. dr. sc. Snježana Kereša

Zagreb, rujan, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Valentina Rohrbacher**, JMBAG 0068227146, rođen/a 15. 06. 1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

***In vitro* metode ozdravljenja tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira**

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Valentine Rohrbacher**, JMBAG 0068227146, naslova

***In vitro* metode ozdravljenja tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. prof. dr. sc. Snježana Kereša mentor

2. prof. dr. sc. Milan Pospišil član

3. izv. prof. dr. sc. Darko Vončina član

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Snježani Kereša na podršci i pomoći prilikom provedbe i pisanja ovog istraživačkog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima na podršci tijekom 5 godina studiranja na Agronomskom fakultetu.

Zahvaljujem se svim ženama u znanosti prije mene i onima poslije mene na postignućima koja nisu uvijek prepoznata i koja su ostvarena unatoč mnogim preprekama.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja	1
2. Pregled literature	2
2.1. Proizvodnja krumpira.....	2
2.2. Proizvodnja krumpira u Hrvatskoj	2
2.3. Tradicijski kultivar krumpira.....	3
2.3.1. Tradicijski kultivar 'Brinjak'	3
2.3.2. Kategorije i certifikacija sjemenskog krumpira.....	5
2.4. Virus krumpira.....	7
2.4.1. S-virus krumpira (PVS)	7
2.4.2. M-virus krumpira (PVM)	7
2.5. Metode ozdravljenja od virusa.....	8
2.5.1. Kultura meristema	8
2.5.2. Termoterapija	9
2.5.3. Kemoterapija	9
2.5.4. Termoterapija u kombinaciji s kemoterapijom	10
2.5.5. Elektroterapija	10
2.5.6. Krioterapija	10
2.6. Metode detekcije virusa.....	10
2.6.1. Metoda ELISA.....	11
2.6.2. Lančana reakcija polimerazom - PCR.....	12
3. Materijali i metode	13
3.1. Biljni materijal.....	13
3.2. Sterilizacija biljnog materijala i uspostava <i>in vitro</i> kulture krumpira	13
3.3. Tretmani.....	14
3.3.1. Termoterapija na 37 °C u kombinaciji s izoliranim meristemima	15
3.3.2. Elektroterapija u kombinaciji s izoliranim meristemima	15

3.3.3.	Izolirani meristemi	16
3.4.	Uvjeti uzgoja i supkultivacije	16
3.5.	Sadnja biljaka u supstrat i aklimatizacija.....	17
3.6.	Metoda ELISA	18
3.6.1.	Uzimanje uzoraka listova za testiranje metodom ELISA	18
3.6.2.	Postupak testiranja	18
3.7.	Analiza podataka	20
4.	Rezultati	21
4.1.	Uspostava i preživljavanje meristema u <i>in vitro</i> kulturi	21
4.2.	Utjecaj tretmana na oslobađanje biljaka od M-virusa krumpira	24
4.3.	Usporedba uspješnosti ozdravljenja biljaka od M-virusa hi-kvadrat testom ...	27
5.	Diskusija	30
6.	Zaključak.....	32
7.	Popis literature	33
	Životopis	37

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Valentina Rohrbacher**, naslova

***In vitro* metode ozdravljenja tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira**

'Brinjak' je tradicijski kultivar krumpira koji se generacijama uzgaja u Lici. Otporan je na plamenjaču i običnu krastavost krumpira, no zbog zaraze virusima u proizvodnji ne može postići svoj puni potencijal rodosti. M-virus krumpira (eng. *potato virus M*, PVM) može smanjiti prinos gomolja od 11-45%. Primjenjujući tri različite *in vitro* metode pokušali smo eliminirati M-virus krumpira kojim je ovaj kultivar zaražen. Korištene su metode kulture izoliranih meristema bez prethodne terapije, kulture meristema nakon termoterapije na 37 °C i kulture meristema nakon elektroterapije. Metodom ELISA ispitana je prisutnost M-virusa krumpira u listovima krumpira 'Brinjak' tretiranih trima navedenim metodama. Rezultati istraživanja su pokazali da je najveći postotak biljaka oslobođenih od M-virusa krumpira dobiven nakon tretmana termoterapijom u kombinaciji s kulturom meristema (94,1 %). Elektroterapijom u kombinaciji s kulturom meristema oslobođeno je 64,7 % uzoraka krumpira, a izolacijom meristema bez prethodnih tretmana 53,8 % prethodno zaraženih uzoraka kultivara 'Brinjak'.

Ključne riječi: Brinjak, PVM, ELISA, *in vitro*, termoterapija, elektroterapija, kultura meristema

Summary

Of the master's thesis – student **Valentina Rohrbacher**, entitled

***In vitro* methods of elimination of potato virus M from traditional potato cultivar 'Brinjak'**

'Brinjak' is a traditional potato cultivar that has been grown in Lika for generations. It is resistant to late blight and common potato scab. However, due to virus infection during production, it cannot achieve its full yield potential. PVM (Potato virus M) can reduce tuber yield by 11-45%. Applying three different *in vitro* methods, we tried to eliminate the PVM with which this cultivar was infected. The methods that were used were isolated meristems without previous therapy, meristems after thermotherapy at 37 °C and meristems after electrotherapy. Then, the presence of PVM virus, in the leaves of cultivar 'Brinjak', was determined by using the ELISA method. The results showed that the highest percentage of virus-free plants of potato 'Brinjak' was obtained after treatment with thermotherapy in combination with meristem culture (94.1%). Electrotherapy in combination with meristem culture eliminated viruses from 64.7% of treated plants, while by the culture of isolated meristems without prior treatment PVM was eliminated from 53.8% of the plants.

Keywords: Brinjak, PVM, ELISA, *in vitro*, thermotherapy, electrotherapy, meristem culture

1. Uvod

Krumpir je gospodarski važna agroindustrijska kultura koja se razmnožava vegetativno putem gomolja. Veliko ograničenje kod proizvodnje i zadovoljavajućih prinosa krumpira predstavlja potencijalni prijenos virusa kroz sjemenske gomolje iz generacije u generaciju. Razvijeno je nekoliko *in vitro* postupaka eliminacije virusa krumpira koje se danas koriste u svrhu dobivanja zdravih kultivara krumpira. Kultura meristema se koristi sama ili u kombinaciji s metodama kao što su termoterapija, elektroterapija, krioterapija i kemoterapija. Odabir najbolje metode uvelike ovisi i o kultivaru krumpira, kao i tipu virusa kojim je zaražen (Gong i sur., 2019). U ovom radu opisan je postupak i rezultati oslobađanja tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira (eng. *potato virus M*, PVM) korištenjem triju metoda: metode kulture meristema, kulture meristema u kombinaciji s termoterapijom i kulture meristema u kombinaciji s elektroterapijom. Kultivar 'Brinjak' jedan je od mnogobrojnih tradicijskih kultivara koji se vrlo malo koristi u proizvodnji i to uglavnom za vlastite potrebe na području Like, a vrijedi ga očuvati zbog njegove prirodne otpornosti na plamenjaču i običnu krastavost krumpira (Kereša i sur., 2022). Kako bi došao do izražaja puni potencijal rodosti kultivara 'Brinjak', potrebno ga je također osloboditi od virusa. Tim će se steći preduvjet za njegovo širenje u proizvodnji, posebice ako bude uvršten na listu čuvanih sorti. Očekivanja kroz provođenje eksperimenta su da će se jednom ili više navedenih metoda uspjeti osloboditi tkivo krumpira od M-virusa krumpira. Uspješnost eliminacije virusa trima metodama bit će ispitana metodom ELISA.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je osloboditi tradicionalni kultivar krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira kojim je zaražen korištenjem triju metoda eliminacije virusa. Provođen će se terapija strujom, toplinom i izoliranim meristemima.

2. Pregled literature

2.1. Proizvodnja krumpira

Krumpir (*Solanum tuberosum* L.) treća je kultura po važnosti za ljudsku prehranu nakon riže i pšenice. Ukupna svjetska proizvodnja krumpira iznosi 359 milijuna tona godišnje. Najveći svjetski proizvođači krumpira su: Kina (78,1 milijuna tona), Indija (51,3 milijuna tona), Ukrajina (20,8 milijuna tona), Rusija (19,6 milijuna tona) i Sjedinjene Američke Države (18,8 milijuna tona). Od ukupne svjetske proizvodnje krumpira 21,8% se proizvodi u Kini, a 14,3% u Indiji. U Europskoj uniji je najveći proizvođač Njemačka (21,2%), a zatim Poljska (16,4%) pa Francuska (15,7%) (EUROSTAT, 2021). Najveći se dio troši za ljudsku prehranu, zatim za hranidbu stoke, za preradu i kao sjeme, a ostalo su gubitci. U svijetu raste potrošnja polupreradevina i prerađevina (čips, pomfrit..). Krumpir se proizvodi u oko 130 zemalja svijeta i prema analizama daje najviše hrane prema utrošenoj litri vode što je važan podatak uoči sve ekstremnijih klimatskih promjena i porastu površina pod utjecajem stresa suše. Potrebno je napomenuti da dok je količina vode koju zahtjeva niža, potrebna je konstantna opskrba za pravilan razvoj gomolja. S obzirom na prije spomenute klimatske poteškoće, krumpir se kao poljoprivredna kultura ističe i prema potrebama za gnojidbom koje su manje od spomenutih vodećih kultura (Buturac, 2013).

2.2. Proizvodnja krumpira u Hrvatskoj

U Hrvatskoj postoje dva proizvodna područja uzgoja sjemenskog krumpira i oba se nalaze u kontinentalnom dijelu države. U brdskom se području sjemenski krumpir proizvodi u Lici, dok se u ravničarskom području proizvodi na području Slatine. Sjemenska proizvodnja krumpira u RH u razdoblju od 1998. do 2008. godine činila je samo 20-25% hrvatskih potreba za sjemenskim krumpirom (Matjačić, 2009). Proizvodnja konzumnog krumpira pokriva i jadransku regiju Hrvatske gdje se najviše uzgaja rani krumpir (Istra, Ravni kotari, područje oko Metkovića). Kontinentalni dio Hrvatske ima visoku zastupljenost proizvodnje krumpira za prehranu. U panonskoj regiji prednjače Međimurska, Varaždinska i Bjelovarsko-bilogorska županija dok u brdskom području prednjače Gorski kotar i Lika (Korunek i Pajić, 2007). Samodostatnost krumpira u Hrvatskoj u periodu od 2008. do 2012. godine varira između 81-90% (Gugić i sur., 2014). Proizvodnja krumpira u Hrvatskoj oscilira iz godine u godinu, a površine pod krumpirom se svake godine smanjuju. Prinos krumpira po hektaru krumpira uvelike ovisi o vremenskim prilikama, odnosno godini. Godine 2016. zabilježen je porast priroda po hektaru mnogih poljoprivrednih kultura, kao i krumpira, poglavito zahvaljujući povoljnim vremenskim prilikama. Već 2017. uzrokovano vremenskim nepogodama bilježimo značajan pad u proizvodnji (Tablica 2.2.1.).

Tablica 2.2.1. Požnjevena površina i proizvodnja krumpira u Hrvatskoj (rani, kasni i sjemenski)

Godina	Požnjevena površina u ha	Prirod po ha, t	Proizvodnja, t
2013.	10 234	15,9	162 501
2014.	10 310	15,6	160 847
2015.	10 047	17	171 179
2016.	9 866	19,7	193 962
2017.	9 833	15,9	156 089
2018.	9272	19,66	182 261
2019.	9387	18,4	173 149
2020.	9325	18,70	174 279
2021.	9000	14,5	128 000
2022.	8000	14,1	107 000

Izvor: Statistički ljetopis Republike Hrvatske, Državni zavod za statistiku RH (2022).

Prema podacima iz tablice 2.2.1. možemo vidjeti da su površine pod krumpirom u posljednjih 10 godina pale s 10 234 ha na samo 8000 ha. Isto tako ukupna proizvodnja bilježi značajan pad. Niski prinosi po hektaru se mogu pribilježiti malim ulaganjima u suvremene tehnologije, izostanku navodnjavanja, usitnjenim poljoprivrednim površinama i potencijalno nedovoljnom znanju proizvođača (Pospišil, 2020).

2.3. Tradicijski kultivari krumpira

U Hrvatskoj postoji prema nekim procjenama čak 150 različitih kultivara krumpira, međutim u praksi se sadi dvadesetak kultivara (Agroklub, 2011). Moderni kultivari krumpira imaju više prinose i otpornost na neke bolesti te se zato i koriste u intenzivnoj proizvodnji za industrijski kao i za konzumni krumpir. Unatoč tome, potrebno je obratiti pozornost na tradicijske kultivare krumpira. Očuvanjem tradicijskih kultivara održavamo i čuvamo bioraznolikost. Intenzivna supstitucija tradicijskih kultivara modernim visokoprinosnim kultivarima u poljoprivrednoj proizvodnji prošlog stoljeća rezultirala je erozijom gena iz razloga što su tradicijski kultivari izvor genetske varijabilnosti za mnoga svojstva (Raggi i sur., 2022). Pohranom zdravih jedinki takvih kultivara u gen banke čuvamo izvor potencijalnih otpornosti na bolesti, štetnike i okolišne stresove (suša). Takvi se kultivari u Hrvatskoj većinom održavaju na manjim obiteljskim gospodarstvima.

2.3.1. Tradicijski kultivar 'Brinjak'

'Brinjak' je tradicijski kultivar krumpira koji potječe iz Like. Lokalni uzgajivači s tih područja tvrde da pokazuje prirodnu otpornost na plamenjaču (*Phytophthora infestans*) i na običnu krastavost krumpira (*Streptomyces scabies*). Predstavlja dobar izvor gena otpornosti na ove bolesti i temeljem toga postoji interes za stavljanjem 'Brinjaka' na listu čuvanih sorata. Ovo će omogućiti komercijalni uzgoj i prodaju ovog krumpira u Republici Hrvatskoj. Godine

2018. je unesen u Hrvatsku bazu podataka o biljnim genetskim izvorima pod brojem primke IND00068. Lokacija sigurnosne kolekcije nalazi se u OPG Kostelić Srećko u Ogulinu (CPGRD HAPIH, 2023). 'Brinjak' pripada kasnim sortama krumpira. Krumpir ima kratke uspravne stabljike (Slika 2.3.1.1.) te proizvodi manje gomolje okruglog oblika i bež boje kože. Meso gomolja je srednje žute nijanse (Slika 2.3.1.2.) te pri punoj zrelosti gomolj sadrži visok udio suhe tvari (Kereša i sur., 2022).



Slika 2.3.1.1. Brinjak u komori rasta na Agronomskom fakultetu u Zagrebu

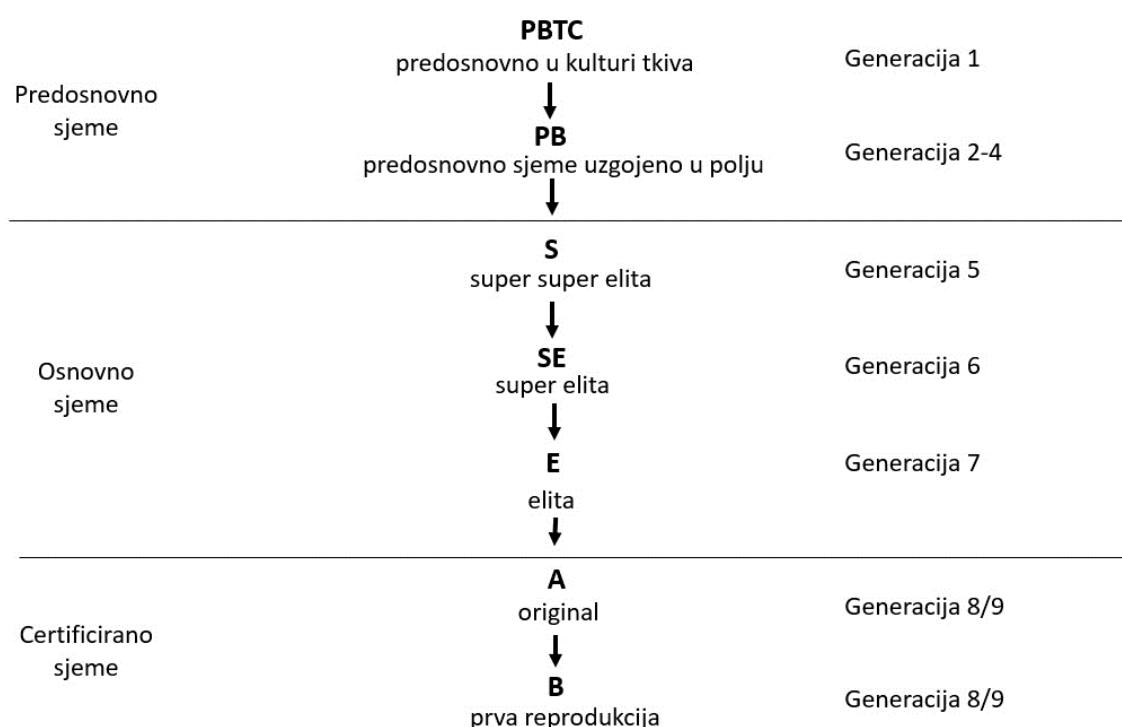


Slika 2.3.1.2. Gomolj krumpira Brinjaka

Izvor: Hrvatska baza podataka o biljnim genetskim izvorima <https://cpgrd.hapih.hr/gb/ind/>

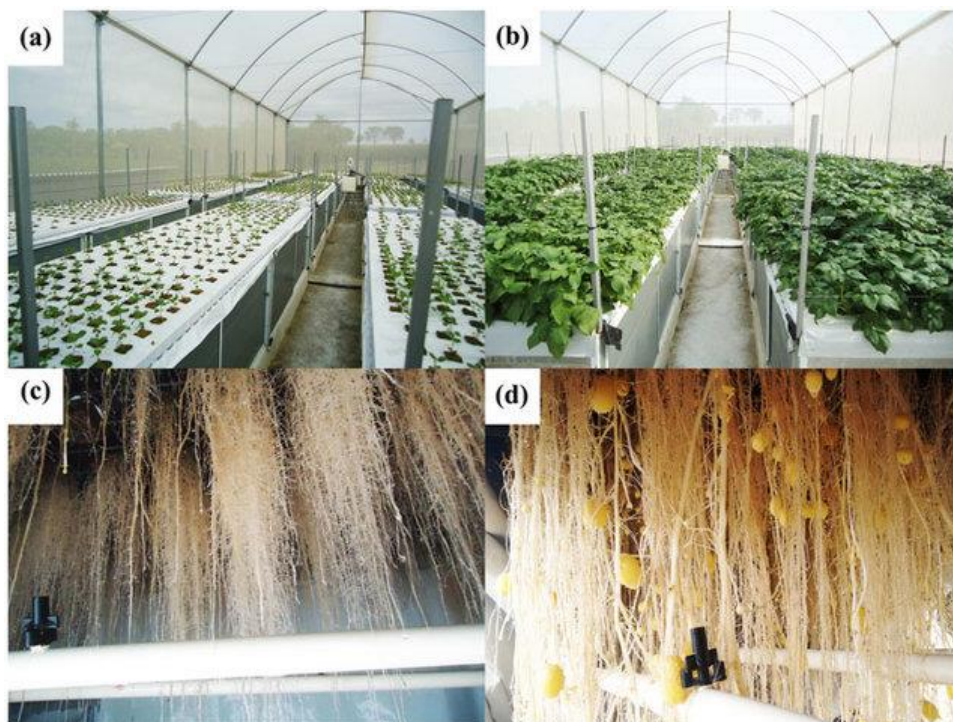
2.3.2. Kategorije i certifikacija sjemenskog krumpira

Sistem certifikacije sjemenskog krumpira u Europskoj uniji podrazumijeva održavanje kultivara krumpira u kulturi tkiva kao mikropropagiranih biljaka. Prvotne biljke, najčešće zvane matičnim biljkama, testiraju se na patogene krumpira uključujući sve glavne viruse krumpira, bakterijske i gljivične patogene (Frost i sur., 2013) te moraju biti apsolutno slobodne od svih patogena na koje su testirane. Matične biljke spadaju u kategoriju **predosnovnog sjemena** u kulturi tkiva PBTC (*Pre Basic Tissue Culture*) (Slika 2.3.2.1.). U istu kategoriju (PBTC) spadaju i mikrogomolji dobiveni u kulturi tkiva od eksplantata matičnih biljaka, kao i minigomolji koji se dobiju sadnjom u zaštićenom prostoru od biljaka krumpira *in vitro* razmnoženih od matičnih biljaka. Proizvodnja minigomolja ograničena je na jednu generaciju.



Slika 2.3.2.1. Kategorije certificiranog sjemena krumpira u Europskoj uniji

Inovativni trend proizvodnje minigomolja u kategoriji PBTC sjemena je aeroponski uzgoj biljaka koji daje velike prinose po jedinici površine (Slika 2.3.2.2.)



Slika 2.3.2.2. Aeroponski uzgoj krumpira
(Izvor: Calori i sur. 2018)

Minigomolji se zatim sade u polje te se u tim uvjetima razmnožavaju narednih nekoliko generacija (Frost i sur., 2013). Ova kategorija sjemena naziva se **predosnovno sjeme** ugojeno u polju (PB) (**Slika 2.3.2.1.**). Predosnovno sjeme se također zove i izvorno sjeme te to moraju biti gomolji proizvedeni u skladu s prihvaćenom praksom za održavanje sorte i zdravstvenog stanja te moraju odgovarati uvjetima za predosnovno sjeme.

Iduća kategorija u certifikaciji je **osnovno sjeme (Slika 2.3.2.1.)** koja potiče od predosnovnog sjemena te podliježe istim zahtjevima o zdravstvenom statusu biljke kao i predosnovno sjeme. Primarno je namijenjeno kao sjeme za proizvodnju certificarnog krumpira te se može umnažati u tri generacije pri čemu prva generacija nosi oznaku S (super super elita), druga generacija nosi oznaku SE (super elita) i treća generacija umnažanja koja nosi oznaku E (elita). Zadnja kategorija sjemena je **certificirano sjeme (Slika 2.3.2.1.)** koje potiče od osnovnog sjemena krumpira te se primarno koristi za proizvodnju merkantilnog krumpira, a ne više sjemenskog. Može se umnažati u dvije generacije pri čemu prva generacija nosi oznaku razred A (original), a druga generacija nosi oznaku razred B (prva reprodukcija). Službeni nadzor utvrđuje da certificirano sjeme ispunjava minimalne uvjete (Animal and Plant Health Agency, 2023 ; Medved, 2022 ; Pravilnik o prometu sjemenskog krumpira, 2015).

2.4. Virusi krumpira

Virusi krumpira odgovorni su za više od 50% gubitaka prinosa i uzrokuju velike ekonomske štete (Kereša i sur., 2022). Na krumpiru se javlja veći broj gospodarski važnih virusa. Većina njih prenose se lisnim ušima na neperzistentan način. Slučajevi mješovitih zaraza su česti. Simptomi koji se javljaju na biljkama su manje ili više karakteristični, ovisno o vrsti i soju virusa, sorti krumpira i uvjetima okoline. Virusi općenito značajno utječu na prinos i kakvoću prinosa krumpira. Zajedničko im je da se u pravilu svi mogu prenositi zaraženim gomoljima. U prošlosti, kada su proizvođači koristili isključivo vlastiti sjemenski krumpir, poznata je bila pojava zvana „degeneracija“ ili „izrođivanje“ krumpira. Ta pojava bila je vezana uz nagomilavanje i prenošenje virusa gomoljima koji su služili kao sjeme. Najvažnijim virusima na krumpiru smatraju se Y-virus krumpira (eng. *potato virus Y*, PVY), X-virus krumpira (eng. *potato virus X*, PVX), M-virus krumpira (eng. *potato virus M*, PVM), S- virus krumpira (eng. *potato virus S*, PVS), A-virus krumpira (eng. *potato virus A*, PVA) i virus uvijenosti lista krumpira (eng. *potato leaf roll virus*, PLRV). Kako se često javljaju u mješovitim zarazama i prenose se istim vrstama lisnih ušiju, na sjemenskom krumpiru ti su virusi regulirani zajednički, kao skupina (HAPIH, 2022). Komercijalno važni virusi krumpira uzrokuju smanjenje udjela škroba u gomolju i druge biokemijske i fiziološke promjene koje se očituju smanjenjem sadržaja suhe tvari, vitamina i smanjenjem škrobnih zrnaca (Kolychikhina i sur., 2021).

2.4.1. S-virus krumpira (PVS)

S-virus krumpira širi se lisnim ušima ili kontaktom zaražene biljke sa zdravom biljkom. Kod S-virusa simptomi su većinom slabo izraženi. Pojavljuje se blago svijetla boja lišća ili lišće postaje hrapavo s blago udubljenim žilama na plojci listova. (HAPIH, 2022). Zbog slabe izraženosti simptoma virus je otkriven tek 1950-ih. Dominantan način prijenosa zaraze je korištenje zaraženog sadnog materijala iz razloga što se krumpir sadi iz gomolja, odnosno razmnožava vegetativno. Posljedica zaraze krumpira ovim virusom ogleda se na smanjenom prinosu i to do 20% (Vončina, 2013).

2.4.2. M-virus krumpira (PVM)

M-virus krumpira jedan je od najproširenijih virusa krumpira u cijelom svijetu. Prenosi se lisnim ušima ili kontaktom zaražene biljke sa zdravom biljkom. Na većini suvremenih sorata krumpira ne uzrokuje simptome, no katkada može uzrokovati blagi mozaik na lišću (Slika 2.4.2.1.). Bez obzira na izostanak simptoma, zaraza tim virusom može značajno utjecati na prinos (HAPIH, 2022). PVM može uzrokovati smanjenje prinosa krumpira do 45%, a u nekim regijama kultivari mogu biti i u potpunosti zaraženi. Simptomi bolesti zaraze ovim virusom slični su zarazi s S-, X- i Y- virusima krumpira, a intenzitet pojave simptoma ovisi o kultivaru krumpira i kombinaciji zaraze još nekim virusima. Kontrola ovog virusa podrazumijeva

korištenje zdravih sjemenskih gomolja krumpira. Dominantni postupak dokazivanja prisutnosti ovog virusa je metoda ELISA (Xu i sur., 2010).



Slika 2.4.2.1. Zdrava biljka krumpira (lijevo) i biljka krumpira zaražena M-virusom krumpira (desno)

Izvor: The french seed potato <http://frenchseedpotato.com/index/potato-virus-m#prettyPhoto>

2.5. Metode ozdravljenja od virusa

Zbog gospodarske i ekonomske važnosti krumpira kao prehranebene i industrijske kulture imamo interes proizvoditi krumpir slobodan od virusa kako bi imao što bolji prinos. S obzirom na korištenje gomolja kao sjemena za reprodukciju krumpira, potrebno je isti osloboditi od svih bolesti i virusa. *In vitro* metode su se pokazale iznimno učinkovite u oslobođenju krumpira od virusa. Koristi se kultura meristema koja se često kombinira s metodama termoterapije, elektroterapije, kemoterapije i krioterapije. Odabir najbolje metode ili najbolje kombinacije metoda ovisi o kultivaru krumpira, antivirusnim sredstvima, vrsti virusa kojim je biljka zaražena i trajanju primijenjenih metoda (Gong i sur., 2019).

2.5.1. Kultura meristema

Prema Quaku (1987), meristem je kupola stanica koje se aktivno dijele, prosječne veličine 0,1 mm u promjeru i duljine 0,25 mm. Izrezivanje i regeneracija tako malih meristema *in vitro* je teška. Kultura meristema podrazumijeva kultiviranje na hranidbenom mediju *in vitro* meristema veličine 0,1-0,5 mm. Meristemi se najčešće izoliraju iz vegetativnog vrha, pupa u pazušcu lista ili od korijena. Ova se metoda vodi kao standardna za oslobođenje tkiva biljaka

od virusa (Sastry i Zitter, 2014). Kod uzimanja meristema krumpira za kulturu bitna je veličina uzorka. Obrnuto je proporcionalna šansa oslobođenja tkiva od virusa i veličina izoliranog vegetacijskog vrška (meristem s nekoliko primordijalnih listića). Potrebno je uzeti iznimno male meristeme što predstavlja velik izazov. Također kod meristema malih dimenzija postoji opasnost od somaklonske varijacije koja nam u ovom slučaju nije poželjna. Iz ovog se razloga kultura meristema često kombinira s drugim metodama oslobođenja biljnog tkiva od virusa (Wang i sur. 2008).

2.5.2. Termoterapija

Termoterapija jedna je od konvencionalnih metoda oslobođenja biljnog tkiva od virusa zbog negativnog utjecaja povišene temperature na virusnu RNA (Wang i sur. 2008). Tretman biljnog tkiva visokim temperaturama značajno smanjuje replikaciju mnogih biljnih virusa ometanjem sinteze virusne jednolančane, ssRNA i dvolančane, dsRNA. Više temperature (35-37°C) uzrokuju poremećaj u proizvodnji i/ili aktivnosti virusnih proteina za kretanje (*movement proteins*, MP) i proteina kapside (*coat proteins*, CP). MP sudjeluju u kretanju virusa od stanice do stanice kroz plamodezme i vaskularni sustav biljaka, dok CPs igra ulogu u rekonstrukciji virusnih čestica iz repliciranih virusnih nukleinskih kiselina (http://14.139.61.83/Ebook_SeedProductionTechniques/Thermotherapy.htm).

Termalna osjetljivost velikog broja virusa viša je od termalne osjetljivosti tkiva biljke pa se ova metoda uspješno koristi za eliminaciju virusa iz biljnog tkiva bez velikog oštećenja tog istog tkiva. Uspješnost ove metode ovisi o kultivaru krumpira, vrsti virusa te trajanju primjene ove metode na biljno tkivo. Moguće je koristiti ovu metodu u kombinaciji s ostalim metodama za bolje rezultate (Gong i sur., 2019).

2.5.3. Kemoterapija

Jednostavnost kombiniranja ove metode s kulturom meristema, a i ostalim metodama eliminacije virusa u biljnom tkivu rezultirala je njenom čestom uporabom u eliminaciji virusa krumpira PVX, PVY, PVM i PLRV (Cassells i Long 1982). Učinkovitost ove metode ovisi o koncentraciji kemijskog spoja koji se koristi i obliku u kojem se primjenjuje. Ribavirin ima antivirusna svojstva te se pretpostavlja da negativno utječe na dodavanje kape na virusnoj RNA (Bougie i Bisailon, 2004). Dodavanje kape (zapravo 7-metilganozina, m⁷G) jedna je od modifikacija pre-mRNA nakon transkripcije. Ribavirin je sintetički derivat ganozina koji je sintetiziran 1972. godine i pokazao se kao najučinkovitije antivirusno sredstvo u eliminaciji virusa krumpira. Provedena istraživanja pokazala su različite rezultate eliminacije virusa iz tkiva krumpira ovisno o tome je li zaražen jednim ili kombinacijom virusa. Povećanje doze ribavirina u mediju pozitivno je utjecalo na eliminaciju svih virusa iz tkiva. Regeneracija i daljnji rast izdanaka pokazali su se dobrim kod primjene ribavirina u hranidbenoj podlozi (Yang i sur. 2013).

2.5.4. Termoterapija u kombinaciji s kemoterapijom

Učinkovita eliminacija virusa iz biljnog tkiva ovisi o vrsti virusa. Sferični virusi imaju djelomičnu otpornost na termoterapiju, a niske doze antivirusnog sredstva pokazale su se učinkovite za oslobađanje biljnog tkiva od virusa. U takvim je situacijama poželjno kombinirati ove metode za najbolje rezultate. Pod kemoterapijom se primjerice podrazumijeva prije spomenuto korištenje ribavirina u mediju na kojem će rasti biljno tkivo. Metoda se provodi tako da se male *in vitro* biljke primjerice podvrgnu termoterapiji u trajanju 2-4 tjedna, a nakon toga se izoliraju vegetacijski vršci (ili meristemi) koji se polože na medij s dodatkom ribavirina. Ova se kombinacija metoda pokazala dosta učinkovitom u eliminaciji Y-virusa krumpira (PVY) (Ali i sur. 2014).

2.5.5. Elektroterapija

Elektroterapija je metoda pri kojoj se koristi električna struja kako bi se tretiralo biljno tkivo i ciljano oštetio nukleoprotein virusa kojim je biljka zaražena (Sastry i Zitter, 2014). Učinkovitost ove metode ovisi o jačini električne struje i trajanju primijenjenog tretmana. Pokazala se učinkovitom u eliminaciji virusa krumpira i povoljnom za daljnju regeneraciju tretiranih izdanaka. Međutim, nije jednako učinkovita za svaki genotip biljke i strukturu virusa. Posebno je učinkovita pri eliminaciji virusa PLRV i PSTVd (Gong i sur., 2019).

2.5.6. Krioterapija

Vrhovi izdanaka zaražene biljke izlažu se tekućem dušiku (-196 °C). Metoda se pokazala iznimno učinkovitom te pokazuje nekoliko prednosti nad termoterapijom i kulturom meristema u vidu većih postotaka preživljavanja tretiranih biljčica i eliminacije određenih virusa (Wang i sur. 2006). Prednost metode je i u tome što se na ovaj način biljno tkivo može očuvati na dugo vremena i sam postupak ne oduzima puno vremena. Međutim, nije se pokazala učinkovitom u eliminaciji virusa iz biljnog tkiva u slučaju zaraze više virusa istovremeno, primjerice ako je krumpir zaražen s M-virusom i S-virusom istovremeno. U tom slučaju predlaže se kombinirati krioterapiju s kemoterapijom za učinkovitiju eliminaciju virusa (Kushnarenko i sur. 2017; Wang i sur. 2008; Yang i sur. 2013).

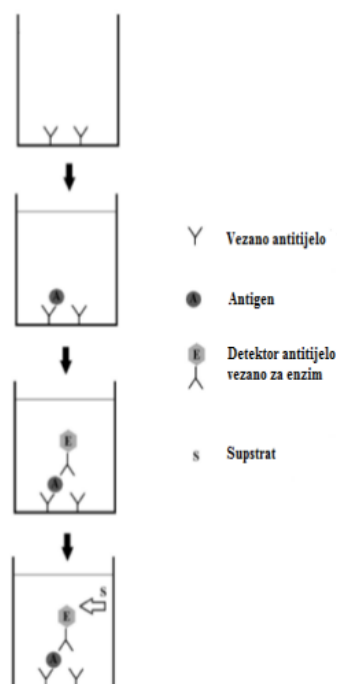
2.6. Metode detekcije virusa

Uspješnost prije navedenih metoda eliminacije virusa potrebno je potvrditi metodama detekcije virusa u biljnom tkivu. Za detekciju virusa krumpira poželjne su precizne, brze i povoljne metode. U biljnoj virologiji postoji više načina za dokazivanje prisutnosti i identifikaciju biljnih virusa. To su biotestovi na test biljkama indikatorima (mehanička inokulacija, indeksiranje), razne mikroskopske tehnike (svjetlosna i elektronska mikroskopija), serološke metode te metode temeljene na analizi nukleinskih kiselina (PCR) (Juretić, 2002).

ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) test temeljen na serološkim svojstvima i PCR (*Polymerase Chain Reaction*) temeljen na nukleinskoj kiselini najčešće se koriste za detekciju virusa u tkivu krumpira (Wang i sur. 2011).

2.6.1. Metoda ELISA

Metoda ELISA je imunoenzimski metoda koja služi za kvalitativno i kvantitativno određivanje antigena. Koriste se protutijela određenog virusa kako bi se detektirale čestice poput proteina, peptida i protutijela (Meng i sur., 2017). Analiza se sastoji od imunološke reakcije (antigeni i antitijela) i kemijske reakcije (promjena boje supstrata uzrokovana reakcijom supstrata i enzima) (Butorac i sur., 2013). Metodu ELISA karakterizira specifična reakcija između antigena i protutijela te se enzimskom reakcijom na kraju testa potvrđuje prisutnost virusa na jasan vizualan način (Halassy, 2007). Ovom je metodom moguće otkriti virusne čestice i u jako malim koncentracijama. Virus iz uzorka (antigen) se ovom tehnikom imobilizira na stijenke jažica plastične mikrotitarske pločice i onda reagira sa specifičnim protutijelima koja nose enzime (Slika 2.6.1.1.). U tu se svrhu koriste polistirenske mikrotitarske pločice četvrtastog oblika koje obično imaju 96 (12 x 8) jažica (Runje i Cvrtila, 2006). Ispiranjem se odnosi višak protutijela s vezanim enzimima. Postoje različite izvedbe testa, a najčešće korišteni oblici su direktna ELISA, indirektna ELISA, DAS-ELISA (dvostruka protutijelna sendvič; Double Antibody Sandwich ELISA), DASI-ELISA (dvostruka protutijelna sendvič indirektna; Double Antibody Sandwich Indirect ELISA) (Butorac i sur., 2013).

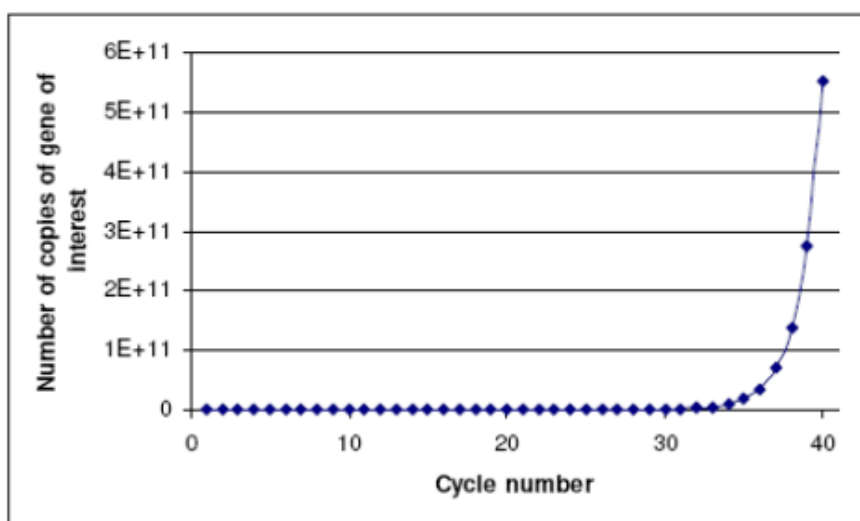


Slika 2.6.1.1. Shematski prikaz metode ELISA

Izvor: Butorac i sur., 2013

2.6.2. Lančana reakcija polimerazom - PCR

Lančana reakcija polimerazom (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) metoda je kojom se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija (Slika 2.6.2.1.). PCR ima veću osjetljivost u usporedbi s metodom ELISA, posebice ako je prag detekcije nizak (Bonwick i Smith, 2004). PCR može koristiti kao predložak genomsku DNA ili komplementarnu DNA (cDNA) dobivenu nakon reverzne transkripcije (RT) virusne RNA (Rubio i sur., 2020). Ciljni dio DNA molekule koju se želi umnožiti određuje se kratkim oligonukleotidnim sekvencama – 'početnicama ili primerima', koji su komplementarni krajevima ulomka DNA od interesa. Ove 'početnice' su pokretači serije reakcija pomoću enzima DNA polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac, pri čemu veličina sintetiziranog dijela DNA molekule odgovara dužini koju omeđuju izabrane 'početnice'. PCR metoda vrlo je brza i osjetljiva, no osnovni problem ove metode jest povremeno dobivanje „pozitivno pogrešnih“ očitovanja (uzorak detektiran kao zaražen, a u stvarnosti nije), što je posljedica izuzetno velike osjetljivosti metode i čestih kontaminacija prilikom uzimanja uzoraka i u laboratoriju (Maletić i sur., 2008). PCR produkt se vizualizira elektroforezom.



Slika 2.6.2.1. Broj kopija DNA molekule u odnosu na broj ciklusa

Izvor: Grahovac, Molekularne metode u patologiji

3. Materijali i metode

3.1. Biljni materijal

Kao početni materijal za postavljanje pokusa korištena je biljka tradicijskog kultivara 'Brinjak'. Tradicijski kultivar krumpira 'Brinjak' čuva se u poljskoj kolekciji na Zavodu za specijalnu proizvodnju bilja u okviru „Nacionalnog programa očuvanja i održive uporabe biljnih genetskih izvora za hranu i poljoprivredu u Republici Hrvatskoj“ kao primka broj IND00068. U prethodnom istraživanju provedenom 2020/2021 (Kereša i sur. 2022) kultivar 'Brinjak' oslobođen je od S-virusa krumpira, ali ne i M-virusa. Jedna od biljaka oslobođena od S-virusa krumpira uzgojena je iz mini gomolja u komori rasta. Gornji dio stabljike mlade biljke korišten je za pripremu nodalnih eksplantata za *in vitro* kulturu.

3.2. Sterilizacija biljnog materijala i uspostava *in vitro* kulture krumpira

Segmenti stabljike bez plojki listova (Slika 3.2.1.) sterilizirani su 1 minutu u 70% etilnom alkoholu, 15 minuta u 4% otopini Izosana G (Pliva) s dodatkom 3-4 kapi okvašivača Tween 20 u 100 ml otopine. Segmenti stabljike su na kraju isprani 3x4 minute u sterilnoj demineraliziranoj vodi. Sterilizacija, kao i daljnji postupci pripreme eksplantata, provedeni su u laminaru s horizontalnim protokom zraka.

Nodalni segmenti izrezani od steriliziranih stabljika položeni su u 14 Erlenmayerovih tikvica na agarni Murashige i Skoog (MS) medij bez regulatora rasta (HF MS) (Slika 3.2.1. desno). Medij je bio slijedećeg sastava:

4,4 g/l praha za MS medij s mineralima i vitaminima (Duchefa)

30 g/l saharoze

8 g/l Plant agara (Duchefa)

pH=5,8

Medij je steriliziran u autoklavu 25 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 1 bara nakon čega je izlivan u sterilne tikvice zatvorene vatom i Al-folijom. Nakon mjesec dana izdanci izrasli *in vitro* rezani su na nodalne eksplantate i po četiri supkultivirani u veliki broj Magenta posudica (45 kom) na HF MS medij radi dobivanja velike količine biljnog materijala za postavljanje pokusa u tretmanima. Kultura je uzgajana na 23 °C i 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ intenzitetu svjetla uz fotoperiod 16/8 (dan/noć).



Slika 3.2.1. Segmenti matične biljke kultivara 'Brinjak' bez plojki oslobođeni od S-virusa (lijevo) i nodalni segmenti iste biljke na agrarnom mediju (desno)

3.3. Tretmani

Za eliminaciju M-virusa krumpira iz biljnog tkiva korištena su tri tretmana (metode):

1. Termoterapija na 37 °C u kombinaciji s izoliranim meristemima
2. Elektroterapija u kombinaciji s izoliranim meristemima
3. Izolirani meristemi (bez prethodnih terapija)

U sva tri tretmana veličina izoliranih meristema nije prelazila 0,3 mm visine, a imali su 1-2 primordijalna listića. Izolirani su iz aksilarnih pupova. Meristemi ove veličine nisu vidljivi prostim okom, a izolirani su pod stereomikroskopom uz pomoć skalpela, pincete i iglice. Izolirani meristemi polagani su na most od dvostrukog filter papira namočenog tekućim MS medijem sljedećeg sastava:

4,4 g/l praha za MS medij s mineralima i vitaminima (Duchefa)

20 g/l saharoze

1 g/l hidrolizata kazeina

0,04 mg/l kinetina

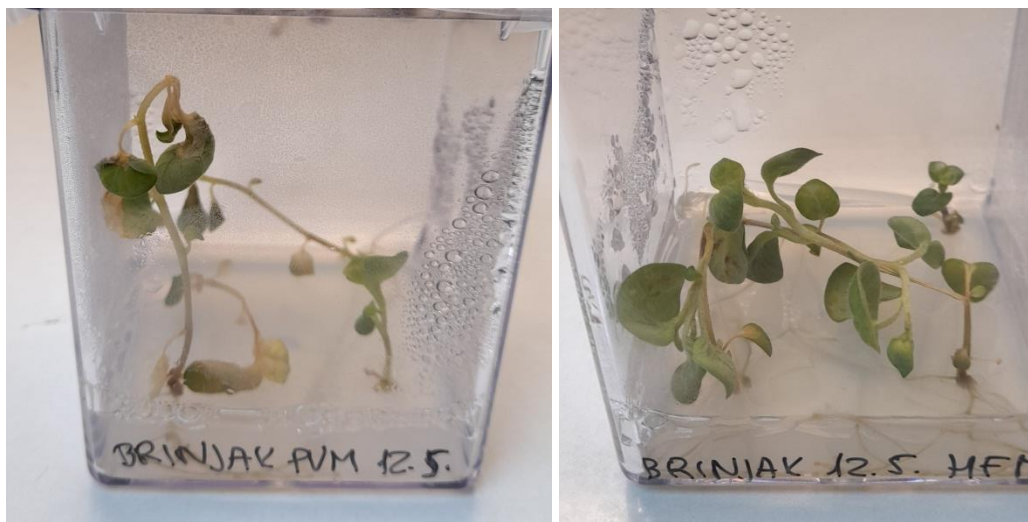
0,5 mg/l GA₃

pH=5,8

Epruvete s mostom od filter papira pripremljene su tako što su trakice filter papira izrezane, oblikovane i umetnute u epruvete. Zatim je u njih lagano po stijenci, uz pomoć odmjerne pipete, uliveno 10 ml gornjeg medija. Epruvete su začepljene celuloznim čepovima i sterilizirane u autoklavu.

3.3.1. Termoterapija na 37 °C u kombinaciji s izoliranim meristemima

Tri tjedna stari *in vitro* izdanci krumpira (ukupno 15 Magenti po 4 izdanka) premješteni su u komoru rasta najprije na temperaturu od 31 °C radi prilagodbe na više temperature, ukupno pet dana, a zatim na temperaturu od 37 °C tijekom dana i noći. Iako je namjera bila držati izdanke na termoterapiji oko mjesec dana, nakon 14 dana izdanci su dosta požutjeli i izgubili turgor (Slika 3.3.1.1.) zbog čega se pristupilo izolaciji meristema iz aksilarnih pupova nakon samo dva tjedna termoterapije.



Slika 3.3.1.1. Izdanci krumpira sorte 'Brinjak' nakon dva tjedna termoterapije

3.3.2. Elektroterapija u kombinaciji s izoliranim meristemima

Za potrebe elektroterapije korištena je mini-elektroforeza (Slika 3.3.2.1.). Kadica za elektroforezu je prije upotrebe sterilizirana u otopini 5% Izosana G te isprana 3 puta u sterilnoj demineraliziranoj vodi.

Kadica je zatim napunjena ohlađenom 1 M otopinom NaCl-a koja je sterilizirana tako što je zavrela i kuhala dvije minute u mikrovalnoj pećnici. Za napuniti kadicu bilo je potrebno oko 300 ml otopine NaCl-a.

Elektroterapiji u trajanju od 5 minuta pri jakosti struje od 15 mA bile su podvrgnute stabljike bez plojki listova dužine 3-5 cm. Stabljike su potom isprane 3 x 3 min u sterilnoj demineraliziranoj vodi nakon čega su, kao i nakon termoterapije, izolirani meristemi iz aksilarnih pupova.



Slika 3.3.2.1. Stabljike bez plojki podvrgnute elektroterapiji u mini-elektroforezi

3.3.3. Izolirani meristemi

Kod ove metode *in vitro* biljčice zaražene M-virusom nisu prošle nikakvu prethodnu terapiju već su meristemi (iste veličine kao i u prethodna dva tretmana) izolirani i polagani u epruvete na most od filter papira.

3.4. Uvjeti uzgoja i supkultivacije

Kod sva tri tretmana meristemi su kultivirani na 23 °C, prva dva dana pri vrlo slabom svjetlu, a onda na jačem intenzitetu od 40 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ uz fotoperiod 16/8 (dan/noć).

Nakon 25 dana meristemi su supkultivirani pri čemu su premješteni s filter papira u nove epruvete na agarni medij (8 g/l Bacto agara), a istog sastava kao što je bio i tekući medij za uspostavljanje kulture meristema.

Meristemi su premješteni tako što je iglica bila uronjena u tekući medij (da se smoči) nakon čega je meristem zalijepljen za iglicu premješten na novi medij.

U sljedećoj supkultivaciji nakon mjesec dana živi vegetacijski vršci (Slika 3.4.1.), koji su tek malo porasli, premješteni su na MSHF medij (kao kod uspostavljanja kulture tkiva) i kultivirani 35 dana.

Kako je rast vegetacijskih vršaka bio vrlo spor, kod sljedeće dvije supkultivacije, napravljen je medij sljedećeg sastava i izlitan u Erlenmeyerove tikvice:

4,4 g/l praha za MS medij s mineralima i vitaminima (Duchefa)

25 g/l saharoze

0.3 mg/l zeatin

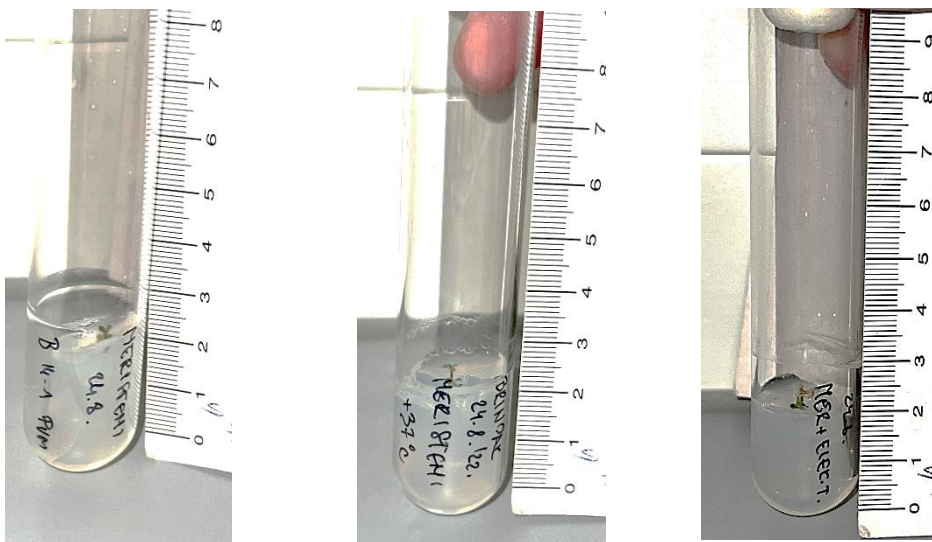
0,05 mg/l IAA

0,05 mg/l GA₃

Plant agar 7 g/l

pH=5,8

Medij sa zeatinom malo je potaknuo rast izdanaka pa je u idućim supkultivacijama korišten MS HF medij s razlikom što je sad korišteno 7 g Plant agara/l medija. Na ovaj medij izdanci su dva puta supkultivirani, s tim da su kod zadnje supkultivacije na MS HF medij po dva nodalna segmenta, od svake potencijalno ozdravljene biljke, položena u dvije Erlenmeyerove tikvice. Kod ove supkultivacije biljkama su dodijeljeni brojevi radi daljnjeg praćenja.



Slika 3.4.1. Meristemi supkultivirani na agarni medij. Bez tretmana samo kultura meristema (lijevo), tretman termoterapije na 37° C (sredina), tretman elektroterapijom (desno)

3.5. Sadnja biljaka u supstrat i aklimatizacija

Nakon izduživanja izdanaka i zakorjenjivanja, ljepša biljka iz jedne tikvice (za svaki mini klon) posađena je u supstrat (Kekkila TSM 2 - Kekkilä Professional, Vantaa, Finland) u male posudice, a druga tikvica s istim brojem biljke sačuvana je za rezervu. Prije sadnje supstrat je bio steriliziran gama zračenjem na Institutu Ruđer Bošković. Nakon 11 dana aklimatizirane biljke presađene su u veće tegle veličine 10 cm × 10 cm × 20 cm u sterilni Kekkila TSM 3 substrat i uzgajane do zrelosti. Aklimatizacija i daljnji uzgoj biljaka odvijao se je pri 20 °C intenzitetu svjetla 300 μmol m⁻² s⁻¹ uz fotoperiod 16/8 (dan/noć).

Mini gomolji vađeni su 4,5 mjeseca nakon presađivanja biljaka u *ex vitro* uvjete.

3.6. Metoda ELISA

3.6.1. Uzimanje uzoraka listova za testiranje metodom ELISA

Po dva uzorka listova za testiranje metodom ELISA uzeti su s biljaka krumpira 32 dana nakon sadnje i uzgoja u *ex vitro* uvjetima komore rasta. Uzorci su zamrznuti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analize.

3.6.2. Postupak testiranja

Kao izvor potencijalno zaraženog biljnog materijala za testiranje metodom ELISA potrebno je bilo odvagati 0,1 g biljnog tkiva (u ovom slučaju peteljku lista). Izvagana biljna masa stavljena je u sterilizirani tarionik, dodan je ekstrakcijski pufer te je sve skupa usitnjeno. Homogenizirano biljno tkivo premješteno je u označenu mikroepruvetu od 2 ml. Postupak je ponovljen s ostatkom uzoraka. Tubice s uzorcima stavljene su u centrifugu kako bi se razdvojila kruta od tekuće faze. Za analizu koristili smo ekstrakcijski pufer, pufer za oblaganje, pufer za konjugaciju, supstratni pufer i pufer za ispiranje (Slika 3.6.2.1.). Prije korištenja puferi su razrijeđeni s destiliranom vodom i podešen im je pH sukladno uputama dobivenima od proizvođača pribora (Bioreba, Švicarska).



Slika 3.6.2.1. Pufri korišteni prilikom testiranja uzoraka metodom ELISA

ELISA protokol provodi se u slijedećim koracima:

1. Mikrotitarske pločice oblažu se s protutijelima
 - a) Specifična protutijela razrijeđena su u puferu za oblaganje u omjeru navedenom od strane proizvođača

- b) U svaku jažicu stavlja se 100 μ l razrijeđenih protutijela
 - c) Pločice se stavljaju na inkubaciju u trajanju od 2 sata na 37 °C (Slika 3.6.2.2.)
 - d) Pločice se ispiru 3 puta s puferom za ispiranje uz čekanje od 3 minute nakon svakog ponovnog punjenja
2. Stavljanje antigena i inkubacija uzoraka
 - a) Nanose se uzorci i inkubiraju preko noći na 4-6 °C
 3. Konjugirana protutijela
 - a) Dozira se po 100 μ l uzorka i kontrola (pozitivnih i negativnih) u svaku jažicu
 - b) Konjugirana protutijela razrjeđuju se u puferu za konjugaciju u omjeru navedenom od strane proizvođača
 - c) U svaku se jažicu stavlja 100 μ l razrijeđenih konjugiranih protutijela
 - d) Pločica se inkubira preko noći na 4 °C
 - e) Pločica se ispiru (drugi dan) 3 puta s puferom za ispiranje uz čekanje od 3 minute nakon svakog punjenja
 4. Dodaje se supstrat
 - a) Supstrat se otapa u supstratnom puferu u omjeru 1 mg/1ml
 - b) U svaku jažicu stavlja se 100 μ l
 5. Inkubira se na sobnoj temperaturi u trajanju od 1-2 sata
 6. Spektrofotometrija – očitavanja najmanje tri puta veća od prosječne vrijednosti negativnih kontrola smatraju se pozitivnima (Slika 3.6.2.2.)



Slika 3.6.2.2. Pločice na inkubaciji na 37 °C (lijevo) i spektrofotometar EL 800 (Biotek, SAD) korišten za očitavanje rezultata (desno)

3.7. Analiza podataka

Podaci o preživljavanju meristema nakon različitih tretmana kao i podaci o eliminaciji virusa iz biljaka krumpira izraženi su u postocima i prikazani grafički.

Razlike između tretmana u uspješnosti preživljavanja meristema kao i eliminaciji virusa testirane su hi-kvadrat testom pri čemu je hi-kvadrat (χ^2) vrijednost izračunata uz pomoć formule:

$$\chi^2 = \sum \frac{(f_o - f_t)^2}{f_t}$$

gdje su χ^2 hi-kvadrat vrijednost, f_o opažene, a f_t očekivane (teoretske) vrijednosti podataka. Hi-kvadrat test proveden je pomoću on-line kalkulatora hi-kvadrat vrijednosti (<https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx>).

4. Rezultati

4.1. Uspostava i preživljavanje meristema u *in vitro* kulturi

Od ukupno 99 izoliranih meristema u sva tri tretmana, nakon 20 dana kultivacije preživjelih je bilo ukupno 53. Preživjelima su smatrani oni meristemi koji su bili zeleni (Slika 4.1.1.) i malo se povećali u odnosu na veličinu neposredno nakon izolacije (kad su bili gotovo nevidljivi prostim okom).

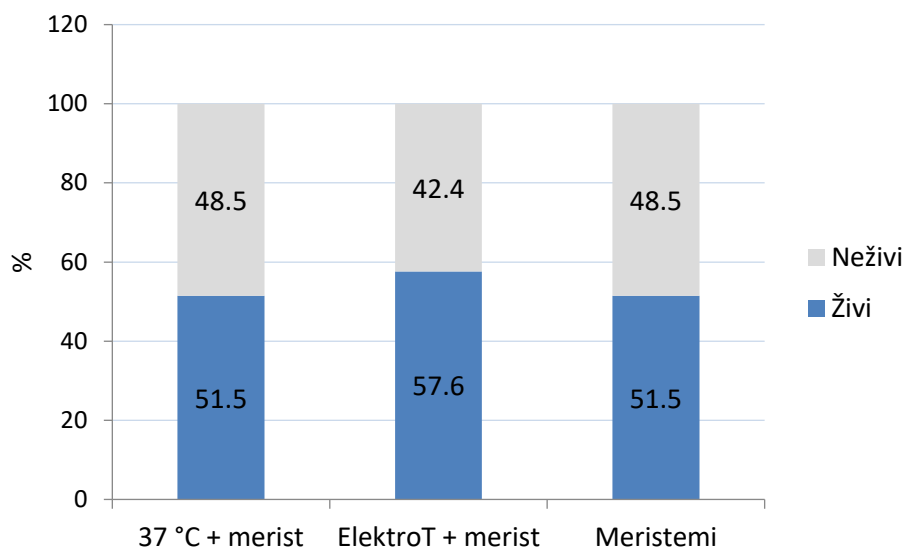


Slika 4.1.1. Meristemi na mostu od filter papira uronjenog u tekući medij 10 dana nakon izolacije

Kako bi se utvrdilo razlikuju li se tretmani u preživljavanju meristema, proveden je hi-kvadrat test pomoću on-line kalkulatora za izračunavanje hi-kvadrat vrijednosti. U tablici 4.1.1. prikazane su opažene (f_o) i očekivane (teoretske) (f_t) vrijednosti živih i neživih meristema 20 dana nakon uspostave kulture meristema. Izračunata vrijednost hi-kvadrata $\chi^2=0,3249$ manja je od granične vrijednosti hi-kvadrata (3,843) za jedan stupanj slobode kod $p<0.05$ što pokazuje da se tretmani ne razlikuju značajno po uspješnosti preživljavanja izoliranih meristema. Uspješnost preživljavanja meristema po tretmanima prikazana je na grafu 4.1.1.

Tablica 4.1.1. Opažene i očekivane (teoretske) vrijednosti živih i neživih meristema iz tri tretmana; crveno označeno su očekivane vrijednosti

Tretman	Živi	Neživi	Ukupno
37 °C + merist	17 (17.67) [0.03]	16 (15.33) [0.03]	33
ElektroT + merist	19 (17.67) [0.10]	14 (15.33) [0.12]	33
Meristemi	17 (17.67) [0.03]	16 (15.33) [0.03]	33
Ukupno	53	46	99



Graf 4.1.1. Uspješnost preživljavanja meristema u *in vitro* kulturi u ovisnosti o tretmanu

Kontaminacija nije bila prisutna niti kod jednog eksplantata. Rast i izduživanje meristema u izdanke u prvim mjesecima je bio vrlo spor. Na slici 4.1.2. prikazani su mali izdanci razvijeni iz meristema pet mjeseci nakon inokulacije. Njihova veličina je i nakon tako dugog vremena manja ili oko 1 cm.



Slika 4.1.2. Mali izdanci na agarom hranidbnom mediju pet mjeseci nakon izolacije meristema

Nakon početnog izduživanja izdanci su ipak brže rasli. Slika 4.1.3. pokazuje male biljčice razvijene iz meristema sedam i pol mjeseci nakon izolacije. Svaka biljčica (od pojedinačnog meristema) razmnožena je u mali klon od barem dvije-tri biljke. Na mediju bez regulatora rasta biljke su razvile i korijenje te su bile prikladne za presađivanje u supstrat (*ex vitro*).



Slika 4.1.3. Izdanci na agarnom hranidbenom mediju sedam i pol mjeseci nakon izolacije meristema

Po jedna biljka od svakog „mini“ klona presađena je najprije u male posudice radi aklimatizacije (Slika 4.1.4.), a 11. dan od prijenosa u *ex vitro* uvjete u veće tegle za uzgoj do zrelosti (Slika 4.1.5.). Aklimatizacija (preživljavanje) posađenih biljaka iznosila je 100%. Nakon 4,5 mjeseca *ex vitro* uzgoja u supstratu u komori rasta, vađeni su gomolji.



Slika 4.1.4. Biljke u *ex vitro* uvjetima četiri dana nakon sadnje



Slika 4.1.5. Biljke u *ex vitro* uvjetima 35. dan nakon sadnje

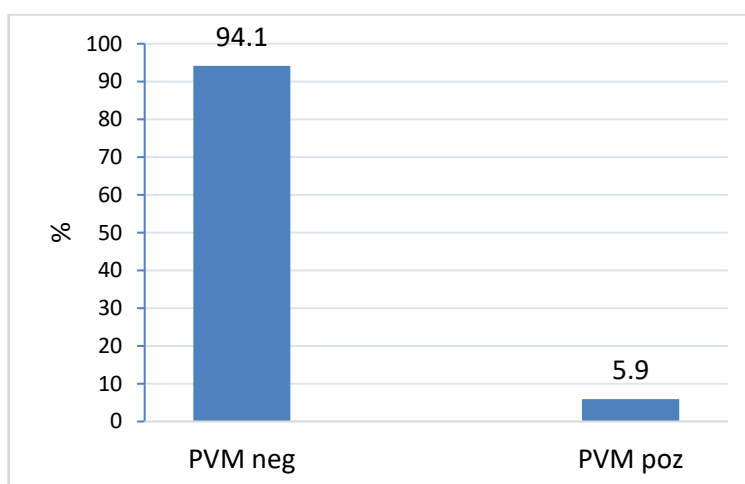
4.2. Utjecaj tretmana na oslobađanje biljaka od M-virusa krumpira

Uspješnost ozdravljenja biljaka krumpira, provedena trima tretmanima, serološki je provjerena metodom ELISA. Vizualna indikacija postotka uspješnosti ozdravljenja krumpira 'Brinjak' od M-virusa krumpira promjenom boje supstrata dodatno je potvrđena spektrofotometrijom kao što je vidljivo na slici 4.2.1.



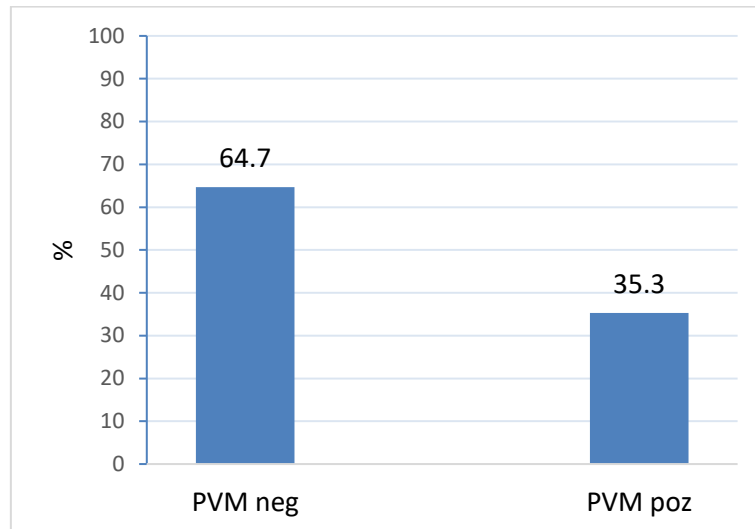
Slika 4.2.1. Punjenje jačica mikrotitarske pločice uzorcima biljnog soka (lijevo) i promjena boje supstrata uzrokovana djelovanjem enzima kao vizualna indikacija prisutnosti virusa u uzorku (desno)

Tretman u kojem su nakon termoterapije na 37 °C izolirani meristemi i iz kojih su dobiveni izdanci bio je uspješan u eliminaciji virusa iz 94,1 % biljaka dobivenih ovim načinom (Graf 4.2.1.). U apsolutnim brojevima, od 17 uzgojenih biljaka iz ovog tretmana, 16 ih je bilo zdravo (Tablica 4.3.1.).



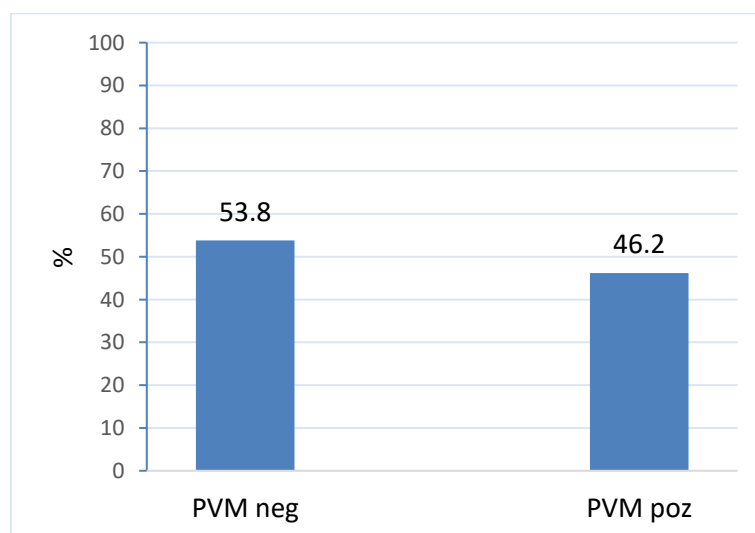
Graf 4.2.1 Uspješnost ozdravljenja biljaka krumpira od M-virusa termoterapijom kombiniranom s izolacijom meristema

Tretman u kojem su nakon elektroterapije izolirani meristemi i iz kojih su dobiveni izdanci bio je uspješan u eliminaciji virusa iz 64,7 % biljaka dobivenih ovim načinom (Graf 4.2.2.). U apsolutnim brojevima, od 17 uzgojenih biljaka iz ovog tretmana, 11 ih je bilo zdravo (Tablica 4.3.1.).



Graf 4.2.2. Uspješnost ozdravljenja biljaka krumpira od M-virusa elektroterapijom kombiniranom s izolacijom meristema

Tretman u kojem su bez prethodnih terapija izolirani meristemi i iz kojih su dobiveni izdanci bio je uspješan u eliminaciji virusa iz 53,8 % biljaka dobivenih ovim načinom (Graf 4.2.2.). U apsolutnim brojevima, od 13 uzgojenih biljaka iz ovog tretmana, 7 ih je bilo zdravo (Tablica 4.3.1.).



Graf 4.2.3. Uspješnost ozdravljenja biljaka krumpira od M-virusa izolacijom meristema

4.3. Usporedba uspješnosti ozdravljenja biljaka od M-virusa hi-kvadrat testom

Kako bi se utvrdilo razlikuju li se tretmani značajno u uspješnosti ozdravljenja biljaka krumpira od M-virusa, proveden je hi-kvadrat test. U tablici 4.3.1. prikazane su opažene (f_o) i očekivane (teoretske) (f_t) vrijednosti ozdravljenih (PVM neg) i zaraženih biljaka (PVM poz). Izračunata vrijednost hi-kvadrata $\chi^2=6,7467$ veća je od granične vrijednosti hi-kvadrata (3,843) za jedan stupanj slobode kod $p<0.05$ što pokazuje da se uspješnost oslobađanja biljaka od M-virusa krumpira po tretmanima značajno razlikuje.

Tablica 4.3.1. Opažene i očekivane (teoretske) vrijednosti ozdravljenih i biljaka zaraženih M-virusom krumpira uspoređujući sva tri tretmana; crveno označeno su očekivane vrijednosti

	PVM neg	PVM poz	Ukupno
37 °C + merist	16 (12.30) [1.11]	1 (4.70) [2.91]	17
ElektroT + merist	11 (12.30) [0.14]	6 (4.70) [0.36]	17
Meristemi	7 (9.40) [0.61]	6 (3.60) [1.61]	13
Ukupno	34	13	47

Kako bismo doznali koji se od tretmana međusobno značajno razlikuju, uspoređena su pojedinačno dva po dva tretmana. U tablici 4.3.2. prikazane su opažene i očekivane vrijednosti ozdravljenih i zaraženih biljaka za tretmane termoterapija kombinirana s kulturom meristema i elektroterapija kombinirana s kulturom meristema. Izračunata vrijednost hi-kvadrata $\chi^2=4.4974$ veća je od granične vrijednosti hi-kvadrata (3,843) za jedan stupanj slobode kod $p<0.05$ što pokazuje da se uspješnost oslobađanja biljaka od M-virusa krumpira za ova dva tretmana značajno razlikuje.

Tablica 4.3.2. Opažene i očekivane (teoretske) vrijednosti ozdravljenih i biljaka zaraženih M-virusom krumpira uspoređujući tretmane termoterapiju kombiniranu s kulturom meristema i elektroterapiju kombiniranu s kulturom meristema ; crveno označeno su očekivane vrijednosti

	PVM neg	PVM poz	Ukupno
37 °C + merist	16 (13.50) [0.46]	1 (3.50) [1.79]	17
ElektroT + merist	11 (13.50) [0.46]	6 (3.50) [1.79]	17
Ukupno	27	7	34

U tablici 4.3.3. prikazane su opažene i očekivane vrijednosti ozdravljenih i zaraženih biljaka za tretmane termoterapija kombinirana s kulturom meristema i kultura meristema. Izračunata vrijednost hi-kvadrata $\chi^2=6.6786$ veća je od granične vrijednosti hi-kvadrata (3,843) za jedan

stupanj slobode kod $p < 0.05$ što pokazuje da se uspješnost oslobađanja biljaka od M-virusa krumpira za ova dva tretmana značajno razlikuje.

Tablica 4.3.3. Opažene i očekivane (teoretske) vrijednosti ozdravljenih i biljaka zaraženih M-virusom krumpira uspoređujući tretmane termoterapiju kombiniranom s kulturom meristema i kulturu meristema; crveno označeno su očekivane vrijednosti

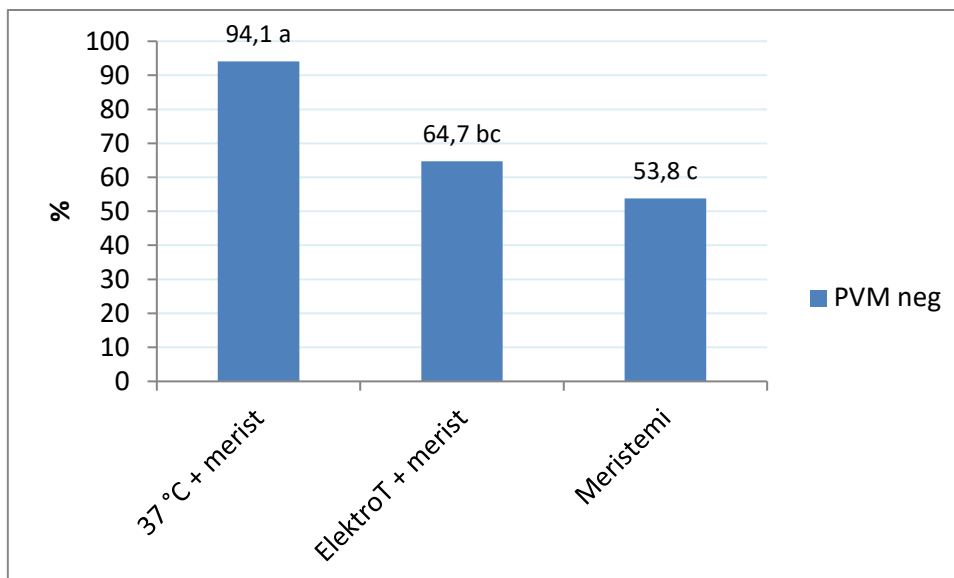
	PVM neg	PVM poz	Ukupno
37 °C + merist	16 (13.03) [0.68]	1 (3.97) [2.22]	17
Meristemi	7 (9.97) [0.88]	6 (3.03) [2.90]	13
Ukupno	23	7	30

Zadnja usporedba (Tablica 4.3.4.) prikazuje opažene i očekivane vrijednosti ozdravljenih i zaraženih biljaka za tretmane elektroterapija kombinirana s kulturom meristema i kultura meristema. Izračunata vrijednost hi-kvadrata $\chi^2 = 0,362$ manja je od granične vrijednosti hi-kvadrata (3,843) za jedan stupanj slobode kod $p < 0.05$ što pokazuje da se uspješnost oslobađanja biljaka od M-virusa krumpira za ova dva tretmana ne razlikuje značajno.

Tablica 4.3.4. Opažene i očekivane (teoretske) vrijednosti ozdravljenih i biljaka zaraženih M-virusom krumpira uspoređujući tretmane elektroterapiju kombiniranu s kulturom meristema i kulturu meristema; crveno označeno su očekivane vrijednosti

	PVM neg	PVM poz	Ukupno
ElektroT+ mesrist	11 (10.20) [0.06]	6 (6.80) [0.09]	17
Meristemi	7 (7.80) [0.08]	6 (5.20) [0.12]	13
Ukupno	18	12	30

Sumirani prikaz razlika u uspješnosti eliminacije M-virusa krumpira prikazan je na grafu 4.3.1. Iz grafa je vidljivo da je najuspješniji tretman u eliminaciji M-virusa krumpira bio tretman termoterapije kombinirane s izolacijom meristema koji je eliminirao M-virus u 94,1% biljaka dobivenih iz ovog tretmana. Ovaj postotak eliminacije virusa značajno se razlikuje od postotaka eliminacije virusa u druga dva tretmana, elektroterapije u kombinaciji s kulturom meristema i same kulture meristema. Između zadnja dva tretmana nema značajne razlike u uspješnosti eliminacije virusa.



Graf 4.3.1. Usporedba uspješnosti ozdravljenja biljaka od M-virusa krumpira različitim tretmanima

U tablici 4.3.1. prikazani su brojevi i mase gomolja po biljci krumpira 'Brinjak' ozdravljenog od M-virusa krumpira svim trima metodama vađeni nakon 4,5 mjeseca *ex vitro* uzgoja. Uzorci B1-B17 prošli su tretman termoterapijom, uzorci B18-B34 prošli su tretman elektroterapijom, a uzorci B35-B47 kulturu meristema bez prethodne terapije. Prosječan broj gomolja ozdravljenih krumpira bio je 9,56, a prosječna masa gomolja ozdravljenih krumpira bila je 144,36 grama.

Tablica 4.3.1. Broj gomolja po biljci i masa gomolja biljaka krumpira 'Brinjak' ozdravljenih od M-virusa krumpir

UZORAK	BROJ GOMOLJA	MASA (g)
B2	8	142
B3	5	121,6
B4	10	126
B9	6	133,2
B10	9	165,6
B11	10	147,2
B13	10	158,4
B16	13	150,8
B17	14	179,6
B18	11	154,8
B21	8	138,4
B24	10	141
B26	10	131,4
B34	10	140,4
B39	8	147,4

5. Diskusija

Prema prethodnom istraživanju (Kereša i sur. 2022) tretman eliminacije S- i M-virusa krumpira iz zaraženog tkiva kultivara 'Brinjak' kemoterapijom s ribavirinom pokazao se neuspješan za eliminaciju M-virusa krumpira, vjerojatno zbog prekratkog vremena primjene kemoterapije. Povećanjem koncentracije ribavirina u podlozi inhibirao se rast malih izdanaka krumpira te je preživjelo samo 25% izdanaka pri koncentraciji 50 mg/L i samo 12,5% izdanaka pri koncentraciji 100 mg/L. Kemoterapija se pokazala uspješnija u eliminaciji S-virusa krumpira. Kako bi se krumpir kultivar 'Brinjak' oslobodio i M-virusa krumpira, jedna od biljaka oslobođena S-virusa krumpira, iz prije spomenutog istraživanja, korištena je za uspostavu *in vitro* kulture u ovom istraživanju, za novi pokušaj ozdravljenja od M-virusa. S tim ciljem postavljen je pokus u tri tretmana: termoterapija na 37 °C u kombinaciji s izoliranim meristemima, elektroterapija u kombinaciji s izoliranim meristemima te izolirani meristemi (bez prethodnih terapija).

Postoji i metoda krioterapije zamrzavanjem vegetacijskih vršaka u tekućem dušiku na -196 °C, međutim istraživanje Kushnarenko i sur. (2017) pokazalo je da se tretmanom krioterapije uspjelo eliminirati M-virus krumpira u samo 38,6% zaraženih uzoraka. Isto je istraživanje pokazalo da se nakon kombiniranog tretmana kemoterapijom u trajanju od 45 dana i krioterapije uzorci krumpira zaraženi s dva virusa (PVM i PVS) nisu oslobodili niti jednog od navedena dva virusa. Zhang i sur. (2019) koristili su kombiniranu metodu kulture meristema s krioterapijom na kultivaru krumpira 'Gammelraude' zaraženim kombinacijom M- i S-virusa te je pokazano da je za M-virus krumpira uspješnost eliminacije virusa bila 0%. Temeljem njihovih rezultata odlučeno je da krioterapija neće biti korištena za pokušaj eliminacije M-virusa iz kultivara krumpira 'Brinjak'.

Kultura meristema provedena u ovom istraživanju pokazala je da je od ukupno 99 izoliranih meristema u sva tri tretmana, nakon 20 dana kultivacije, preživjelo ukupno 53. Preživjelima su smatrani oni meristemi koji su bili zeleni. Veličina meristema uzeta s uzoraka krumpira 'Brinjak' bila je iznimno mala, nevidljiva golim okom i uzeta ispod stereomikroskopa. U istraživanju Moses i sur. (2017) uzimani su uzorci veličine 0,1 mm te je stopa preživljavanja uzetih meristema iznosila 20%. U našem istraživanju stopa preživljavanja uzetih meristema neovisno o prethodnom tretmanu iznosila je 53,5%.

Preživljavanje izoliranih meristema tradicijskog kultivara krumpira Brinjak nije se razlikovalo obzirom na tri metode eliminacije virusa korištene u ovom istraživanju. U sva tri slučaja preživjelo je između 51,5-57,6 % izoliranih meristema.

Unatoč boljem postotku preživjelih meristema, zbog njihovih malih dimenzija, izdanci su sporo rasli. Rast i izduživanje meristema izdanaka u prvim mjesecima je bio vrlo spor. Veličina izdanaka razvijenih iz meristema je i nakon pet mjeseci bila manja ili oko 1 cm.

Stupanj aklimatizacije preživjelih izoliranih meristema prilikom sadnje u supstrat bio je 100%. Razlog 100 % preživljavanja može biti sadnja biljaka u sterilni supstrat. Al-Taleb i sur. (2011) proveli su istraživanje u kojem su kulturom meristema dobili kultivare krumpira 100%

slobodne od Y-virusa krumpira, ali je stupanj aklimatizacije biljaka dobivenih ovom metodom, ovisno o kultivaru iznosio 80 do 90%.

U našem istraživanju termoterapijom na 37 °C kombiniranom s naknadnom izolacijom meristema kultivara krumpira 'Brinjak' M-virus krumpira je uspješno eliminiran u 94,1 % slučajeva. Termoterapija s naknadnom izolacijom meristema se pokazala najuspješnijom od korištenih metoda u ovom istraživanju sa značajnom statističkom razlikom u rezultatima ozdravljenih uzoraka krumpira u odnosu na ostale dvije korištene metode (elektroterapija s kulturom meristema i kultura meristema bez prethodnih tretmana). Istraživanje Bettoni i sur. (2022) pokazalo je da je termoterapija polučila slab uspjeh (10 %) u eliminaciji PVM virusa u kultivaru krumpira 'V500'. Bolji rezultat eliminacije virusa u našem istraživanju ovim načinom vjerojatno je posljedica izolacije puno sitnijih meristema (do 0.3 mm visine) u usporedbi s vegetacijskim vršcima veličine 1 mm koje su nakon termoteapije izolirali Bettoni i sur. (2022). Istraživanje Ali i sur. (2014) pokazalo je da je korištenjem termoterapije na 3 različite temperature (27, 30 i 35 °C) u pokušaju eliminacije Y-virusa krumpira najuspješnija bila metoda termoterapije na 35 °C s rezultatom od 43,79 % uzoraka slobodnih od Y-virusa krumpira.

Elektroterapija u trajanju od 5 minuta pri jakosti struje od 15 mA koja je bila implementirana u ovom istraživanju korištena je i u istraživanju Mahmoud i sur. (2009) u kojem se tom metodom 100% eliminirao Y-virus krumpira iz biljnog tkiva. U slučaju eliminacije M-virusa krumpira u kultivaru 'Brinjak' istom tom metodom oslobodili smo 64,7 % uzoraka. Ovo može indicirati da je elektroterapija uspješnija u procesu eliminacije Y-virusa krumpira u odnosu na M-virus krumpira. Također treba uzeti u obzir da uspješnost eliminacije virusa ovisi i o genotipu.

Sama kultura meristema bez prethodnih tretmana korištena je kao jedna od metoda eliminacije M-virusa krumpira. Meristematske stanice smatraju se slobodnima od virusa: (1) jer se meristematske stanice dijele brže nego se virusi mogu replicirati; (2) virusi se općenito kreću u biljci kroz vaskularni sustav (floem). U meristematskim regijama nema razvijenog floema i virusi se ne mogu kretati i inficirati stanice i (3) jer visoka koncentracija auksina i citokinina te niska pH vrijednost ne pogoduju virusima. U našem je istraživanju sama kultura izoliranih meristema polučila uspjeh od 53,8 % biljaka oslobođenih od M-virusa. Iako je to najniža stopa uspješnosti od tri korištene metode, ipak, zbog izolacije vrlo sitnih meristema i ova metoda se pokazala relativno uspješnom kad se uzme u obzir da Bettoni i sur. (2022) izolacijom vegetacijskih vršaka veličine 1 mm nisu dobili niti jednu biljku oslobođenu od M-virusa krumpira.

Oslobađanjem tradicijskog kultivara krumpira 'Brinjak' od M-virusa (a prije i od S-virusa krumpira) stekli su se uvjeti za umnažanje zdravog sjemenskog materijala u svrhu širenja proizvodnje ovog kultivara. To će biti od velike važnosti jednom kad ovaj kultivar bude uvršten i na listu čuvanih sorti.

6. Zaključak

Provedenim istraživanjem eliminacije M -virusa krumpira iz zaraženog kultivara krumpira 'Brinjak' može se zaključiti:

1. Stopa preživljavanja izoliranih meristema neovisno o prethodnom tretmanu iznosila je 53,5%, a aklimatizacija biljaka nakon sadnje u supstrat 100 %.
2. Najuspješnija metoda eliminacije M-virusa krumpira bila je kombinacija termoterapije i izolacije meristema s uspješnošću od 94,1%.
3. Značajno manji uspjeh u eliminaciji M-virusa krumpira polučile su metode elektoterapija u kombinaciji s izolacijom meristema (64,7%) i kultura izoliranih meristema bez prethodnih tretmana (53,8%). Također ove dvije metode se nisu međusobno značajno razlikovale u uspješnosti eliminacije M-virusa krumpira.

7. Popis literature

1. Agroklub (2011). Krumpir – sorte, <https://www.agroklub.com/sortna-lista/repa-krumpir/krumpir-124/>, pristup 15.9.2023.
2. Ali, M., M. Nasiruddin, M. Haque, and S. Faisal. (2014). Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. SAARC Journal of Agriculture. 11 (1): 71–80
3. Al-Taleb, M.M., Hassawi, D.S., & Abu-Romman, S.M. (2011). Production of Virus Free Potato Plants Using Meristem Culture from Cultivars Grown under Jordanian Environment. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 11 (4): 467-472
4. Animal and Plant Health Agency. (2023). Explanatory guide to the Seed Potato Classification Scheme and Approved Stock Scheme 2023 to 2024
5. Bettoni J.C., Mathew L., Pathirana R., Wiedow C., Hunter D.A., McLachlan A., Khan S., Tang J. and Nadarajan J. (2022). Eradication of Potato Virus S, Potato Virus A, and Potato Virus M From Infected *in vitro*-Grown Potato Shoots Using *in vitro* Therapies. Front. Plant Sci. 13:878733.
6. Bonwick, G.A., Smith, C.J. (2004). Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. Int. J. Food Sci. Tech. 39, 817-827
7. Bougie, I.; Bisailon, M. (2004). The Broad Spectrum Antiviral Nucleoside Ribavirin as a Substrate for a Viral RNA Capping Enzyme. J. Biol. Chem. 279, 22124–22130
8. Butorac A., Marić M., Badanjak Sabolović M., Hruškar M., Rimac Brnčić S., Bačun Družina V. (2013). Analitičke metode u forenzici hrane. Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition. 8, 90-101.
9. Buturac I. (2013). Gospodarska važnost, hranidbena vrijednost, proizvodnja i potrošnja krumpira u svijetu i u nas. Glasilo biljne zaštite vol. 13 No. 4, 265 - 271.
10. Calori A., Factor T., Feltran J., Watanabe E., Moraes C., Purquerio L.F. (2018). Seed potato minituber production in aeroponic system under tropical conditions (fall/winter): electrical conductivity and plant density. Journal of Plant Nutrition. 41.
11. Cassells, A., and R. Long. (1982). The elimination of potato viruses X, Y, S and M in meristem and explant cultures of potato in the presence of virazole. Potato Research 25 (2): 165–173
12. CPGRD HAPIH, (2023). <https://cpgrd.hapih.hr/gb/ind/main/accession/78> (pristup 12.8.2023.)
13. Economic Commission for Europe, (2023). Working Party on Agricultural Quality Standards, Economic and Social Council
14. EUROSTAT, (2021). The EU potato sector - statistics on production, prices and trade. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=The_EU_potato_sector_-_statistics_on_production,_prices_and_trade, pristup 13.9.2023.

15. Frost KE, Groves RL, Charkowski AO (2013). Integrated control of potato pathogens through seed potato certification and provision of clean seed potatoes. *Plant Dis* 97:1268–1280
16. Gong H., Igiraneza C., Dusengemungu L. (2019). Major In Vitro Techniques for Potato Virus Elimination and Post Eradication Detection Methods. A Review. *American Journal of Potato Research* 96:379–389
17. Gugić J., Zrakić M., Tomić M., Šuste M., Grgić I., Franjkić D. (2014.) Stanje i tendencije proizvodnje i potrošnje krumpira u Republici Hrvatskoj. *Zbornik radova*, 49, 135-139.
18. Halassy B. (2007). Odabrane metode u imunologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb, 676-686
19. HAPIH (2023). Centar za sjemenarstvo i rasadničarstvo. <https://www.hapih.hr/csr/> (pristup 11.8.2023.)
20. HAPIH, (2022)., Regulirani nekarantenski štetni organizmi na sjemenskom krumpiru, drugo izdanje.
21. http://14.139.61.83/Ebook_SeedProductionTechniques/Thermotherapy.htm, pristup 13.9.2023.
22. Juretić, N. (2002). *Osnove biljne virologije*. Školska knjiga.
23. Kereša S., Vončina D., Lazarević B., Bošnjak Mihovilović A., Pospišil M., Brčić M., Matković Stanković A., Habuš Jerčić I. (2022). Partial Elimination of Viruses from Traditional Potato Cultivar 'Brinjak' by Chemotherapy and Its Impact on Physiology and Yield Components. *Horticulturae* 8, 1013.
24. Kolychikhina, M.S.; Beloshapkina, O.O.; Phiri, C. (2021). Change in potato productivity under the impact of viral diseases. *Earth Environ. Sci.*, 663, 012035
25. Korunek, I. i Pajić, S. (2007). Agrotehnika proizvodnje merkatilnog krumpira. *Glasnik Zaštite Bilja*, 30 (3), 4-11
26. Kushnarenko, S., N. Romadanova, and M. Aralbayeva. (2017). Combined ribavirin treatment and cryotherapy for efficient Potato virus M and Potato virus S eradication in potato (*Solanum tuberosum* L.) in vitro shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. *Plant* 53: 425–432.
27. Mahmoud, S.Y., Hosseney, M.H., & Abdel-Ghaffar, M.H. (2009). Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. *International Journal of Virology*, 5, 64-76.
28. Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. (2008). *Vinova loza : ampelgrafija, ekologija, oplemenjivanje*. Zagreb, Školska knjiga
29. Matjačić, M. (2009). Proizvodnja sjemenskog krumpira u Republici Hrvatskoj. *Hrvatsko oplemenjivanje bilja, sjemenarstvo i rasadničarstvo i europske integracije – zbornik*. 42-43.
30. Medved I., (2022). Kategorije sjemenskog krumpira, *Agroportal.hr*, <https://www.agroportal.hr/povrtlarstvo/43906> , pristup 13.9.2023.
31. Meng B., Martelli P. G., Golino D., Fusch M., (2017). Grapevine viruses: Molecular biology, Diagnostics and Management. *Springer*, 978: 409 – 431

32. Moses, W., K. Rogers, and O. Mildred. (2017). Effect of thermotherapy duration, virus type and cultivar interactions on elimination of potato viruses X and S in infected seed stocks. *African Journal of Plant Science* 11 (3): 61–70.
33. Naik PS, Buckseth T (2018). Recent advances in virus elimination and tissue culture for quality potato seed production, *Biotechnologies of crop improvement*, vol 1. Springer, New York, pp 131–158
34. Online hi-kvadrat kalkulator, Social science statistics <https://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/default2.aspx> (pristup 20.7.2023.)
35. Panattoni, A., A. Luvisi, and E. Triolo. (2013). Review. Elimination of viruses in plants: Twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11 (1): 173–188.
36. Pospíšil M. (2020). Može li opstati domaća proizvodnja krumpira? *Gospodarski list* 3: 20 – 22
37. Pravilnik o stavljanju na tržište sjemenskog krumpira (2007). *Narodne novine*. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/full/2007_12_129_3698.html (pristup 11.8.2023.)
38. Quak, F. (1987). Therapy of individual plants. In: *Viruses of Potatoes and Seed-Potato Production* (De Bokx, J.A. and van der Want, J.P.H., eds), pp. 151–161. Wageningen: Pudoc.
39. Raggi, L., Pacicco, L.C., Caproni, L., Álvarez-Muñiz, C., Annamaa, K., Barata, A.M., Batir-Rusu, D., Díez, M.J., Heinonen, M., Holubec, V., et al. (2022). Analysis of landrace cultivation in Europe: A means to support in situ conservation of crop diversity. *Biol. Conserv.* 267, 109460
40. Rubio L., Galipienso L., and Ferriol I. (2020). Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Front. Plant Sci.* 11:1092.
41. Runje, M, Cvrtila, T. (2006). ELISA u analitici hrane. *Meso.* 7, 92-94
42. Sastry, K., and T. Zitter. (2014). Management of Virus and Viroid Diseases of crops in the tropics. *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics*: 149–480
43. Statistički ljetopis Republike Hrvatske, Državni zavod za statistiku (2022). <https://podaci.dzs.hr/2022/hr/29384>, pristup 13.9.2023.
44. Tatarowska B., Plich J., Milczarek D., Flis B. (2020). Temperature-dependent resistance to potato virus M in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology*. 2020;69:1445–1452.
45. Uredba o stavljanju u promet sjemenskog krumpira, (2015). PIS (Pravno informacijski sustav), Službeni list Republike Slovenije, br. 98/15 i 101/20, <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV12336#> , pristup 13.9.2023.
46. Vončina, D. (2013). Virusne bolesti krumpira. *Glasiilo biljne zaštite*, 13 (4), 313-318
47. Wang, B., Y. Ma, Z. Zhang, Z. Wu, Y. Wu, Q. Wang, and M. Li. (2011). Potato viruses in China. *Crop Protection* 30 (9): 1117–1123.
48. Wang, Q., W. Cuellar, M. Rajamäki, Y. Hirata, and J. Valkonen. (2008). Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: Relation of virus

- distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Molecular Plant Pathology* 9 (2): 237–250
49. Wang, Q., Y. Liu, Y. Xie, and M. You. (2006). Cryotherapy of potato shoot tips for efficient elimination of potato leafroll virus (PLRV) and potato virus Y (PVY). *Potato Research* 49 (2): 119–129.
 50. Xu H., D'Aubin J., Nie J. (2010). Genomic variability in potato virus M and the development of RT-PCR and RFLP procedures for the detection of this virus in seed potatoes. *Virology* 1;7:25
 51. Yang, L., B. Nie, J. Liu, and B. Song. (2013). A reexamination of the effectiveness of ribavirin on eradication of viruses in potato plantlets in vitro using ELISA and Quantitative RT-PCR. *American Journal of Potato Research* 91: 304–311.
 52. Zhang Z., Wang Q-C., Spetz C., Blystad D-R. (2019). *In vitro* therapies for virus elimination of potato-valuable germplasm in Norway. *Scientia Horticulturae*. 249: 7-14

Životopis

Valentina Rohrbacher rođena je 15. lipnja 1995. godine u Zagrebu. Pohađala je IV. jezičnu gimnaziju. Bila je upisana u dvojezični razred koji sluša nastavu na engleskom i hrvatskom jeziku. Kroz srednjoškolsko obrazovanje učila je i njemački jezik. Agronomski fakultet u Zagrebu upisala je 2018. godine te je na preddiplomskom studiju bila upisana na smjer Agroekologija koji je završila 2021. godine obranom završnog rada naslovljenog 'Uzroci pada populacije bumbara u agroekosustavu'. Tijekom preddiplomskog studija bila je dobitnica STEM stipendije za akademsku godinu 2018./2019. Diplomski smjer Biljne znanosti upisala je 2021. godine. Tijekom studija na diplomskom smjeru Biljne znanosti ostvarila je Stipendiju Grada Zagreba za izvrsnost za akademsku godinu 2020./2021. Praksu na diplomskom studiju obavila je na Zavodu za oplemenjivanje bilja, genetiku i biometriku. Tijekom cijelog studija sticala je radno iskustvo na mnogobrojnim studentskim poslovima te je bila članica izvannastavnih aktivnosti u sklopu 'Vrtlarske grupe' i 'Ozelenjivanja zajedničkih interijera Fakulteta'. Kroz posljednje 3 godine studija bila je student tutor u svrhu pomoći studentima bruošima.