

Prijenos H-virusa vinove loze pomoću lozine štitaste uši (Planococcus ficus sign.)

Marijanović, Anda

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:204:136388>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



PRIJENOS H-VIRUSA VINOVE LOZE POMOĆU LOZINE ŠTITASTE UŠI (*PLANOCOCCUS FICUS* SIGN.)

DIPLOMSKI RAD

Anda Marijanović

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



Diplomski studij:

Fitomedicina

PRIJENOS H-VIRUSA VINOVE LOZE POMOĆU LOZINE ŠTITASTE UŠI (*PLANOCOCCUS FICUS* SIGN.)

DIPLOMSKI RAD

Anda Marijanović

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, rujan, 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZJAVA STUDENTA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Anda Marijanović**, JMBAG 0178126799, rođena 21.03.1999. u Mostaru, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

PRIJENOS H-VIRUSA VINOVE LOZE POMOĆU LOZINE ŠTITASTE UŠI (*PLANOCOCCUS FICUS SIGN.*)

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice



Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture



IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ande Marijanović** JMBAG 0178126799, naslova

PRIJENOS H-VIRUSA VINOVE LOZE POMOĆU LOZINE ŠTITASTE UŠI (*PLANOCOCCUS FICUS SIGN.*)

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

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

2. doc. dr. sc. Domagoj Stupić član

3. prof. dr. sc. Tanja Gotlin Čuljak član

Zahvala

Ovom prilikom želim se zahvaliti svom mentoru izv. prof. dr. sc. Darku Vončini koji mi je pružio veliku čast omogućivši izradu ovog rada pod svojim vodstvom, te na iskazanom povjerenju, pruženoj pomoći, uloženom trudu, vremenu i znanju tijekom izrade rada.

Također se zahvaljujem Martinu Jaguniću mag. ing. agr. koji je uvijek bio dostupan kako za eksperimentalni dio, tako i za pružanje svih informacija i pomoći oko izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svim profesorima Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su svojim znanjem nadopunjavali moje, kako bi ovaj lijepi period školovanja privela kraju.

Na samom kraju želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na velikoj podršci tijekom cijelog akademskog života, što su uvijek bili moj najveći oslonac i vjerovali u mene, pa čak i onda kada ja nisam.

Veliko hvala svima!

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj istraživanja	1
2. Pregled literature	2
2.1. Vinova loza (<i>Vitis vinifera</i> L.)	2
2.1.1. Virusi vinove loze	2
2.2. Rod <i>Vitivirus</i>	3
2.2.1. Morfologija, organizacija i replikacija genoma.....	3
2.2.2. Prijenos i štetnost.....	4
2.2.3. A-virus vinove loze (GVA) i B-virus vinove loze (GVB)	5
2.2.4. H-virus vinove loze (GVH)	6
2.3. Štitaste uši	8
2.3.1. Lozina štitasta uš (<i>Planococcus ficus</i> Sign.)	8
3. Materijali i metode.....	10
3.1. Materijali.....	10
3.1.1. Izvor virusa.....	10
3.1.2. Korištene test biljke/korovi	11
3.1.3. Lozina štitasta uš (<i>Planococcus ficus</i> Sign.)	12
3.2. Metode	13
3.2.1. Sjetva test biljaka/korova	13
3.2.2. Ishrana lozine štitaste uši (<i>Planococcus ficus</i> Sign.) na zaraženim mladicama vinove loze - akvizicija.....	14
3.2.3. Prijenos štitastih uši na test biljke/korove	15
3.2.4. Testiranje biljaka na prisutnost virusa	17
3.2.4.1. RT-PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR).....	17
3.2.4.2. Konvencionalni RT-PCR.....	19
4. Rezultati istraživanja.....	21
5. Rasprava	24
6. Zaključak.....	26
7. Popis literature	27
Životopis.....	31

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ande Marijanović**, naslova

PRIJENOS H-VIRUSA VINOVE LOZE POMOĆU LOZINE ŠTITASTE UŠI (*PLANOCOCCUS FICUS* SIGN.)

Veliki broj virusa može zaraziti jednu od najuzgajanijih kultura u svijetu, a to je vinova loza (*Vitis vinifera* L.). Među njima je i novootkriveni H-virus vinove loze (grapevine virus H, GVH) koji pripada rodu *Vitivirus*. Prijenos pojedinih virusa vinove loze, uz zaraženi sadni materijal, moguć je i pomoću štitastih ušiju. U laboratorijskim uvjetima, pokusi prijenosa GVH pomoću lozine štitaste uši (*Planococcus ficus* Sign.) na sadnice vinove loze sorte Žlahtina bili su uspješni, što je i dokazano njihovim testiranjem metodom lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR) u stvarnom vremenu (*real-time*). Od 19 biljaka vinove loze, kod dvije je potvrđena zaraza. Isto je potvrđeno i pomoću konvencionalnog RT-PCR-a, a njegovi produkti su vizualizirani provedbom horizontalne gel elektroforeze. Ostatak test biljaka/korova uključenih u istraživanje (korovi *Paper rhoeas*, *Abuthilon theophrasti*, *Amarathus retroflexus*, *Amrosia artemisifolia*, dvije zeljaste test biljke *Nicotiana benthamiana* i *Chenopodium murale*) pokazale su se negativnim u provedenim molekularnim testovima.

Ključne riječi: vinova loza, korovi, zeljaste test biljke, prijenos, štitaste uši, H-virus vinove loze, RT-PCR

Summary

Of the master's thesis – student **Anda Marijanović**, entitled

TRANSMISSION OF GRAPEVINE VIRUS H BY THE VINE MEALYBUG (PLANOCOCCUS FICUS SIGN.)

Many different viruses have been reported to infect one of the most commonly grow plants, grapevine (*Vitis vinifera* L.). One of these is the recently discovered grapevine virus H (GVH), which belongs to the genus *Vitivirus*. Transmission of some grapevine viruses occurs through mealybugs, in addition to the use of contaminated planting material. Under experimental conditions, we obtained successful transmission of GVH by vine mealybug (*Planococcus ficus* Sign.) to seedlings of grapevine cv. Žlahtina, which was confirmed by real-time RT-PCR. Two out of 19 vine seedlings tested positive. The same was confirmed by conventional one-step reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and the products were visualized by horizontal gel electrophoresis. Other plants used in the study (weed species *Paper rhoeas*, *Abuthilon theophrasti*, *Amarathus retroflexus*, *Amrosia artemisifolia*; and two herbaceous test plants *Nicotiana benthamiana* and *Chenopodium murale*) tested negative using the real-time RT-PCR.

Keywords: grapevine, weeds, herbaceous test plants, transmission, mealybugs, grapevine virus H, RT-PCR

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najraširenijih voćnih kultura u svijetu. Prema podacima Međunarodne organizacije za vinovu lozu i vino (OIV), u 2020. godini je pod vinovom lozom bilo 7,3 milijuna hektara svjetskih poljoprivrednih površina. Ova kultura podložna je napadu raznih štetočina i patogena među kojima i infektivnih intracelularnih uzročnika (virusi, viroidi, prokarioti ograničeni floemom i ksilemom), prilikom čega mogu nastati i veliki gubitci, skraćujući produktivni vijek vinograda i ugrožavajući sam opstanak zahvaćene loze (Martelli 2014a). Do danas je poznato da vinovu lozu može zaraziti preko 80 virusa, no na sreću mali broj se smatra ekonomski značajnim virusima. Jednom zaražena biljka vinove loze ostaje zaražena tijekom cijelog svojeg života. Za razliku od gljivičnih bolesti koje se uspješno kontoliraju pomoću fungicida, za biljne viruse još uvijek nemamo adekvatno rješenje. Stoga se kontrola virusa bazira na korištenju zdravog sadnog materijala za podizanje novih vinograda, te suzbijanju njihovih vektora (Vončina 2021.).

Najčešćim prijenosnicima tj. vektorima virusa smatraju se lisne uši (por. *Aphididae*), no kod vinove loze puno značajnije su štitaste uši (por. *Coccidae* i *Pseudococcidae*) te nematode (por. *Longidoridae*) (Fuchs 2020.). Od velike važnosti za sve viruse koje inficiraju vinovu lozu jeste upravo i potreba njihovog istraživanja u smislu prijenosa vektorima, kako bi se lakše moglo pristupiti zaštiti novopodignutih i nezaraženih vinograda.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja je utvrditi da li se H-virus vinove loze (grapevine virus H, GVH) može prenositi lozinom štitastom uši (*Planococcus ficus* Sign.) sa zaražene na bezvirusne loze te potencijalne druge domaćine (korove i zeljaste test biljke).

Sukladno cilju ovo istraživanje ima dvije hipoteze:

1. Lozina štitasta uš (*Planococcus ficus* Sign.) vektor je H-virusa vinove loze
2. H-virus vinove loze može se prenijeti lozinom štitastom uši sa zaražene loze na bezvirusne biljke vinove loze, te alternativne domaćine (korove i zeljaste test biljke).

2. Pregled literature

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

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) pripada porodici *Vitaceae* i rodu *Vitis*. Listopadna, drvenasta i grmolika penjačica s viticama (Hulina, 2011.). Jedna je od najčešće uzgajanih drvenastih poljoprivrednih kultura u svijetu.

Organi vinove loze dijele se na vegetativne i generativne. U skupinu vegetativnih organa pripadaju pupovi, mladice, lišće, korijen, a u skupinu generativnih organa pripada cvijet, cvat, bobica, grozd, vitica, sjemenka. Vegetativni organi služe za proizvodnju asimilata, usvajanje vode i potrebnog hranjiva. Generativni organi služe za razmnožavanje biljaka putem sjemena (Mirošević, 1996.). Uz generativno razmnožavanje vinove loze, razmnožavanje se vrši i vegetativnim putem. Vrste vegetativnog razmnožavanja: cijepljenjem, reznicama, grebenicama, *in vitro*. Kroz povijest načini vegetativnog razmnožavanja su se mjenjali zbog pojave filoksere (trsnе uši) koja je opustošila sve vinograde. Nakon toga, najzastupljeniji način vegetativnog razmnožavanja postaje cijepljenje (Gašpar i sur. 2011.). Cijepljenjem vinove loze (plemke) na američke podloge otporne na filokseru. Uglavnom su se precjepljivali slabo rodni trsovi radi promjene sorte ili razmnožavanje rijetke sorte (Mirošević 2007.). Na uspješan uzgoj vinove loze najveći utjecaj imaju vremenske prilike. Za vinovu lozu kao višegodišnju kulturu treba odabrati lokaciju s povoljnim okolišnim uvjetima, među kojima najveći značaj imaju pogodno tlo i klima.

Najzastupljeniji štetnici vinove loze su: crveni voćni pauk (*Panonychus ulmi*), grozdovi moljci (*Lobesia botrana* i *Eupoecilia ambiguella*), pipe (*Curculionidae*), američki cvrčak (*Scaphoideus titanus*) te bolesti koje se pojavljuju u vinogradu: crna pjegavost rozgve (*Phomopsis viticola*), plamenjača (*Plasmopara viticola*), pepelnica vinove loze (*Erysiphe necator*), siva plijesan (*Botrytis cinerea*) (Cvjetković, 2010.).

U Republici Hrvatskoj, prema Državnom zavodu za statistiku, u 2021. godini ukupna površina pod vinovom lozom iznosi 21 213 ha (DZS, 2022.).

2.1.1. Virusi vinove loze

Vinova loza je osjetljiva na širok raspon viroza i virusima sličnih patogena. Opseg i razina negativnih učinaka virusa ovise o tipu prisutnih virusa, kombinacijama prisutnih virusa, osjetljivosti kultivara, starosti i kondiciji zaraženog trsa (Cabaleiro i sur., 1999; Alabi i sur., 2016.). Virusne bolesti mogu ozbiljno naštetiti produktivnosti vinograda, kvaliteti grožđa i proizvoda od vina (Porotikova i sur. 2021.). U 2018. godini područje koje zauzimaju nasadi grožđa diljem svijeta obuhvaćalo je oko 7,4 milijuna hektara (prema OIV-2019).

Poznato je da virusi i drugi patogeni mikroorganizmi, kao što su viroidi, fitoplazme i bakterije ograničene floemom i ksilemom, uzrokuju razne infekcije unutar biljnog staničja. Infekcija virusa započinje unutar biljne stanice gdje dolazi do oslobađanja proteinskog omotača (kapside) te ispuštanja virusnog genoma, odnosno RNA ili DNA (Modrow, 2013.).

Virusi su jedinstveni među biljnim patogenima zbog toga što se nakon inicijativne infekcije počinju sistemično širiti po cijeloj biljci, te se vrlo jednostavno mogu prenijeti sa zaraženih na zdrave jedinke.

Do danas je iz vinove loze izolirano oko 86 vrsta virusa, svrstanih u porodice: *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Bromoviridae*, *Bunyaviridae*, *Caulimoviridae*, *Closteroviridae*, *Endornaviridae*, *Geminiviridae*, *Luteoviridae*, *Partitiviridae*, *Phenuivirida*, *Potyviridae*, *Reoviridae*, *Secoviridae*, *Tombusviridae*, *Tymoviridae*, *Virgaviridae* koji se prenose različitim vektorima kao što su: štitaraste uši, lisne uši, nematode, grinje.

Preventivne metode suzbijanja virusa imaju glavnu ulogu u sprječavanju širenja viroza korištenjem zdravog, bezvirusnog sadnog materijala te suzbijanje vektora.

2.2. Rod *Vitivirus*

Rod *Vitivirus* pripada porodici *Betaflexiviridae* (potporodica *Trivirinae*), stvoren je 1997., koja je svrstana u red *Tymovirales*, a nazvan je prema rodu *Vitis*, domaćinu svog glavnog predstavnika - A-virusa vinove loze (grapevine virus A, GVA) (Blouin i sur. 2018.). Porodica *Betaflexiviridae* danas uključuje rodove *Foveavirus*, *Trichovirus* i *Vitivirus*.

Nakon što je u Italiji 1980. prvi puta zabilježen GVA te 1993. B-virus vinove loze (grapevine virus B, GVB), u sljedećih nekoliko godina pronađen je veći broj današnjih predstavnika roda *Vitivirus*, a 2018. godine su zabilježena čak četiri nova virusa iz ovog roda: G-virus vinove loze (grapevine virus G, GVG), H-virus vinove loze (grapevine virus H, GVH), I-virus vinove loze (grapevine virus I, GVI), J- virus vinove loze (grapevine virus J, GVJ)(Maree i sur. 2020; Nikolić 2021).

Rod *Vitivirus* službeno sadrži 9 vrsta, odnosno virusa koji inficiraju vinovu lozu, a to su GVA, GVB, GVD, E-virus vinove loze (grapevine virus E, GVE), F-virus vinove loze (grapevine virus F, GVF), GVA, GVH, GVI, GVJ (ICTV, 2020; MSL #36).

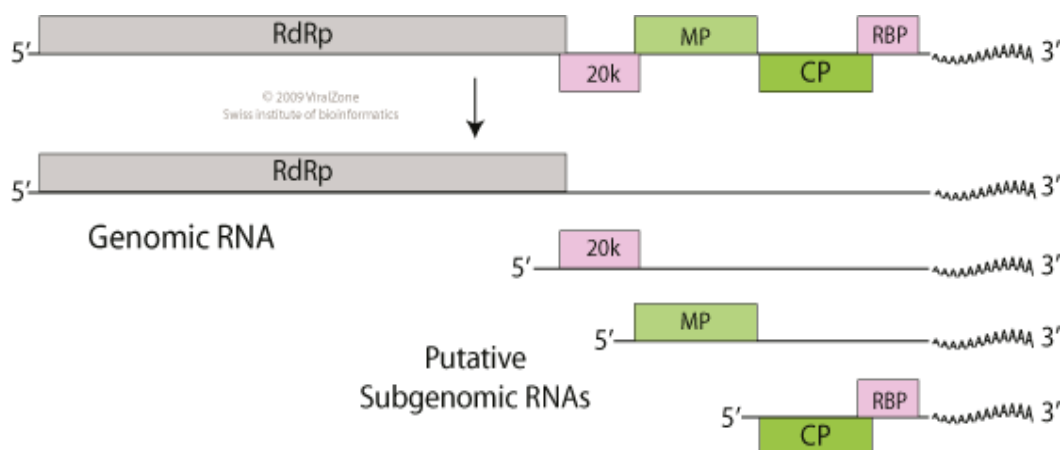
Simptomi koji se javljaju na vinovoj lozi su uglavnom na drvetu. Javljaju se udubljenja na drvetu, plutasta kora. Ovakvi simptomi se javljaju kod GVA, GVB, GVD, GVE te GVF. Zaražene loze oslabe te vrlo često odumiru nekoliko godina nakon infekcije (Porotikova i sur. 2021.).

2.2.1. Morfologija, organizacija i replikacija genoma

Virusi koji pripadaju rodu *Vitivirus* imaju dimenzije od 725-785 x 12 nm, a čestice pokazuju filamentoznu oblik, te su spiralno građene s nagibom od 3,3-3,5 nm i po 10

podjedinica po okretu spirale. Od ukupne težine, 5% čestice virusa čini pozitivno orijentirana molekula RNA koja je jednolančana (ssRNA), a ujedno je i genom virusa. Relativna molekulska masa virusne čestice iznosi $2.6-3,05 \times 10^6$. Linearni ssRNA(+) genom je veličine 7,6 kb, kodira za pet proteina (ima pet otvorenih okvira čitanja – eng. *open reading frame*, ORF) te je 5' kraj zatvoren, a 3' je poliadeniliran (du Preez i sur. 2011.).

RNA polimeraza (RdRp) se proizvodi izravno iz genomske RNA. Drugi ORF se prepisuju kao subgenomske mRNA. Tijek replikacije je sljedeći: virus najprije prodire u stanicu domaćina, zatim genomska RNA se razmata i oslobađa u citoplazmi. Virusna RNA se prevodi kao monocistronska mRNA za proizvodnju RdRp (kodiranog 5' proksimalnim ORF). Iz genomske ssRNA(+) se sintetizira genom dsRNA koji se transkribira/replicira, čime se dobivaju virusne mRNA/nove ssRNA(+) genomi. Unutarnji subgenetski promotori se koriste za transkripciju sgRNA koja daje pokret proteinima. Shematski prikaz organizacije genoma te prepisivanja prikazan je na slici 2.2.1.1. (ViralZone, 2022).



Slika 2.2.1.1. Organizacija genoma vitivirusa. Oznake: RdRp – enzim replikaza (replicase); 20k – nekodirajuća regija veličine 20000 parova baza; MP – protein za kretnju (movement protein); CP – protein omotača (coat protein)

Izvor: https://viralzone.expasy.org/resources/Vitivirus_genome.png - pristupljeno 19.06.2022.

2.2.2. Prijenos i štetnost

Porodici *Flexiviridae* pripadaju rodovi *Trichovirus* i *Vitivirus* koji se uglavnom prenose semiperzistentno svojim vektorima, a to su štitaste uši (Koch i sur. 2020). Po svojim karakteristikama semiperzistentni način prijenosa nalazi se između perzistentnog i neperzistentnog. U odnosu na neperzistentni prijenos, kod semiperzistentnog potreban je duži

vremenski period za usvajanje virusa, a tako i za sami prijenos. Vektor tijekom hranjenja može usvojiti virus za 30 minuta, no prijenos je uspješniji ako ishrana vektora na inficiranoj biljci traje nekoliko sati. Nakon što usvoji virus, vektor zadržava sposobnost prijenosa tri do četiri dana. Semiperzistentni virusi, kao što su već spomenuti vitivirusi dolaze u floemu. Dokazan je prijenos GVB pomoću lozine štitaste uši *Planococcus ficus* (Martelli i sur. 2007). Osim prijenosa pomoću vektora, poznato je da se vitivirusi prenose i mehaničkim putem, te najvažnijim i najčešćim načinom širenja virusa na druga područja, a to je putem zaraženog sadnog materijala (Martelli i Boudon-Padieu 2006). Kod vegetativnog razmnožavanja domaćina, širenje virusa na velike udaljenosti odvija se prvenstveno kroz distribuciju zaraženog sadnog materijala.

2.2.3. A-virus vinove loze (GVA) i B-virus vinove loze (GVB)

A-virus vinove loze (GVA) je jedan od članova roda *Vitivirus* koji je uzročnik kompleksa naboranosti drveta. (Meng i sur. 2017.). Virusne čestice su savitljive niti, dugačke oko 800 nm (Slika 2.2.3.1.). Nukleinska kiselina je jednolančana, +RNA molekula (Martelli i sur. 2006.). GVA se može prenijeti vegetativno, a također i štitastim ušima. Vektori koji prenose GVA su zvjezdasta štitasta uš (*Pseudococcus longispinus*), lozina štitasta uš (*Planococcus ficus*), limunov crvac (*Planococcus citri*), šljivina štitasta uš (*Partenolecanium corni*), Češka štitasta uš (*Heliococcus bohemicus*) i dr. (Roscgilione i sur. 1985; Tanne i sur 1996; Hommay i sur 2008.). Trgovina zaraženog biljnog materijala predstavlja glavni način prijenosa u druga područja. Simptomi se očituju na drvu vinove loze, a ono postaje naborano na centralnom cilindru debla, tkivu kambija i kore, plutavosti tkiva, dolazi do nekroze pupa, te lišće na krošnji krajem vegetacije postaje crveno (Slika 2.2.3.2.) (du Preez i sur. 2011.).

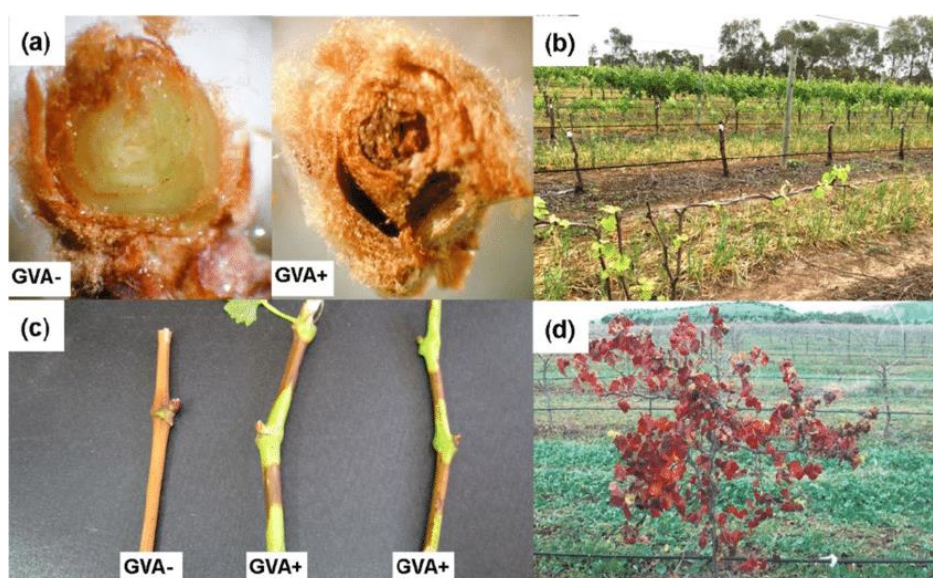
Prema Martelli i sur. (2006) B-virus vinove loze (GVB), također je jedan od članova roda *Vitivirus*, koji je serološki daleko povezan s GVA, no GVB uzrokuje simptome plutaste kore vinove loze. Ovaj virus ima istu strukturnu organizaciju kao GVA (Martelli i sur. 2006). Vektori GVB su: limunov crvac (*Planococcus citri*), lozina štitasta uš (*Planococcus ficus*), zvjezdasta štitasta uš (*Pseudococcus longispinus*), javorova štitasta uš (*Phenacoccus aceris*), *P. affinis* (Boscia i sur. 1993; Tanne i sur. 1996.).

Simptomi naboranosti drva općenito su vrlo nespecifični i teško uočljivi. Simptomi koji se često javljaju nakon zaraze vinove loze GVA i GVB su zadebljanja na mjestu srašćivanja podloge i plemke (Ivić 2011.).



Slika 2.2.3.1. A-Virus vinove loze (GVA) snimljen pod elektronskim mikroskopom

(Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Grapevine_virus_A_f78-11-9780123846846.png – pristupljeno 16.6.2022.)



Slika 2.2.3.2. Simptomi A-virusa vinove loze (GVA): a) primarna nekroza pupa; b) ograničeni proljetni rast; c) nepotpuno odrvenjavanje mladica; d) purpurno crveno lišće krajem vegetacije

(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Symptomatology-of-grapevine-virus-A-GVA-associated-Shiraz-Disease-a-primary-bud_fig1_343280662 - pristupljeno 17.06.2022.)

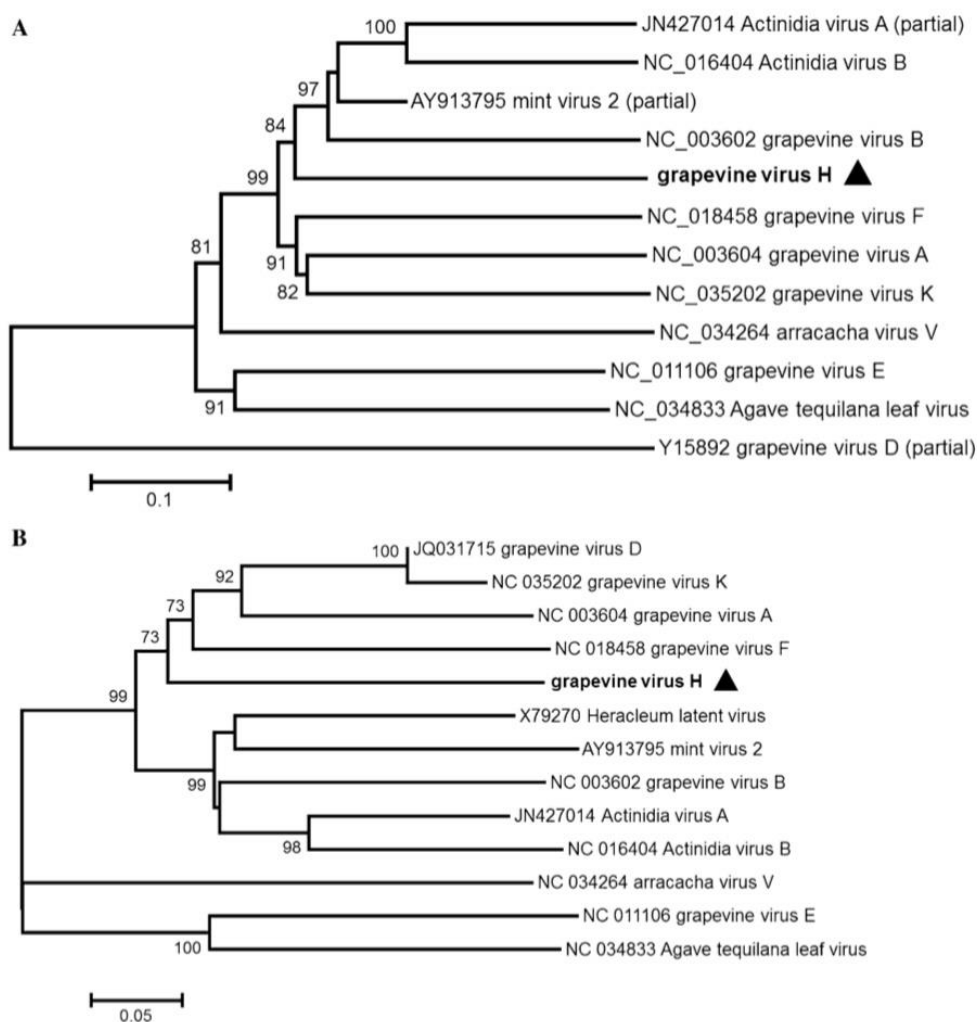
2.2.4. H-virus vinove loze (GVH)

H-virus vinove loze (GVH) također pripada rodu *Vitivirus*, te porodici *Betaflexiviridae* koji inficira vinovu lozu (Candresse i sur. 2018; Panailidou i sur. 2021). GVH je prvi puta

otkriven u Portugalu 2018. godine u nepoznatom kultivaru vinove loze. U Europi je, osim u Portugalu, virus zabilježen i u Grčkoj i to kod sorte Assyrtiko gdje je od devet testiranih uzoraka GVH otkriven u pet (Panailidou i sur. 2021). Kod otkrića GVH u Portugalu uz novootkriveni virus potvrđena su još tri virusa i dva viroida. Međutim, unatoč potvrđenom virusu, na zaraženim biljkama se nisu uočavali jasni simptomi infekcije (Candresse T. i sur 2017.).

U Hrvatskoj je GVH prvi put potvrđen 2021. godine kod devet sorti vinove loze: Babica plosnata, Bljuzgavac, Brajdica bijela, Gustopupica, Kozjak, Malvazija istarska, Muškattel, Plavčina, Svrđlovina crna (Jagunić i sur. 2021.).

Na filogenetskim stablima rekonstruiranim korištenjem RdRp te CP regije genoma predstavnika roda *Vitivirus* vidljivo je da se za obje regije GVH izdvaja u posebnu skupinu, tj. čini zasebnu vrstu unutar roda (GVF)(Slika 2.2.4.1.).



Slika 2.2.4.1. Filogenetska analiza H-virusa vinove loze u odnosu na druge pripadnike roda *Vitivirus* u regijama replikaze (RdRp, A) i proteina omotača (CP, B).

(Izvor: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-017-3587-7>- pristupljeno 09.07.2022.)

2.3. Štitaste uši

U svijetu je zabilježen veliki broj štitastih uši na vinovoj lozi, no broj vrsta koje se mogu smatrati gospodarski važnim štetnicima je manji (Masten Milek T. 2021). Po taksonomiji pripadaju nadredu *Hemiptera* (rilčari), redu *Homoptera*, podredu *Sternorrhyncha* i nadporodici *Coccoidea* (štitaste uši). To su vrlo sitni kukci, dužine tijela između 2-5 mm. Ženke su apodne, bez krila, te zdepastog tijela prekrivenog različitim izlučinama ili štitićima koji mogu biti izgrađeni od voska i svlakova. Usni ustroj ženke podešen je za sisanje. Za razliku od ženki, mužjaci imaju noge, jedan par krila i tijelo s jasnom segmentacijom. Usni aparat je reduciran, zbog čega se ne hrane, stoga žive vrlo kratko. Većina vrsta štitastih ušiju izlučuje ljepljive izlučine tj. mednu rosu. Na mednu rosu naseljavaju se gljive čađavice, zbog kojih biljka dobije tamni izgled, te se tako smanjuje asimilacijska sposobnost lišća. Razmnožavaju se spolno ili partenogenetski. Ličinke iz kojih se razvija ženka imaju nepotpunu preobrazbu, dok ličinke iz kojih se razvija mužjak imaju potpunu preobrazbu. Primarne štete čine ličinke i ženke koje ubadaju rilo sve do provodnih snopova iz kojih sišu sokove. Ponekad kroz rilo izlučuju slinu u biljne organe zbog čega dolazi do deformacije biljnih organa (Maceljski 2002.).

2.3.1. Lozina štitasta uš (*Planococcus ficus* Sign.)

Vrsta *Planococcus ficus* pripada porodici *Pseudococcidae*. Rasprostranjena je uglavnom u tropskom i subtropskom području, a kao štetnik navodi se u Europi, Bliskom istoku, sjevernoj Africi, južnoj Africi, južnoj Americi, Kaliforniji i Meksiku (Ben-Dov 1995.).

Hrani se na svim dijelovima vinove loze i korovskim biljkama. Pored vinove loze, kao domaćini lozine štitaste uši navode se jabuka, smokva, agrumi te različite korovske biljne vrste. Odrasle jedinke i ličinke hrane se sisanjem biljnih sokova iz floema biljaka domaćina te nerijetko razviju brojne kolonije (Maceljski 2002.).

Prema Waltonu (2003) tijekom godine lozina štitasta uš razvije najčešće tri generacije, a najveću brojnost populacije ove vrste bilježimo tijekom svibnja. Spolni dimorfizam je izražen. Odrasle ženke duge su oko 4 mm, široke oko 2 mm, nemaju krila te su veće od mužjaka (Slika 2.3.1.1.). Imaju segmentirano, bjelkasto tijelo. Tijelo im je prekriveno bijelim, praškastim voskom. Mužjaci su dugi oko 1-2 mm, imaju smeđe tijelo te jedan par krila. Mužjaci ne posjeduju dijelove usta, te vrlo kratko žive (Slika 2.3.1.2.). Ova vrsta može prenositi GVA te, GVB. Glavnim prijenosnici su ličinke 2. i 3. stadija koje su pokretne.

Vrsta *P. ficus* je važan štetnik vinove loze širom svijeta (Daane i sur., 2012; da Silva i sur., 2016). Vrsta uzrokuje ekonomski značajne gubitke na vinskim i stolnim sortama vinove loze. Osim toga, vrsta je prijenosnik različitih uzročnika bolesti vinove loze. Prenosi i razne uzročnike bolesti uključujući i uvijenost lista vinove loze (eng. *grapevine leafroll disease*)

(Douglas i Kruger 2008) i bolest plutavosti kore čiji uzročnik je GVA i GVB (Tanne i sur. 1989).



Slika 2.3.1.1. Odrasla ženka vrste *Planoccocus ficus*

(Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Planoccocus-ficus-Signoret-femmina-adulta_fig1_282575129 - pristupljeno 29.05.2022.)



Slika 2.3.1.2. Odrasli mužjak vrste *Planoccocus ficus*

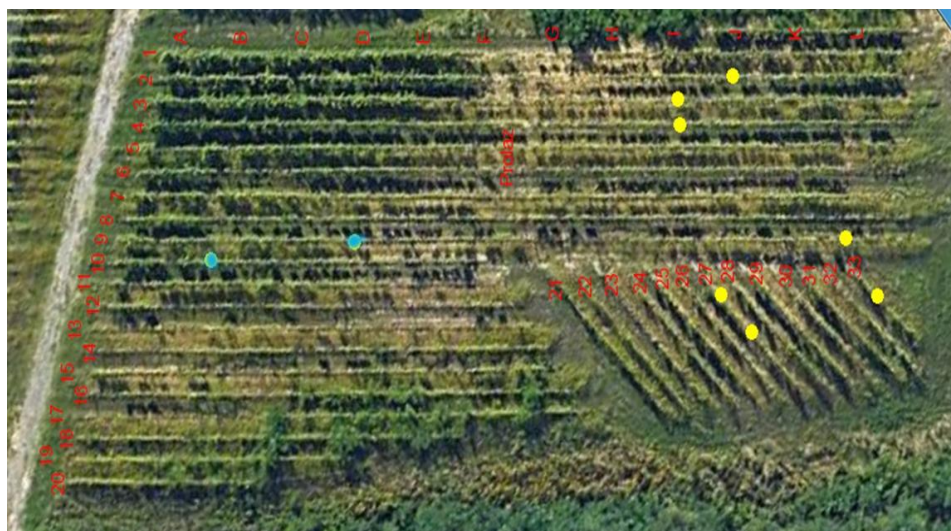
(Izvor: https://www.fitosanitario.mo.it/files/1615/3958/5768/Cocciniglie_farinose_vite.pdf - pristupljeno 02.06.2022.)

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Izvor virusa

Kao izvor GVH korištene su biljke sorata Malvazija istarska i Plavčina iz kolekcijskog nasada vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina (slika 3.1.1.1.). Sa biljaka uključenih u istraživanje tijekom lipnja uzete su mladice duge 30 cm te su stavljene u vodu kako bi se održao turgor, s ciljem da se ličinke štitastih ušiju mogu na njima nesmetano hraniti (slika 3.1.1.2.).



Slika 3.1.1.1. Kolekcijski nasad vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina. Na donjoj slici su naznačeni trsovi zaraženi GVH pri čemu su plavom bojom naznačeni trsovi korišteni kao izvor GVH u istraživanju

(Izvor: original)



Slika 3.1.1.2. Trs sorte Plavčina na pokušalištu Jazbina (lijevo) te mladica Malvazije istarske u vodi za vrijeme istraživanja (desno)

(Izvor: original)

3.1.2. Korištene test biljke/korovi

U testovima prijenosa virusa korištene su sljedeće biljne vrste: vinova loza (*Vitis vinifera* L.), divlji mak (*Papaver rhoeas* L.), europski mračnjak (*Abuthilon theophrasti* L.), oštrodlakavi šćir (*Amaranthus retroflexus* L.), ambrozija (*Ambrosia artemisifolia* L.) te zeljaste test biljke duhan (*Nicotiana benthamiana* L.) i loboda kamenjarska (*Chenopodium murale* L.). Sjeme test biljaka/korova koje je korišteno u svrhu istraživanja sijano je na Zavodu za fitopatologiju.

3.1.3. Lozina štitasta uš (*Planococcus ficus* Sign.)

Za prijenos virusa sa zaražene vinove loze sorti Malvazija istarska i Plavčina, na nezaražene test biljke vinove loze, korove te zeljaste test biljke korištena je lozina štitasta uš (*Planococcus ficus* Sign.). Kolonija spomenute vrste uzgojena je i održavana na muškatoj tikvi (*Cucurbita moschata*). (Slika 3.1.3.1.)



Slika 3.1.3.1. Kolonija štitastih uši (*Pl. ficus*) na vrsti *Cucurbita moschata* u staklenom terariju

(Izvor: original)

3.2. Metode

3.2.1. Sjetva test biljaka/korova

Sjetva test biljaka/korova izvršena je na Zavodu za fitopatologiju. Od svake biljne vrste posijano je oko 50 sjemenki (Slika 3.2.1.1.). Biljne vrste posijane su u lončiče s tresetnim supstratom. Klijanje i nicanje odvijalo se u optimalnim uvjetima kako temperature tako i vlage zraka (Slika 3.2.1.2.). Mjesec dana nakon klijanja, kada su biljke imale 4-6 listova, vršio se proces inokulacije korištenjem ličinki štitastih ušiju. Za istraživanje su izabrane samo biljke dobrog zdravstvenog stanja.



Slika 3.2.1.1. Klijanje posijanih test biljaka/korova

(Izvor: original)



Slika 3.2.1.2. Klijanci vrste *A. theoprasti*

(Izvor: original)

3.2.2. Ishrana lozine štitaste uši (*Planococcus ficus* Sign.) na zaraženim mladicama vinove loze - akvizicija

Ličinke prvog i drugog razvojnog stadija pomoću kista prenošene su na zaražene mladice vinove loze kako bi usvojile virus (Slika 3.2.2.1.). Ukupno je preneseno 300-400 ličinki po mladici vinove loze. Ličinke su ostavljene na mladicama u periodu od 48h kako bi usvojile virus – period akvizicije.



Slika 3.2.2.1. Prijenos ličinki prvog i drugog stadija pomoću kista na zaražene mladice vinove loze

(Izvor: original)

3.2.3. Prijenos štitastih uši na test biljke/korove

Nakon akvizicije na zaraženim mladima vinove loze pomoću kista ličinke drugog i trećeg razvojnog stadija su prenesene na nezaraženu lozu (sjemenjake), odnosno test biljke/korove. Na svaku pojedinačnu biljku preneseno je ukupno deset ličinki. Nakon što su ličinke dospjele na zeljaste biljke, počinje njihovo inokulacijsko razdoblje koje je trajalo 48h. Kod biljaka vinove loze, osim slobodnog puštanja na list, ispitivana je i metoda stavljanja ličinki u kaveze (Slika 3.2.3.1.). Kavezi su korišteni da sačuvaju ličinke na biljkama, te onemoguće njihovo slobodno kretanje. Kod ostalih biljaka uključenih u istraživanje, uključujući i biljke vinove loze, omogućeno je slobodno kretanje ličinki po biljkama (Slika 3.2.3.2.).



Slika 3.2.3.1. Ličinke štitaste uši s kavezom

(Izvor: original)



Slika 3.2.3.2. Ličinke štitaste uši bez kaveza

(Izvor: original)

Nakon što su ličinke provele dva dana na nezaraženim biljkama, iste su tretirane insekticidom na bazi aktivne tvari imidakloprid kako bi se ličinke uklonile s biljaka i kako ne bi remetile daljnje analize. Tri mjeseca nakon stavljanja ličinki, odnosno po isteku perioda inkubacije (slika 3.2.3.3.) biljke u pokusu testirane su na prisutnost GVH pomoću lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja u stvarnom vremenu (eng. *Real-time RT-PCR*), te metodom konvencionalog RT-PCR-a.



Slika 3.2.3.3. Test biljke/korovi za vrijeme inkubacijskog perioda

(Izvor: original)

3.2.4. Testiranje biljaka na prisutnost virusa

3.2.4.1. RT-PCR u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Za izolaciju ukupnih ribonukleinskih kiselina od svake biljke odvojeno je 0,1 g lisnih peteljki, te smrvljenih tučkom uz dodatak tekućeg dušika (Slika 3.2.4.1.1.). Svaki uzorak razrijeđen je s 1,8 mL ekstrakcijskog pufera (0.015 M Na₂CO₃, 0.035 M NaHCO₃, 0.0005 M PVP 40, 1 g/500 mL serum albumin, 0.25 g/500 mL tween 20, pH9,6), te stavljen u epruvetu od 2 mL.

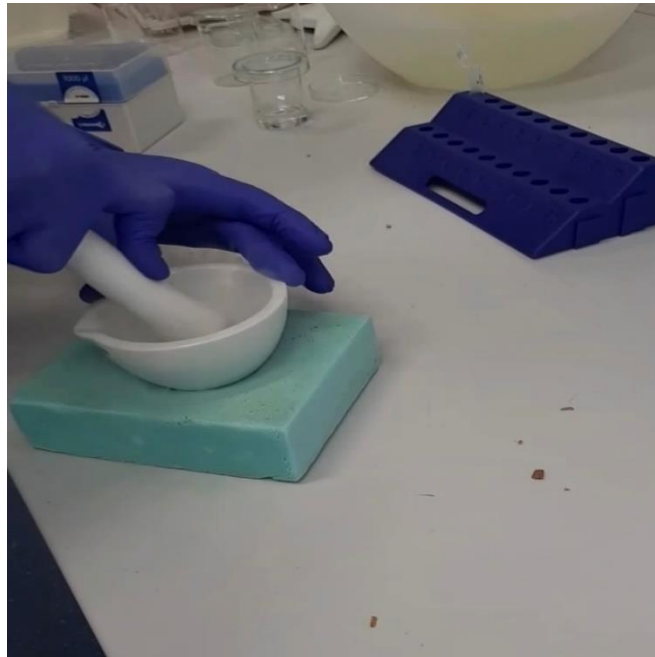
Nakon toga uzorci su stavljeni u centrifugu na 13 200 o/min tijekom 10 minuta (Slika 3.2.4.1.2.). Nakon toga je 4 µ supernatanta je pomiješano s 50 µL GES (*glycine-EDTA-sodium*) pufer (0,1 M glycine, 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,5% Triton X, 1% β-mercaptoethanol, pH 9.0 sa NaOH) i denaturirano na 95°C na 10 minuta u Mastercycleru (Eppendorf, Njemačka). Kvaliteta i količina izolirane RNA određene su spektrofotometrijski na uređaju NanoPhotometer P330 (Implen, München, Njemačka).

Umnožavano je područje enzima RNA ovisne RNA polimeraze (RdRp), a za internu kontrolu izolirane RNA korištena je 18S rRNA. Zatim je pripremljena reakcijska smjesa za qPCR volumena 20 µl. U mikroepreveti prema preporuci proizvođača pripremljen je mastermiks dodavanjem 0.4 µM početnica, 0.150 µM probe, 5 µl TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix enzima te 10.6 µL ultračiste vode (UPW). Nakon toga, u svaku jažicu pipetom je ispušteno po 18 µl mastermiks smjese uz dodavanje po 2 µl uzorka s denaturiranom RNA. Pripremljeni uzorci premješteni su u PCR uređaj Thermo Fisher Scientific 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD) (slika. 3.2.6.1.) gdje su reakcijski uvjeti bili nakon denaturacije na 95 °C od 10 minuta: 40 ciklusa denaturacije na 94 °C po 15 sekundi, te produljivanje lanaca na 60 °C na 1 minutu.

Tablica 3.2.4.1.1. Početnice i sonde za GVH i 18 S rRNA

Cilj	Početnica	Smjer	Ciljani dio genoma	Sekvenca početnice 5'-3'	Veličina produkta	Izvor
GVH	GVH-F1	Uzvodni	RdRp	-	136 pb	Al Rwahnih i Diaz-Lara (usmena komunikacija)
	GVH-R1	Nizvodni		-		
	GVH-F2	Uzvodni		-		
	GVH-R2	Nizvodni		-		
	GVH-P	Proba		-		
18 S rRNA	18S rRNA 449f	Uzvodni	18 S rRNA	GTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	70 pb	

18S rRNA 498r	Nizvodni		CTGCCTTCCTTGGATGTGGTA		Osman i Rowhani (2006.)
18S rRNA 475p	Proba		VIC- CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG- TAMRA		



Slika 3.2.4.1.1. Priprema uzoraka peteljki s tekućim dušikom

(Izvor: original)



Slika 3.2.4.1.2. Uzorak nakon centrifugiranja

(Izvor: original)



Slika 3.2.4.1.3. Thermo Fisher Scientific 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD)

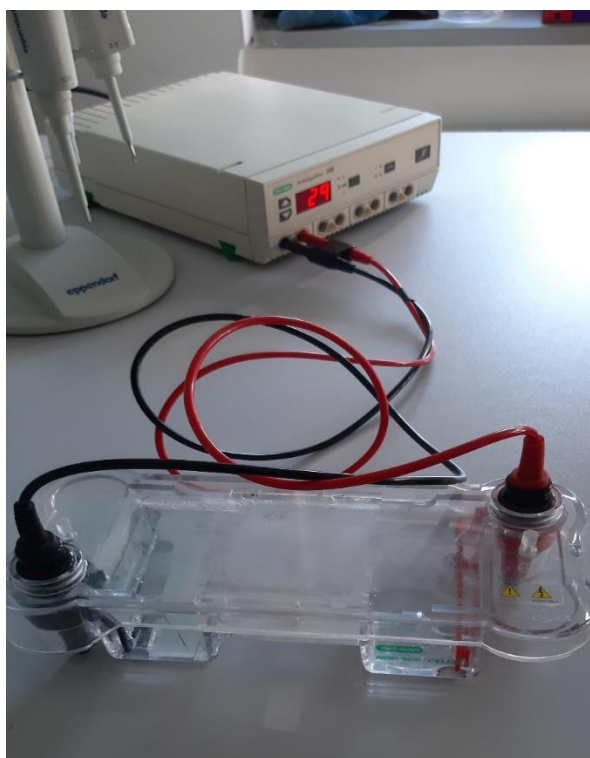
(Izvor: original)

3.2.4.2. Konvencionalni RT-PCR

Konvencionalna RT-PCR metoda provedena je u svrhu potvrđivanja rezultata metode PCR u stvarnom vremenu (Slika 3.2.4.2.1.). RT-PCR proveden je u jednom koraku na Mastercycler uređaju (Eppendorf, Njemačka) pod uvjetima: reverzna transkripcija 30 minuta pri 52°C, inicijalni aktivacijski korak 15 minuta pri 95°C, 35 ciklusa od 30 sekundi na 94°C, 45 sekundi na 55 °C, 1 minuta na 72°C, te završno izduživanje lanaca 7 minuta na 72°C. Vizualizacija RT-PCR produkata izvedena je na 2%-tnom agaroznom gelu koji je pripremljen u 1XTBE purefu, uz dodatak jedne kapi GelRed fluorescentne boje za nukleinske kiseline (Olerup, Švedska).

Tablica 3.2.4.2.1. Početnice korištene u konvencionalnom RT-PCR-u

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



Slika 3.2.4.2.1. Provedba elektroforeze na 2%-tnom agaroznom gelu
(Izvor: original)

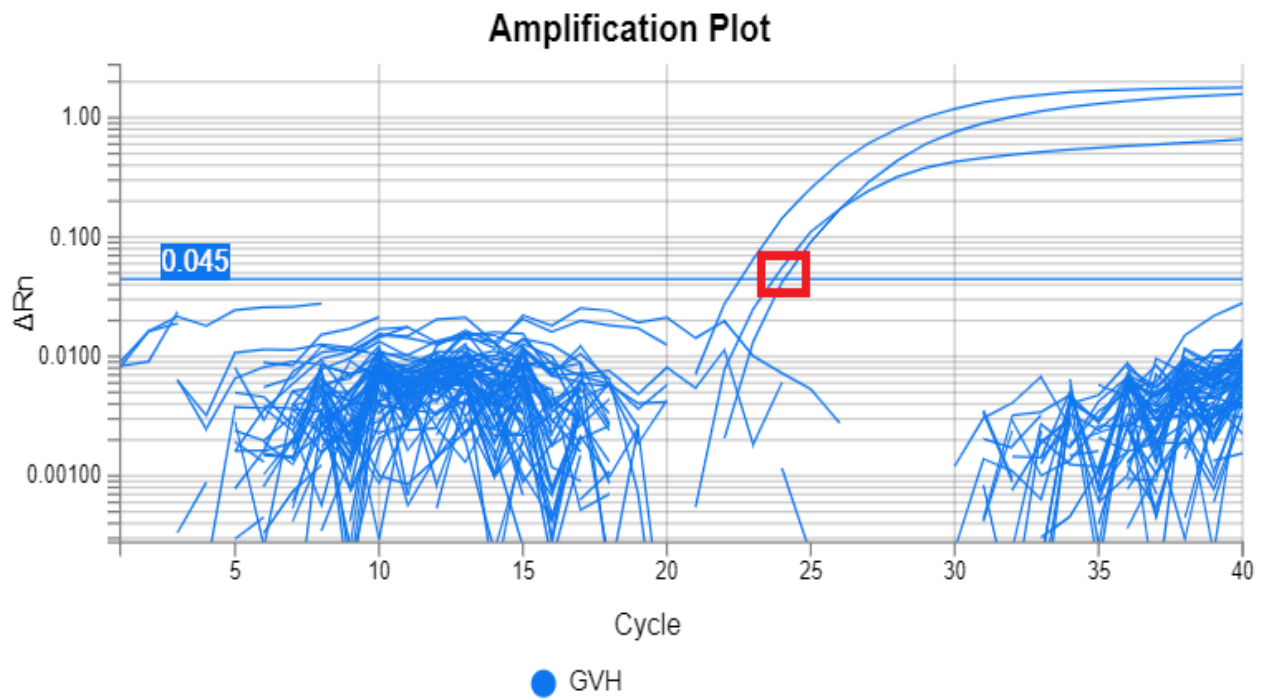
4. Rezultati istraživanja

Vektorskim prijenosom sa zaražene vinove loze na nezaražene sjemenjake vinove loze i test biljke/korove, nakon tromjesečnog inkubacijskog perioda, od ukupnog broja testiranih biljaka prisutnost GVH je sa obje detekcijske metode (real-time i konvencionalni PCR) potvrđena kod dvije biljke vinove loze i to u izvedbi prijenosa bez kaveza. Navedenim rezultatima potvrđen je sposobnost prijenosa od 10,5% (2/19).

Detaljan prikaz biljaka korištenih u istraživanju te rezultata njihovog testiranja nalazi se u Tablici 4.1., dok su rezultati testiranja sa dvije različite izvedbe RT-PCR-a prikazane na slikama 4.1. te 4.2.

Tablica 4.1. Popis korištenih i GVH pozitivnih biljaka

Vrsta	Tip biljke	Inokulacija	Ukupni broj	Broj GVH pozitivnih (%)	IZVOR
<i>Vitis vinifera</i> (bez kaveza) N	Vinova loza	11.06.2021.	19	2 (10,5 %)	10 B I 9 D
<i>Vitis vinifera</i> (sa kavezom) C		11.06.2021.	10	0	
<i>Papaver rhoeas</i>	korovi	11.06.2021.	2	0	
<i>Abuthilon theophrasti</i>		11.06.2021.	6	0	
<i>Amaranthus retroflexus</i>		11.06.2021.	11	0	
<i>Ambrosia artemisifolia</i>		11.06.2021.	12	0	
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Zeljaste test biljke	11.06.2021.	1	0	
<i>Chenopodium murale</i>		11.06.2021.	11	0	



Slika 4.1. Amplifikacijske krivulje dobivene metodom RT-qPCR na prisutnost GVH. Crvena oznaka predstavlja trenutak prijelaza preko linije razgraničenja (eng. *threshold*) kod dva pozitivna uzoraka



Slika 4.2. Rezultati testiranja metodom konvencionalnog RT-PCR-a na prisutnost GVH. Amplikoni 1 i 2 dobiveni su korištenjem CP početnica, dok su amplikoni 3 i 4 dobiveni korištenjem početnica za RdRp regiju. Prikazani amplikoni odgovaraju očekivanoj veličini PCR-produkta od 400 parova baza

5. Rasprava

Na rast i razvoj vinove loze često može utjecati pojava različitih virusa. Na našim područjima ekonomski najznačajnijim virusima vinove loze smatraju se: virus lepezastog lista vinove loze (grapevine fanleaf virus, GFLV), virus mozaika gušarke (arabis mosaic virus, ArMV) uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1, 2 i 3 (grapevine leafroll-associated virus 1, 2 i 3; GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3) te A-virus vinove loze (grapevine virus A, GVA) (Vončina 2021.). Virus vinove loze mogu se širiti na nekoliko načina, među kojima su najzastupljenija dva, a to su preko sadnog materijala i pomoću vektora. Najučestaliji način je prijenos preko sadnog materijala na veće udaljenosti, no danas je dosta raširen prijenos pomoću vektora i to na manje udaljenosti. S ciljem sprječavanja ili usporavanja širenja pojedinih virusa potrebno je pratiti te pravovremeno suzbijati ili držati pod kontrolom populaciju vektora, što je od osobite važnosti u novopodignutim vinogradima korištenjem bezvirusnog sadnog materijala. Prisutnost GVH je prvi puta potvrđena u Hrvatskoj 2021. godine i to u sklopu kolekcijskog nasada na pokušalištu Jazbina (Jagunić i sur. 2021.). Potaknuti činjenicom da su drugi predstavnici ovog roda prenosivi štitaštim ušima formirano je ovo istraživanje.

Ovim istraživanjem potvrđen je prijenos GVH pomoću vektora lozine štitaše uši (*Planococcus ficus* Sign.) na sjemenjake vinove loze metodom PCR u stvarnom vremenu (qPCR) uporabom specifičnog seta početnica kojeg su razvili Al Rwahnih i Diaz-Lara. Prijenos je utvrđen u 2 od 19 testiranih sjemenjaka vinove loze, što u postotku predstavlja 10,5%.

GVA koji također pripada rodu *Vitivirus* može se prenositi pomoću vektora, odnosno šljivine štitaše uši (*Partenolecanium corni*). Prvi stadij ličinke šljivine štitaše uši korišten je u prijenosu GVA sa zaražene biljke vinove loze Pinota crnog na deset bezvirusnih sadnica. Nakon akvizicije, dvije od deset sadnica vinove loze pokazale su se pozitivnim, što čini 20% ispitanih (Hommay 2007.). Prema Bertinu i sur. (2016.) dokazano je da *Planococcus ficus* prenosi GVA na sjemenjake vinove loze. Nakon akvizicije, 27 od 51 biljke vinove loze bilo je pozitivno (53%). Također, Rosciglione i Castellano (1985.). koristili su dvije štitaše uši (*Planococcus ficus* i *Planococcus citri*) u pokusu prijenosa GVA na nezaražene biljke vinove loze gdje su ustanovili da *P. ficus* bolje prenosi GVA, nego što to čini *P. citri* jer nije bilo pojedinačnih infekcija gdje uz GVA nije dolazio niti jedan drugi virus. Utvrđeno je da se B-virus vinove loze (GVB) može prenijeti na semiperzistentni način pomoću štitaštih uši (*P. longispinus*, *P. affinis*, *P. ficus* i *P. citri*) (Velasco i sur., 2006; Garau i sur., 2005; Tanne i sur., 1989).

Utvrđeno je kako se H-virus vinove loze (GVH) kao i GVA i GVB iz roda *Vitivirus* može prenositi na sjemenjake vinove loze pomoću vektora.

Istraživanjem iz 1995. godine (Garau i sur.) ispitivan je prijenos GVA i GVB pomoću *Pseudococcus ficus* s biljaka vinove loze na zeljaste biljke *Nicotiana occidentalis*, *N. cavicola*, *N. benthamiana*, *N. clevelandi* i *Gomphrena globosa*. Prema dobivenim rezultatima zaražene biljke s GVB bile su: *N. occidentalis* i *N. cavicola*, a GVA pozitivna bila je *N. benthamiana*

na kojoj su vidljivi simptomi zaraze. Međutim, u ovom istraživanju nije potvrđen prijenos GVH s vinove loze na korove/zeljaste biljke.

Pored utvrđene vektorske uloge lozine štitaste uši u slučaju GVH i otkrivene sposobnosti prijenosa sa loze na lozu od 10,5%, s ciljem dobivanja potpunije slike o ekologiji i epidemiologiji ovog virusa te formiranja potrebnih mjera kontrole, istraživanja bi trebalo proširiti na druge vrste štitastih uši koje su prisutne na vinovoj lozi i na različite sorte vinove loze koje se uzgajaju u Hrvatskoj, kako autohtone tako i introducirane.

6. Zaključak

U ovom istraživanju zaključeno je sljedeće:

1. Lozina štitasta uš (*Planococcus ficus* Sign.) vektor je H-virusa vinove loze.
2. Istraživanjem je utvrđena uspješnost prijenosa sa zaražene na zdravu vinovu lozu u iznosu od 10,5%.
3. Pored vinove loze nisu utvrđeni alternativni domaćini H-virusa vinove loze među korovnim i zeljastim test biljkama.

7. Popis literature

1. Ben-Dov Y (1995). A systematic catalogue of the mealybugs of the world (Insecta: Homoptera: *Coccoidea*: *Pseudococcidae*, and *Putoidae*) with data on geographical distribution, host plants, biology, and economic importance.
2. Bertin S., Pacifico D., Cavalieri V., Marzachi C., Bosco D. (2016). Transmission of grapevine virus A and grapevine leafroll-associated viruses 1 and 3 by *Planococcus ficus* and *Planococcus citri* fed on mixed-infected plants. *Ann. Appl. Biol.* 169, 53–63.
3. Boscia D., V. Savino A. Minafra S. Namba V. Elicio M.A. Castellano D. Gonsalves, and G.P. Martelli. (1993). Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology* 130: 109–120.
4. Cabaleiro C., Segura A., Garcia-berrios, J.J. (1999). Effects of Grapevine Leafroll-Associated Virus 3 on the Physiology and Must of *Vitis vinifera* L. cv. Alberino Following Contamination in the Field. *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 50, No 1.
5. Candresse T., Theil S., Faure C., Marais A. (2017). Determination of the complete genomic sequence of grapevine virus H, a novel vitivirus infecting grapevine. *Archives of Virology.* 163(1): 277-280.
6. Cvjetković B. (2010). Mikoze i pseudomikoze voćaka i vinove loze. *Zrinski. Čakovec.* 420-464.
7. Daane KM, Almeida RP, Bell VA, Walker JT, Botton M, Fallahzadeh M. (2012). Biology and management of mealybugs in vineyards. In: Bostanian NJ, Vincent C, Isaacs R (eds) *Arthropod management in vineyards*. Springer, Dordrecht
8. da Silva VP, Galzer ECW, Malausa T, Germain JF, Kaydan MB, Botton M. (2016). The vine mealybug *Planococcus ficus* (Signoret) (Hemiptera: *Pseudococcidae*) damaging vineyards in Brazil. *Neotrop Entomol* 449-451
9. Diaz-Lara A., Golino D., Al Rwahnih M. (2018). Genomic characterization of grapevine virus J, a novel virus identified in grapevine. *Archives of Virology.* 163: 1965-1967.
10. Diaz-Lara A., Brisbane R. S., Aram K., Golino D., Al Rwahnih M. (2019). Detection of new vitiviruses infecting grapevine in California. *Archives of Virology.* 164(10): 2573-2580.
11. Diaz-Lara A., Erickson T. M., Golino D., Al Rwahnih M. (2020). Development of a universal RT-PCR assay for grapevine vitiviruses. *PLoS One* .15(9):e0239522
12. Douglas N, Krüger K (2008). Transmission efficiency of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3) by the mealybugs *Planococcus ficus* and *Pseudococcus longispinus* (Hemiptera: *Pseudococcidae*). *Eur J Plant Pathol* 122:207–212.
13. du Preez J., Stephan D., Mawassi M., Burger J. T. (2011). The grapevine-infecting vitiviruses, with particular reference to grapevine virus A. *Archives of Virology.* 156(9): 1495-1503.

14. DZS (2022). DZS – Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske. U dvije godine rast površina pod vinovom lozom od 7 posto. <<https://poljoprivreda.gov.hr/vijesti/u-dvije-godine-rast-povrsina-pod-vinovom-lozom-od-7-posto/5475>>
15. Garau R., Prota V. A., Boscia D., Fiori M., Prota U. (1995) *Pseudococcus affinis* new vector of grapevine trichovirus. *Vitis* 34, 67–68.
16. Gašpar M., Karačić A. (2011). Podizanje vinograda sa zaštitom vinove loze. Federalni agromediteranski zavod. Mostar.
17. Hommay G., Komar V., Lemaire O., Herrbach E. (2008). Grapevine virus A transmission by larvae of *Parthenolecanium corni* Eur. J. Plant Pathol. 121, 185–188.
18. Hulina N. (2011). Više biljke – stablašice. Sistematika i gospodarsko značenje. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb.
19. Ivić D., Fazinić T. (2011). Gospodarski značajni virusi vinove loze. Hrvatski centar za poljoprivredu, kulturu i selo. Zavod za zaštitu bilja, Zagreb.
20. Jagunić M., Lazarević B., Nikolić K., Stupić D., Preiner D., Vončina D. (2021). Detection, Transmission, and Characterization of Grapevine Virus H in Croatia. *Pathogens*. 10, 1578.
21. Juretić, N. (2002). Osnove biljne virologije. Školska knjiga. Zagreb.
22. Maceljki M. (2002). Poljoprivredna entomologija, II. nadopunjeno izdanje., Zrinski. Čakovec.
23. Martelli G. P., Boudon-Padiou E. (2006). Directory of Infectious Diseases of Grapevines and Viroses and Virus-like Diseases of the Grapevine: Bibliographic Report 1998-2004. CIHEAM, Bari.
24. Marković Z., Milković M., Karoglan Kontić J., Preiner D. (2021). Usporedba klasičnog i in vitro razmnožavanja vinove loze. *Glasnik zaštite bilja* 5: 24-32
25. Martelli G. P., Adams M. J., Kreuze J. F., Dolja V. V. (2007). FamilyFlexiviridae: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annual Review of Phytopatology*, 45(1), 73-100.
26. Martelli G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*. 96(1): 1-81.
27. Masten Milek T., Šimala M., Pintar M. (2021). Štitaste uši na vinovoj lozi i njihovo suzbijanje u ozračju novih trendova i smanjenja uporabe pesticida. Javna ustanova Zeleni prsten Zagrebačke županije. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, Centar za zaštitu bilja. Glasilo biljne zaštite. Zagreb.

28. Meng B., Martelli G. P., Golino D. A., Fuchs M. (2017). Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management. Springer International Publishing, Cham.
29. Mirošević N. (1996). Vinogradarstvo. Nakladni zavod Globus. Zagreb.
30. Mirošević N. (2007). Razmnožavanje loze i lozno rasadničarstvo. Golden marketing – Tehnička knjiga. Zagreb.
31. Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. (2013). Molecular Virology, article from the book: Viruses: Definition, Structure, Classification, Springer-Verlag, Berlin, 17-30
32. Naidu., R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., Martelli, G.P. (2014). Grapevine Leafroll: A Complex Viral Disease Affecting a High-Value Fruit Crop. Plant Disease, Vol. 98, No. 9.
33. Nikolić K. (2021). Detekcija i djelomična molekularna karakterizacija H- virusa vinove loze iz autohtonih sorata vinove loze. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
34. OIV (2021). OIV- The International Organisation of Vine and Wine
<<https://www.oiv.int/en/oiv-life/state-of-the-vitivinicultural-world-press-conference-20-april-2021>> Pristupljeno 14. rujna 2022.
35. Osman F., Rowhani A. (2006). Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). Journal of Virological Methods. 133(2): 130-6
36. Panailidou P., Lotos L., Salsalou C-L., Gagiano E., Pietersen G., Katis N., Maliogka V. I. (2021). First report of grapevine virus H (GVH) in grapevine in Greece. Plant Disease.
37. Porotikova, E., Terehova, U., Volodin, V., Yurchenko, E., Vinogradova, S. (2021). Distribution and Genetic Diversity of Grapevine Viruses in Russia
38. Rosciglione B., Castellano M. A. (1985). Further evidence that mealybugs can transmit Grapevine virus A (GVA) to herba-ceous hosts. Phytopathologia Mediterranea, 24, 186–188.
39. Tanne E, Ben-Dov Y, Raccah B. (1989). Transmission of the corky-bark disease by the mealybug *Planococcus ficus*. Phytoparasitica 17:55– 55.
40. Tanne E., R. Marcus E. Dubitzky and B. Raccah. (1996). Analysis of progress and spatial pattern of corky bark in grapes. Plant Disease 80: 34–38.
41. Vončina D. (2021). Rasprostranjenost ekonomskih važnih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj i njihov utjecaj na vinogradarsku proizvodnju. Glasilo biljne zaštite. 344.
42. Walton V. M. (2003). Development of an integrated pest management system for vine mealybug, *Planococcus ficus* (Signoret), in vineyards in the Western Cape Province, South Africa. Dissertation, Stellenbosch University, Private Bag XI, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa.

Popis korištenih poveznica:

1. ICTV (2020). Master Species List 2020.v1. The International Committee on Taxonomy of Viruses.
<https://talk.ictvonline.org/search124283882/?q=vitivirus#gsc.tab=0&gsc.q=vitivirus&gsc.page=1> – pristup 22.06.2022.
2. ViralZone (2022.) Vitivirus. ViralZone - Swiss Institute of Bioinformatics
<https://viralzone.expasy.org/270> - pristupljeno 14.9.2022.

Slike:

1. : https://viralzone.expasy.org/resources/Vitivirus_genome.png - prisupljeno 19.06.2022.
2. : https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Grapevine_virus_A_f78-11-9780123846846.png – pristupljeno 16.06.2022.
3. : https://www.researchgate.net/figure/Symptomatology-of-grapevine-virus-A-GVA-associated-Shiraz-Disease-a-primary-bud_fig1_343280662 - pristupljeno 17.06.2022
4. : https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Planococcus-ficus-Signoret-femmina-adulta_fig1_282575129 - pristupljeno 29.05.2022.
5. https://www.fitosanitario.mo.it/files/1615/3958/5768/Cocciniglie_farinose_vite.pdf - pristupljeno 02.06.2022.

Životopis

Anda Marijanović, rođena je 21. ožujka 1999. godine u Mostaru. Osnovnu školu Bartola Kašića završava 2013. godine. Iste godine upisuje srednju Ekonomsku školu Joze Martinovića u Mostaru. Nakon završetka srednje škole 2017. godine upisuje preddiplomski studij općeg smjera agronomije na Agronomskom i prehrambeno-tehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Mostaru. Završetkom preddiplomskog studija, diplomski studij nastavlja na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, smjer Fitomedicina.