

Prijenos G-virusa vinove loze i badnavirusa vinove loze 1 sjemenom vinove loze (*Vitis vinifera* L.)

Ćosić, Mateja

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:204:458326>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**PRIJENOS G-VIRUSA VINOVE LOZE I
BADNAVIRUSA VINOVE LOZE 1 SJEMENOM
VINOVE LOZE (*Vitis vinifera* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Mateja Čosić

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

**PRIJENOS G-VIRUSA VINOVE LOZE I BADNAVIRUSA VINOVE
LOZE 1 SJEMENOM VINOVE LOZE (*Vitis vinifera* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Mateja Ćosić

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Mateja Ćosić**, JMBAG 0178114273, rođen/a 12.10.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

PRIJENOS G-VIRUSA VINOVE LOZE I BADNAVIRUSA VINOVE LOZE 1 SJEMENOM
VINOVE LOZE (*Vitis vinifera* L.)

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Mateja Ćosić**, JMBAG 0178114273, naslova

**PRIJENOS G-VIRUSA VINOVE LOZE I BADNAVIRUSA VINOVE LOZE 1 SJEMENOM
VINOVE LOZE (*Vitis vinifera* L.)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Darko Vončina, mentor _____
2. izv. prof. dr. sc. Darko Preiner, član _____
3. prof. dr. sc. Edyta Đermić, član _____

Zahvala

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru izv. prof. dr. sc. Darku Vončini na strpljenju, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada. Također se zahvaljujem Martinu Jaguniću, mag. ing. agr. na pomoći i vođenju tijekom eksperimentalnog dijela rada.

Najveće hvala mojim roditeljima na razumijevanju i podršci tokom studiranja.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Cilj rada	1
2.	Pregled literature	2
2.1.	Prijenos biljnih virusa sjemenom	2
2.2.	Vinova loza.....	4
2.3.	Virusne bolesti vinove loze	5
2.4.	G-virus vinove loze	8
2.5.	Badnavirus vinove loze 1	9
3.	Materijal i metode.....	11
3.1.	Materijal	11
3.2.	Metode.....	11
3.2.1.	Izdvajanje i naklijavanje sjemena.....	11
3.3.	Testiranje uzoraka metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (eng. real-time PCR, qPCR)	15
4.	Rezultati.....	18
5.	Rasprava	20
6.	Zaključak	22
7.	Literatura	23
	Životopis.....	27

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Mateje Ćosić**, naslova

PRIJENOS G-VIRUSA VINOVE LOZE I BADNAVIRUSA VINOVE LOZE 1SJEMENOM VINOVE LOZE (*Vitis vinifera* L.)

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.), kao jedna od najuzgajanijih i gospodarski najznačajnijih drvenastih kultura područja umjerene klime izložena je napadu velikog broja patogena među kojima se virusi izdvajaju kao jedni od važnijih. Jedan od glavnih načina širenja virusa vinove loze je razmjena zaraženog sadnog materijala. G-virus vinove loze (GVG) te badnavirus vinove loze 1 (GBV-1) utvrđeni su u relativno velikom postotku kod hrvatskih autohtonih sorata u našem priobalnom području. Kako bi se istražila mogućnost njihovog prijenosa sjemenom sa biljaka zaraženih navedenim virusima izdvojeno je sjeme koje je nakon obrade posijano u teglice sa supstratom. Dva mjeseca nakon klijanja biljke su testirane na prisutnost GVG odnosno GBV-1 metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (qPCR). U slučaju GVG testirano je 100 biljaka, a u slučaju GBV-1 ukupno 420 biljaka. Provedenim laboratorijskim testiranjem nije utvrđena prisutnost niti jednog virusa čime nije potvrđena mogućnost njihovog prijenosa putem sjemena zaražene vinove loze.

Ključne riječi: vinova loza, sjeme, prijenos, PCR u realnom vremenu

Summary

Of the master's thesis - student **Mateja Ćosić**, entitled

TRANSMISSION OF GRAPEVINE VIRUS G AND GRAPEVINE BADNAVIRUS 1 BY GRAPEVINE SEEDS (*VITIS VINIFERA* L.)

Grapevine (*Vitis vinifera* L.), one of the most widely grown and economically important woody crops in temperate climates, is subject to attack by a variety of pathogens, among which viruses stand out as one of the most important. One of the main modes of transmission of grapevine viruses is the exchange of infected planting material. Grapevine virus G (GVG) and grapevine badnavirus 1 (GBV-1) were found in a relatively high percentage in Croatian autochthonous varieties grown in coastal area. To investigate the possibility of their transmission by seeds obtained from infected plants, seeds were collected and, after processing, sown in pots with a substrate. Two months after germination, the plants were tested for the presence of GVG and GBV-1 using real-time polymerase chain reaction (qPCR). In the case of GVG, 100 plants were tested and in the case of GBV-1, a total of 420 plants were tested. The laboratory tests did not confirm the presence of the virus, so the possibility of seed transmission in grapevine was not confirmed.

Keywords: grapevine, seed, transmission, real-time PCR

1. Uvod

Vinova loza jedna je od gospodarski najznačajnijih kultura uzgajanih širom svijeta. Napada je velik broj patogena od kojih se virusi izdvajaju kao jedni od najvažnijih (Martelli 2014). Prometovanje sadnim materijalom i međunarodna razmjena uzrok su široke rasprostranjenosti virusa vinove loze (Šubić i Cvjetković, 1996). Do danas je opisano više od 86 vrsta virusa koji napadaju vinovu lozu (Fuchs, 2020). Ekonomski značajni virusi na vinovoj lozi uzrokuju simptome u vidu diskoloracije listova, pojave pjega, kloroza i nekroza, kovrčanje listova, naboranosti i jamičavosti drveta te zadebljanjima na mjestu cijepjenja. Kao posljedica napada dolazi do kasnijeg sazrijevanja biljaka, povećanog sadržaja kiselina u grožđu i smanjenog prinosa (Meng i sur. 2017). U posljednjih nekoliko godina došlo je do porasta broja virusa koji inficiraju vinovu lozu te je zbog toga potrebno konstantno dolaziti do novijih i djelotvornijih metoda ozdravljenja vinove loze od virusa (Šutić i sur. 1999). Važnu ulogu u očuvanju vinograda i smanjenju širenja virusa imaju preventivne mjere odnosno uporaba certificiranog, bezvirusnog sadnog materijala (Vončina 2021).

Za oko 10% danas poznatih biljnih virusa utvrđeno je da, pored sposobnosti prijenosa vegetativnim putem i/ili vektorima, imaju sposobnost prijenosa i sjemenom. Iako je vinova loza kultura koja se vegetativno razmnožava, razmnožavanje sjemenom se danas koristi uglavnom u oplemenjivačkim postupcima, odnosno za dobivanje križanaca.

G-virus vinove loze te badnavirus vinove loze 1 otkriveni su 2017. i 2018. godine te ne postoje podaci o mogućnosti njihovog prijenosa sjemenom vinove loze. Budući je pojavnost oba virusa utvrđena u relativno velikom postotku kod autohtonih sorata u našem priobalnom području, predloženo istraživanje dat će bolji uvid u jedan od mogućih načina širenja navedenih virusa.

1.1. Cilj rada

Cilj rada je utvrditi mogućnost prijenosa G-virusa vinove loze te badnavirusa vinove loze 1 sjemenom vinove loze (*Vitis vinifera* L.).

2. Pregled literature

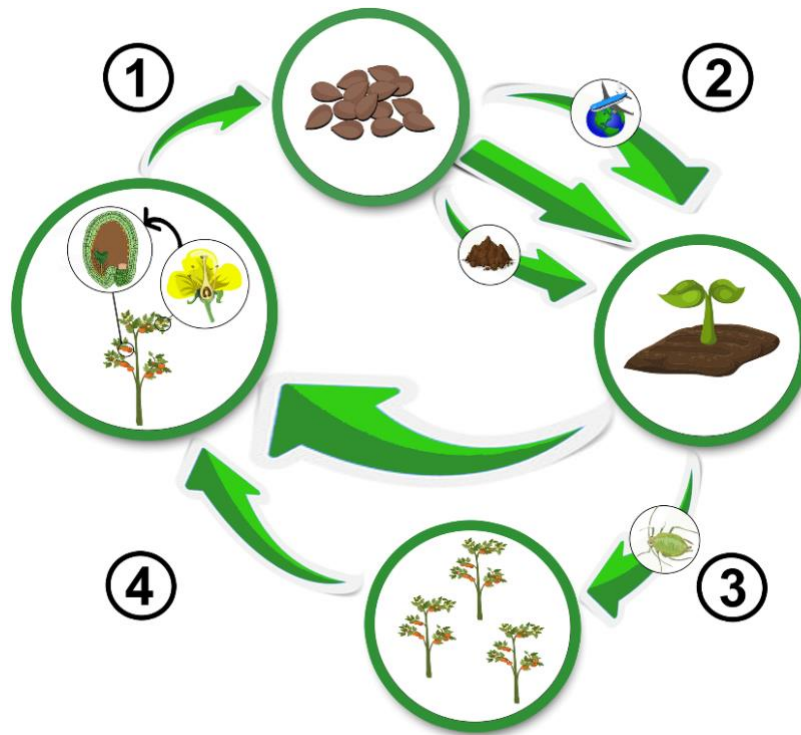
2.1. Prijenos biljnih virusa sjemenom

Globalna trgovina sjemenom pridonijela je razvoju i unapređenju svjetske poljoprivrede, no ona ima svoj negativan učinak koji se očitava u pojavi bolesti u novim područjima uzgoja, zemljama i kontinentima (Dombrovsky i Smith, 2017).

Zaraženost sjemena virusima kod različitih biljnih vrsta može ovisiti i o genotipu biljaka. Također se smatra da je pojava zaraze sjemena virusima učestalija kod oslabljenih biljaka. Tako primjerice, kod biljaka koje su izložene stresnim biotskim ili abiotskim uvjetima koji usporavaju njihov rast i razvoj, dovodi do učestalijih virusnih infekcija. Virus koji se prenosi sjemenom inficiraju generativne organe, zbog čega se virusi mogu širiti peludom na zdrave biljke u nasadima ili usjevima. Naime, u većini slučajeva do zaraze dolazi već u fazi cvatnje kada virusi ulaze u meristematska tkiva, odnosno stanice muških i ženskih gametofita zbog čega je teško odrediti da li je to određeno sposobnošću virusa da napadne meristematsko tkivo na što može utjecati i osjetljivost kultivara na infekciju (slika 2.1.1.) (Bennett, 2008).

Virusi koji se prenosi sjemenom zadržavaju se uglavnom u klici, a rjeđe u ovojnici sjemena. Utvrđeno je da je prisutnost virusa veća kod sjemena koje je u početnim fazama razvoja u odnosu na zrelo sjeme kada dolazi do smanjenja širenja virusa između stanica. Zaraza sjemena ponekad utječe i na morfološka svojstva kada se primjećuju simptomi u vidu zaostajanja u razvoju te promjene boje sjemene ovojnice. Navedeni simptomi olakšavajuća su okolnost jer se sortiranjem i selekcijom takvo sjeme može eliminirati iz daljnje upotrebe. Otežavajuća okolnost je održavanje i prijenos virusa putem zrelog sjemena u kojemu je zabilježena njihova prisutnost i do nekoliko godina (Blaszczak, 1964).

Nadalje, zanimljivo je spomenuti da su biljne vrste kod kojih je pojava zaraze sjemena virusima učestala, razvile mehanizme obrane od zaraze kako bi se smanjila učestalost zaraze potomstva. Međutim, nerijetko se virusi u sjemenu mogu širiti putem vektora – kukaca, nematoda i dr., što dodatno otežava suzbijanje i sprječavanje širenja zaraze (Bennet, 2008).



Slika 2.1.1. Ciklus prijenosa virusa putem sjemena (1) Biljni virusi dospijevaju u sjeme bilo izravnom invazijom embrija iz roditeljske biljke i/ili neizravnom infekcijom peludnih zrnaca, što dovodi do zaraženog embrija nakon oplodnje. (2) Zaraženo sjeme može izravno klijati; ostati dulje vrijeme u tlu; ili biti raspršeno na velike udaljenosti. (3) Zaražene sadnice (i odrasle biljke) iz zaraženog sjemena biti će izvor primarnog inokuluma koji omogućuje širenje virusa putem vektora. Na slici su prikazane lisne uši koje prenose 30 % biljnih virusa. (4) Ciklus se može zatvoriti na 2 načina: virusi iz zaraženih sadnica/odraslih biljaka mogu ponovno doći do sjemena što dovodi do drugog kruga prijenosa virusa putem sjemena ili biljke zaražene vektorima mogu proizvesti zaraženo sjeme. (Izvor: Pagán, 2022)

Dokazano je da povišena temperatura i intenzitet svjetlosti, odnosno globalno zatopljenje, povećavaju preživljavanje zaraženog sjemena i brzinu prijenosa virusa putem sjemena. Stoga je prijenos sjemenom od velike važnosti za sigurnost hrane što i pokazuju brojni nacionalni i međunarodni propisi o fitosanitarnim mjerama za sjemensku proizvodnju (Pagán, 2022).

Do danas je poznat malen broj virusa koji se mogu prenositi sjemenom vinove loze. Neki od njih su naboranost drveta *Vitis rupestris* pridružen virus (eng. *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*, GRSPaV) koji se primarno prenosi peludom te je moguć prijenos i putem sjemena (Morelli i sur. 2019). Također, postoje istraživanja koja potvrđuju spomenuti prijenos i za uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (eng. *Grapevine leafroll-associated virus 2*, GLRaV-2) te virus Pinot-a sivog (eng. *Grapevine Pinot gris virus*, GPGV) (Zhang i sur. 2022). U literaturi se navodi kako se virus lepezastog lista vinove loze (eng. *Grapevine*

fanleaf virus, GFLV) može prenositi polenom vinove loze i sjemenom vrsta *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium quinoa* te sjemenom soje (Cory i Hewitt, 1968). Međutim, postoje oprečni podatci u kojima nije utvrđen prijenos GFLV putem polena (Doazan, 198). Nadalje, kod nekih drugih kultura utvrđeno je da se virus mozaika krastavca (eng. *Cucumber mosaic virus*, CMV), virus običnog mozaika graha (eng. *Bean common mosaic virus*, BCMV) te virus mozaika repe (eng. *Turnip mosaic virus*, TuMV) prenose putem sjemena mahunarki. Iako je postotak njihovog prijenosa sjemenom malen, od velike je važnosti za uzgoj u monokulturi (Justić, 2017).

2.2. Vinova loza

Vinova loza je biljna vrsta koja pripada porodici *Vitaceae*, rod *Vitis*. Ona je kultivirana, listopadna, grmolika penjačica koju karakterizira formiranje vitica kao rezultat formiranja, odnosno diferencijacije grana (Hulina, 2011). Do danas je poznato je 70 vrsta unutar roda *Vitis*, a rasprostranjene su u umjerenim klimatskim područjima sjeverne Zemljine polutke (Domac, 2002). Prepoznate su tri vrste vinove loze, a to su *Vitis sylvestris* Gmel., *Vitis labrusca* L. i kultivirana *Vitis vinifera* L.

Morfologija vinove loze, ili kako se često tradicionalno naziva čokot, loza ili trs, čine korijen, stablo s granama, pupovi, mladice, rozgva i listovi kao vegetativni organi, čija je funkcija usvajanje vode i hranjiva, i skladištenje hranjivih tvari. S druge strane, generativni organi koji su prisutni na vinovoj lozi su cvjetovi, odnosno cvat, grozd, vitice, bobice i sjeme, a služe kao organi i tkiva za razmnožavanje (Mirošević, 1996). Normalan rast i razvoj vinove loze, pa tako i visina prinosa kvalitetnog grožđa, ovisi o uvjetima tla i klimi. Iz tog je razloga potrebno analizirati područje na kojem se planira podići vinograd te dobro okarakterizirati klimu, tlo i ostale važne čimbenike o kojima ovisi prinos i kvaliteta grožđa, a na temelju kojih se može procijeniti je li takvo područje (*terroir*) pogodno za uzgoj vinove loze, pri čemu je važno znati da klima nekog područja podrazumijeva količina sunčeve svjetlosti, temperaturu, količinu oborina, vlagu i vjetar (Gašpar i Karačić, 2011).

Zahvaljujući zemljopisnom položaju, povijesnim događajima i povezanosti s mnogim narodima i njihovim kulturama, u Hrvatskoj se danas uzgaja veliki broj sorata vinove loze, neke porijeklom iz drugih dijelova svijeta, a neke domaće, odnosno autohtone sorte. Istraživanja genetike, odnosno genetskih profila vinove loze koja je prisutna na području

Hrvatske, utvrdila su prisutnost velikog broja različitih sorti, među kojima su i one svjetski poznate i ekonomski važne (Maletić i sur. 2008). Prema podacima Međunarodne organizacije za vinovu lozu i vino (OIV), u 2019. godini, vinova loza uzgaja se na površini od 7 341 771 ha, a proizvodnja grožđa iznosila je 85 027 722 tona. U Republici Hrvatskoj je u 2019. godini proizvedeno 108 296 tona grožđa na površini od 21 311 ha.

Budući da je vinova loza vrsta od velike agronomske i gospodarske važnosti, a najvećim dijelom zbog proizvodnje vina, patogeni koji parazitiraju vinovu lozu, a velikim dijelom su to virusi, mogu smanjiti prinos te dovesti do velikih gubitaka u proizvodnji vina. Korištenje virusima zaraženih sadnica dovodi do smanjenja kvalitete grožđa i skraćivanja životnog vijeka vinograda te tako mogu direktno smanjiti ukupnu proizvodnju vina (Andret-Link i sur., 2004), a s obzirom na nedostatak učinkovitih mjera suzbijanja virusa, njihova prisutnost i posljedice zaraze nerijetko uzrokuju navedene probleme.

2.3. Virusne bolesti vinove loze

Vinova loza je kao i druge biljne vrste koje se razmnožavaju vegetativnim putem, podložna napadima štetočinja i patogena. Za razliku od bolesti uzrokovanih gljivama, suzbijanje virusa je otežano, a do danas nije pronađeno učinkovito i prihvatljivo rješenje. Naime, kada je biljka jednom zaražena virusom, ostaje zaražena do kraja svog vijeka, a posljedice mogu biti velike ako se bolest raširi na ostale zdrave biljke u vinogradu. Zaraza virusima dovodi do smanjene produktivnosti biljaka te niže kvalitete i količine prinosa. Zbog navedenog, virusne bolesti predstavljaju veliki problem u industriji te su u zadnje vrijeme tema mnogih istraživanja. Jedina metoda kojom proizvođači mogu očuvati vinograd i smanjiti mogućnost širenja virusa je primjenom preventivnih mjera i to sadnjom certificiranog, bezvirusnog sadnog materijala na područjima predviđenim za uzgoj loze. Također je preporuka da se prije stavljanja na tržište, odnosno već u rasadnicima, provjerava prisutnost virusa korištenjem laboratorijskih metoda. U posljednjem je desetljeću primjenom suvremenih dijagnostičkih testova utvrđeno preko 86 novih viroza vinove loze, što ju čini drvenastom kulturom s najvećim brojem poznatih virusnih bolesti, te naglašava potrebu za laboratorijskom analizom biljnog materijala prije sadnje (Fuchs, 2020).

Najčešće korištene metode za identifikaciju i detekciju virusa su kombinirana metoda reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (RT-PCR), morfološka i fenotipska

analiza te enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA od eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) (Martelli, 2014). Najpreciznijim metodama se smatraju RT-PCR i ELISA jer imaju mogućnost detektirati nukleinske kiseline karakteristične za pojedine viruse, odnosno detektirati proteine (Mekuria i sur. 2003).

Ekonomski značajni virusi vinove loze podijeljeni su u četiri grupe i to na osnovi simptomatologije. Tako su u prvu skupinu svrstani virus lepezastog lista vinove loze (eng. *grapevine fanleaf virus*, GFLV) i virus mozaika gušarke (eng. *Arabis mosaic virus*, ArMV) koji uzrokuju infektivnu degeneraciju čiji su simptomi najizraženiji u proljeće. Virus koji uzrokuje uvijenost lista vinove loze, a na osjetljivim sortama i izraženije promjene na listu, pripadaju drugoj skupini, a najučestaliji su - uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 (eng. *Grapevine leafroll-associated virus 1*, GLRaV-1), uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (eng. *Grapevine leafroll-associated virus 2*, GLRaV-2) te uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (eng. *Grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3). Virus koji pripada trećoj skupini je virus pjagavosti lista vinove loze (eng. *Grapevine fleck virus*, GFkV), a simptomi se očituju u vidu pjegavosti lista. Četvrta skupina virusa zaražava i oštećuje drvo, a u tu skupinu se ubrajaju A-virus vinove loze (eng. *Grapevine virus A*, GVA) i B-virus vinove loze (eng. *Grapevine virus B*, GVB) (Ivić i Fazinić, 2011).

Ekonomski gubitci do kojih dolazi zarazom vinove loze virusima ovise o vrsti i soju virusa, osjetljivosti sorti, načinu prijenosa, vrsti simptoma i dr. (Šutić i sur. 1999). Međutim, gubitke je otežano procijeniti zbog učinka na količinu i kvalitetu prinosa, ali i utjecaja na vijek vinograda.

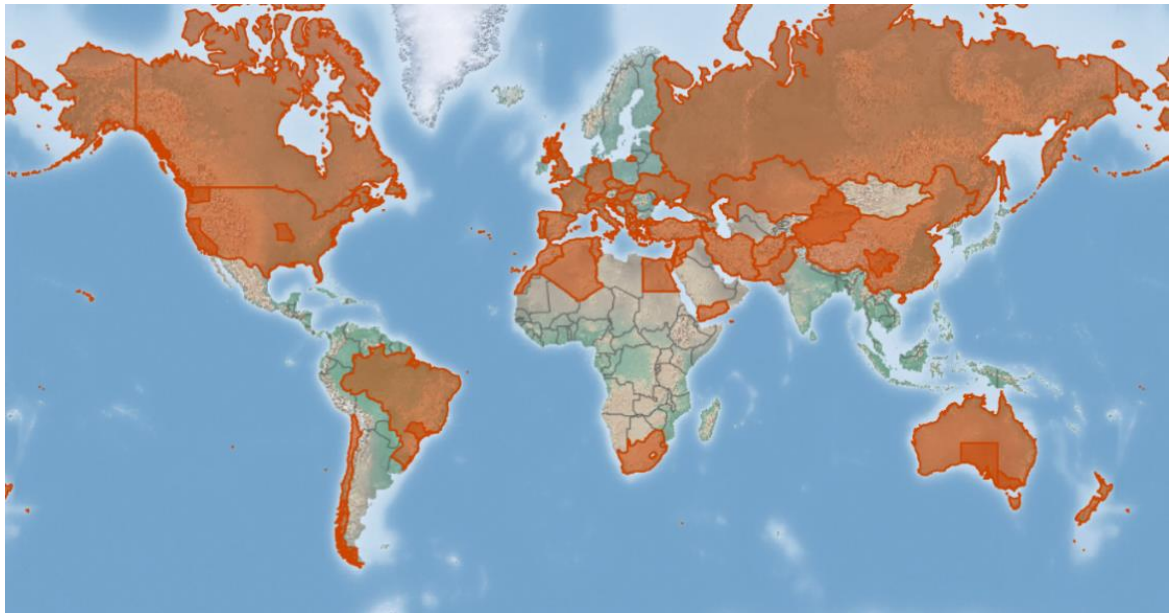
S obzirom na problematiku eliminacije, odnosno suzbijanja virusa, kao jedna od učinkovitih mjera u smanjenju njihovog širenja je sadnja zdravih biljaka. Naime, najveći problem kod morfološke analize i utvrđivanja prisutnosti zaraze virusima je što virusi nerijetko ne dovode do morfološki vidljivih promjena na biljkama (Martelli, 2014). Također je važno spomenuti da različite vrste virusa mogu uzrokovati slične promjene, odnosno simptome. S obzirom na nedostatak podataka o prinosima i uvjetima uzgoja autohtonih hrvatskih sorti, u vinogradima se često uzgajaju introducirane sorte poput sorte Merlot i Chardonnay, čije su certificirane bezvirusne sadnice dostupne u rasadnicima. Međutim, potreba za očuvanjem autohtonih sorti, ali i bioraznolikosti, potaknula je da u posljednje vrijeme rasadnici proizvode i bezvirusne sadnice hrvatskih autohtonih sorti poput sorte Plavac mali, Tribidrag i Žlahtina. Prema uvjetima za stavljanje na tržište sadnog materijala vinove loze, virusi mozaika gušarke (ArMV), lepezastog lista (GFLV), uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1), uvijenosti

lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3) i šarene pjegavosti lista (GFkV) ne smiju biti prisutni u sadnom materijalu (Pavletić, 2019).

Kako bi se smanjio prijenos biljnih virusa, u posljednjih desetak godina razvijene su laboratorijske metode kojima se u kratkom vremenu može utvrditi prisutnost virusa u sjemenskom i sadnom biljnom materijalu. Posebno se ističu metode temeljene na sekvenciranju visoke propusnosti (eng. *high throughput sequencing* - HTS), a pokazale su se učinkovitima kod detekcije virusa vinove loze. Tako je u posljednjih nekoliko godina uspješno detektirano 28 novih virusa prisutnih u vinovoj lozi. Posebno učestale su bile vrste iz roda *Vitivirus*. Tako je kod sorte Chardonnay na području Novog Zelanda utvrđena prisutnost G-virusa vinove loze (eng. *Grapevine virus G*, GVG) i I-virusa vinove loze (eng. *Grapevine virus I*, GVI) (Blouin i sur. 2018a). Također je utvrđena prisutnost H-virusa vinove loze (eng. *Grapevine virus H*, GVH) kod nepoznate sorte u Portugalu (Candresse i sur. 2018) te J-virusa vinove loze (eng. *Grapevine virus J*, GVJ) kod sorte 'Kisil Sapak' u Turkmenistanu (Diaz-Lara i sur. 2018). M-virus vinove loze (eng. *Grapevine virus M*, GVM) izoliran je iz hibrida Blanc du Bois u Teksasu (Alabi i sur. 2019), dok je L-virus vinove loze L (eng. *Grapevine virus L*, GVL) utvrđen iz HTS-podataka iz vinovih loza prikupljenih na Kanade, Novog Zelanda, Kine i Hrvatske (Debat i sur. 2019).

Prvi izolirani virus koji pripada rodu *Vitivirus* je A-virus vinove loze (*Grapevine virus A*, GVA), a izoliran je iz vinove loze u Italiji. Simptom koji se pojavljuje kod zaraženih trsova je jamičavost (Conti i sur. 1980). Smatra se da je široka geografska rasprostranjenost GVA posljedica međunarodnog širenja virusa u zaraženoj germplazmi vinove loze (slika 2.3.1.) (CABI, 2021). Sljedeći identificirani virus bio je B-virus vinove loze (*Grapevine virus B*, GVB) koji je prisutan u vinogradima u Europi i Sjevernoj Americi (Boscia i sur. 1993). Učestali simptom na trsovima je pojava plutaste kore. Za oba virusa značajno je da pripadaju u tzv. „kompleks naboranosti drva“, a ovisno o kombinaciji podloge i plemke te klimatskim uvjetima, negativno utječu na proizvodnju (Maliogka i sur. 2015). Svi prethodno spomenuti virusi mogu se prenositi putem sadnog materijala, ali je moguć i prijenos putem vektora. Najčešći vektorski prijenosnici su kukci svrstani u porodicu *Pseudococcidae* i *Coccidae*, koji nerijetko uspješno prenose GVA (Fortusini i sur. 1997), GVB (Garau i sur. 1995), i GVE (Nakaune i sur. 2008). Nadalje, osim biljnih vrsta iz roda *Vitis* koji su primarni domaćini ovih virusa, laboratorijskim istraživanjima utvrđena je sposobnost mehaničkog prenošenja na vrste iz rodova *Nicotiana* i *Chenopodium* (Boscia i sur. 1993).

Do danas je utvrđeno da se vrste roda *Vitivirus* šire putem floema biljaka vinove loze. (Martelli, 2014). Simptomi koji se pojavljuju na zaraženim biljkama se očituju u vidu zaostajanja vegetacije, pojavi zadebljanja na mjestu srastanja cijepova, smanjenju vigora, formiranju jamica i brazda na trsovima te konačno ugibanje biljaka nekoliko godina nakon zaraze (Vončina, 2021).



Slika 2.3.1. Rasprostranjenost GVA u svijetu

Izvor: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26189#toDistributionMaps> – pristupljeno 20.06.2022.

2.4. G-virus vinove loze

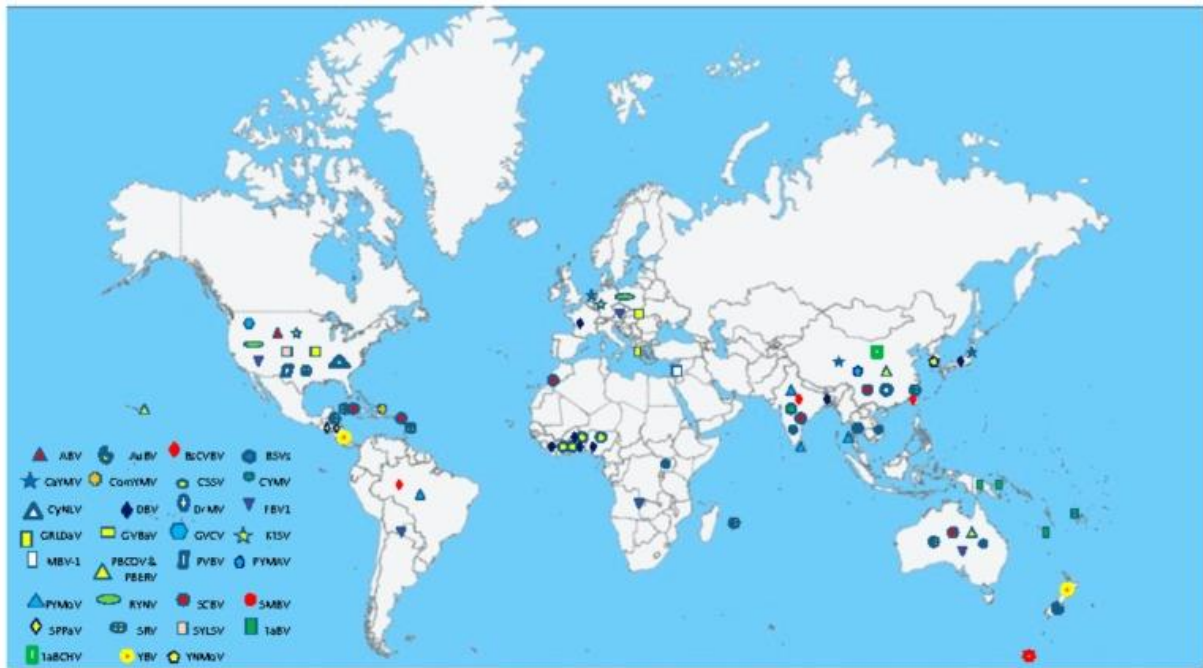
G-virus vinove loze (GVG) identificiran je kod sorte Chardonnay na području Novog Zelanda. Blouin i sur. (2018b) sekvencirali su genom do tada nepoznate vrste roda *Vitivirus* pomoću sekvenciranja visoke propusnosti te Sangerovim sekvenciranjem. Struktura genoma novootkrivenog virusa, slična je drugim vrstama roda *Vitivirus*, s pet otvorenih okvira čitanja (ORF) koji kodiraju sekvence utvrđene za rod *Vitivirus*. Filogenetska analiza ukupnog genoma potvrdila je njegovu pripadnost rodu *Vitivirus*. Temeljem kriterija za prepoznavanje i razdvajanje vrsta, koje je predložio Međunarodni odbor za taksonomiju virusa (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV, 2020.), virus se smatra vrstom roda *Vitivirus* budući da dijeli manje od 80% sličnosti na aminokiselinskoj razini te 72% sličnosti na nukleotidnoj razini u predjelu genoma koji kodira za proteinski omotač (eng. *coat protein*, CP) i RNA-

ovisnoj RNA-polimerazi (eng. *RNA-dependent RNA-polymerase*, RdRp) sa najbližim srodnikom. Navedeno je dovoljan razlog da se ovaj novootkriveni virus može smatrati zasebnom vrstom te je predložen naziv grapevine virus G (GVG).

U Hrvatskoj je GVG detektiran kod četiri autohtone sorte vinove loze (Ljutun, Dobričić, Vlaška i Babica) porijeklom s područja Kaštela (Vončina i Almeida, 2018). Jagunić i sur. (2022b) u svom istraživanju navode kako je GVG identificiran samo na autohtonim sortama vinove loze dok kod induciranih sorata nije utvrđena prisutnost virusa. Ukupna pojavnost virusa iznosila je 10,5 %.

2.5. Badnavirus vinove loze 1

Predstavnici roda *Badnavirus* inficiraju širok raspon ekonomski važnih kultiviranih biljnih vrsta u svijetu. Ekonomski gubitak uzrokovan različitim vrstama u različitim usjevima varira između 10 i 90%. Trenutno je poznato 67 različitih vrsta ovog roda, od kojih su neke ekonomski važni u tropskim uzgojnim područjima, a posebice u nasadima banana, crnog papra, kaka, citrusa i šećerne trske. Virioni su promjera oko 30 nm, duljine između 120 i 150 nm, ovisno o vrsti. Virioni se nalaze u citoplazmi, a ponekad i u vakuolama stanica biljaka domaćina. Genom se sastoji od jedne kružne molekule dvolančane DNA, s najmanje tri otvorena okvira čitanja (ORF). Simptomi uzrokovani badnavirusima ovise o domaćinskoj biljnoj vrsti, ali i sorti, vrsti virusa i uvjetima okoliša. U većini slučajeva, simptomi su blagi do umjereni te uključuju klorotične mrlje ili nekrotične pruge, deformaciju listova i smanjen razmak internodija, što dovodi do zaostajanja u rastu. Intenzitet simptoma dodatno je povećan kada su biljke izložene abiotičkim stresovima poput promjena u temperaturi te nedostatka hranjiva. Većina badnavirusa inficira višegodišnje biljne vrste koje se razmnožavaju vegetativnim putem. Badnavirusi su rasprostranjeni u tropskim i umjerenim regijama Afrike, Azije, Australije, Europe te Južne i Sjeverne Amerike (Slika 2.5.1.). (Bhat i sur. 2016).



Slika 2.5.1. Rasprostranjenost vrsta roda *Badnavirus* u svijetu

Izvor: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4926197/> - pristupljeno: 20.06.2022.

Uspješnom metodom detekcije pokazala se primjena lančane reakcije polimerazom – PCR. Ova metoda je brza, osjetljiva i pouzdana za identifikaciju badnavirusa koji inficiraju različite biljne vrste. Njezina još preciznija izvedenica je lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. real-time PCR; qPCR) (Bhat i sur. 2016).

GBV-1 (eng. *Grapevine badnavirus 1*) otkriven je 2018. godine primjenom HTS-a i to u dvije autohtone sorte vinove loze, Ljutun i Vlaška, iz kolekcijskog nasada virusa vinove loze (Zavod za fitopatologiju, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet). Obje biljke vinove loze iz kolekcijskog nasada potjecale su sa područja Kaštela. Potpuna sekvenca genoma novog virusa, uvjetno nazvana "badnavirus vinove loze 1" (GBV-1), je rekonstruiran od „*de novo*“ sklopljenog contiga dužine 7145 nukleotida te sadrži tri ORF-a tipična za predstavnike roda *Badnavirus* (Vončina i Almeida, 2018). Novijim istraživanjima utvrđena je široka rasprostranjenost ovog virusa u komercijalnim nasadima u priobalnom području Hrvatske te u kolekcijskim nasadima na kontinentu i u Splitu (Institut za jadranske kulture i melioraciju krša). Ukupna pojavnost virusa iznosila je 13.4% (Jagunić i sur. 2022a).

Nadalje, za predstavnike ovog roda koji inficiraju vinovu lozu utvrđen prijenos sadnim materijalom i vektorima, stoga je sadnja bezvirusnog sadnog materijala, osiguravanje potrebnih hranjivih tvari i upotreba kemijskih mjera za kontrolu vektora nužna kako bi se smanjilo širenje.

3. Materijal i metode

3.1. Materijal

Kao ishodišni materijal za provjeru sposobnosti prijenosa sjemenom sa biljaka vinove loze zaraženih sa G-virusom vinove loze (GVG) te badnavirusom vinove loze 1 (GBV-1) sakupljeni su grozdovi u punoj zrelosti (3.1.1.) te su korišteni u daljnjem istraživanju.



Slika 3.1.1. Grozdovi vinove loze upotrijebljeni kao izvor GVG i GBV-1

Foto: Poletti Kopešić, M. 2022.

3.2. Metode

3.2.1. Izdvajanje i naklijavanje sjemena

Izdvajanje i naklijavanje sjemena je provedeno u plasteniku na Zavodu za fitopatologiju. Prvi korak je bio odvajanje bobica od grozda (slika 3.2.1.1.). Bobice su zatim ručno zdrobljene (slika 3.2.1.2.) te su sjemenke prosijane kroz sito (slika 3.2.1.3.) kako bi se odvojile od kožice i mesa (slika 3.2.1.4.). Odvojene sjemenke su osušene te razdvojene po sortama u kutije na filter papir (slika 3.2.1.5.).



Slika 3.2.1.1. Odvajanje bobica od grozda

Foto: Poletti Kopešić, M. 2022.



Slika 3.2.1.2. Odvajanje sjemenki iz bobica

Foto: Poletti Kopešić, M. 2022.



Slika 3.2.1.3. Čišćenje i prosijavanje sjemenki jakim mlazom vode

Foto: Poletti Kopešić, M. 2022.



Slika 3.2.1.4. Prikaz očišćenog i odvojenog sjemena vinove loze

Foto: Poletti Kopešić, M. 2022.



Slika 3.2.1.5. Očišćene i sortirane sjemenke

Foto: Poletti Kopešić, M. 2022.

Stratifikacija je obavezan postupak u proizvodnji sjemena većine biljnih vrsta, a svrha joj je prekid primarne dormantnosti. 10. prosinca 2021. godine izvršena je površinska sterilizacija sjemenki 5-postotnom otopinom Izosan® G proizvođača Pliva (<https://www.pliva-sept.hr/proizvodi/dezinficijensi-povrsine/Izosan-G-1kg.html>) u trajanju od 15 minuta. Nakon ispiranja ostataka dezinficijensa sa površine sjemenki, iste su slagane u vodom natopljeni pijesak u Sterivent posude S1686 proizvođača DuchefaBiochemie (<https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/S1686/name/sterivent-high-container-107-x-94-x-96-mm>). Naizmjenično je slagan sloj vlažnog pijeska i sjemenki svakih 1 cm visine posude, do vrha. Posude su pravilno označene, prekrivene aluminijskom folijom kako bi se spriječilo isušivanje pijeska (a omogućila izmjena plinova) te su pohranjene u frižider na 4 °C. Tijekom induciranog zimskog mirovanja u trajanju od 72 dana, povremeno je nadolijevana voda u posude kako bi se održala stalna vlažnost pijeska.

Sjemenke su 20. veljače 2022. izvađene iz pijeska, isprane vodom te osušene na sobnoj temperaturi u trajanju od desetak dana, prije njihovog skladištenja u papirnatim vrećicama do pojave povoljnih vremenskih uvjeta za njihovu sjetvu.

Dana 21. travnja 2022. godine, sjemenke su potopljene u vodu na period od 24 sata kako bi nabubrile. Dan poslije su posložene na navlaženi celulozni papir u petrijevke, zatvorene parafinom i stavljene u klima komoru u uvjetima umjetnog osvjetljenja, na temperaturi od 25

°C i uz dugi dan (period svjetla 16h). 29. travnja posijane su prve iskljajale sjemenke prethodno dezinficirane 5-postotnom otopinom Izosan® G u trajanju 15 minuta te 5-postotnom otopinom *Plant preservativemixture* (PPM) dezinficijensom biljnih tkiva, proizvođača Plant Cell Technology (<https://www.plantcelltechnology.com/plant-preservative-mixture-ppm/>) u trajanju od četiri sata. Prokljajale sjemenke sijane su u 34 posude od stiropora s 40 sadnih mjesta proizvođača Plastform d.o.o., dimenzija 53 x 31 x 6 cm s volumenom otvora od 78 ml (<https://www.plastform.hr/presadnice-proizvodi.php>). Posude su napunjene višenamjenskim supstratom Klasmann Substrat 2 za sjetvu, proizvođača Klasmann-Deilmann (<http://euro-brod.hr/ponuda/hortikultura/klasmann-deilmann-ponuda-proizvoda/gotovi-profesionalni-supstrati-proizvod1>) i zalivene vodom do zasićenja. Sjemenke su posijane na dubinu 1 cm. U periodu 29. travnja 2022. do 22. svibnja 2022. sjemenjaci su čuvani u zaštićenom prostoru (plasteniku pokušališta Jazbina), kada su izneseni u poljske uvjete. Klijanje sjemenki je završilo 25. svibnja što znači da su one sjemenke koje su krenule sa rastom između 22. i 25. svibnja, direktno izložene vanjskoj sredini.

U istraživanju je korišteno ukupno 100 sjemenjaka dobivenih iz sjemena čije majčinske biljke su bile zaražene sa GVG, odnosno 420 sjemenjaka od biljaka zaraženih sa GBV-1 (tablica 3.2.1.).

Tablica 3.2.1. Popis oznaka matičnih biljaka zaraženih sa GVG, odnosno GBV-1, sorata, lokacija te broja dobivenih sjemenjaka uključenih u testiranje

Virus	Oznaka biljke	Sorta	Lokacija	Broj sjemenjaka
GVG	Krk 37	Žlahtina	Krk - Pod moću	20
	Krk 82			20
	Krk 84			20
	Krk 85			20
	Krk 88			20
GBV-1	3-L-1	Stara brajda	Vinogradarsko - vinarsko pokušalište Jazbina	50
	4-H-4	Galac crni		45
	4-I-3	Gustopupica		68
	5-E-4	Pavicić		70
	7-L-1	Mekuja		87
	8-E-1	Oskorušica		63
	8-F-1	Krstičevica		37

3.3. Testiranje uzoraka metodom lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (eng. real-time PCR, qPCR)

U fazi rasta 4-6 dobro razvijenih listova (slika 3.3.1.) sjemenjaci su bili testirani na prisutnost virusa korištenjem lančane reakcije polimerazom u realnom vremenu (eng. *real time* PCR, qPCR). Kao potencijalni izvor virusa, odnosno materijal za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina (TNA, eng. *total nucleic acids*) korišteni su listovi i peteljke. U tu svrhu odvađeno je 0,1 g biljnog materijala (slika 3.3.2.) koji je smrvljen u tarioniku pomoću tučka korištenjem tekućeg dušika (slika 3.3.3.). Svaki uzorak je razrijeđen 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; pH 9,6) i stavljen u epruvetu za sakupljanje od 2 mL (slika 3.3.4.). Nakon centrifugiranja na 13 200 okretaja/min u trajanju od 10 min (slika 3.3.5.), 4 µL supernatanta pomiješano je sa 100 µL GES (0,1 M glicina, 0,05 M NaCl, 0,001 M EDTA, 0,5% Triton X, 1% β-merkaptolanol; pH 9,0) nakon čega je slijedila denaturacija u Mastercycleru (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na 95 °C u trajanju od 10 minuta.

U pripremi qPCR reakcije korištene su početnice i probe navedene u tablici 3.3.1. qPCR reakcija pripremljena je u volumenu od 20 µL. Mastermiks se sastojao od: 0,4 µM početnica, 0,150 µM probe, 5 µL TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix enzima, 10,6 µL ultračiste vode te 2 µL TNA uzorka (nepoznata koncentracija). Pripremljeni uzorci premješteni su u PCR uređaj Thermo Fisher Scientific 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, SAD) gdje su reakcijski uvjeti bili: početna denaturacija na 95 °C na 10 minuta, 40 ciklusa denaturacije na 94 °C po 15 sekundi, te produljivanje lanaca na 60 °C na 1 minutu. Kao interna kontrola uspješnosti izolacije RNA u slučaju GVG korištena je 18S rRNA (Osman i Rowhani, 2008), dok je u slučaju GBV-1 količina i kvaliteta izolirane DNA određena spektrofotometrijski (A260/A280) na uređaju NanoPhotometer P330 (Implen, München, Njemačka).

U svaki testu su bile uključene pozitivna kontrola (uzoraka zaražen sa GVG, odnosno GBV-1) te negativna kontrola (vinova loza slobodna od ispitivanih virusa). Pozitivnim su smatrani oni uzorci sa Cq (ΔRn) vrijednostima manjima od 35.



Slika 3.3.1. Sjemenjaci vinove loze prije testiranja



Slika 3.3.2. Određivanje mase biljnog materijala za detekciju virusa



Slika 3.3.3. Usitnjavanje biljnog tkiva korištenjem tekućeg dušika



Slika 3.3.4. Uzorak u tubici



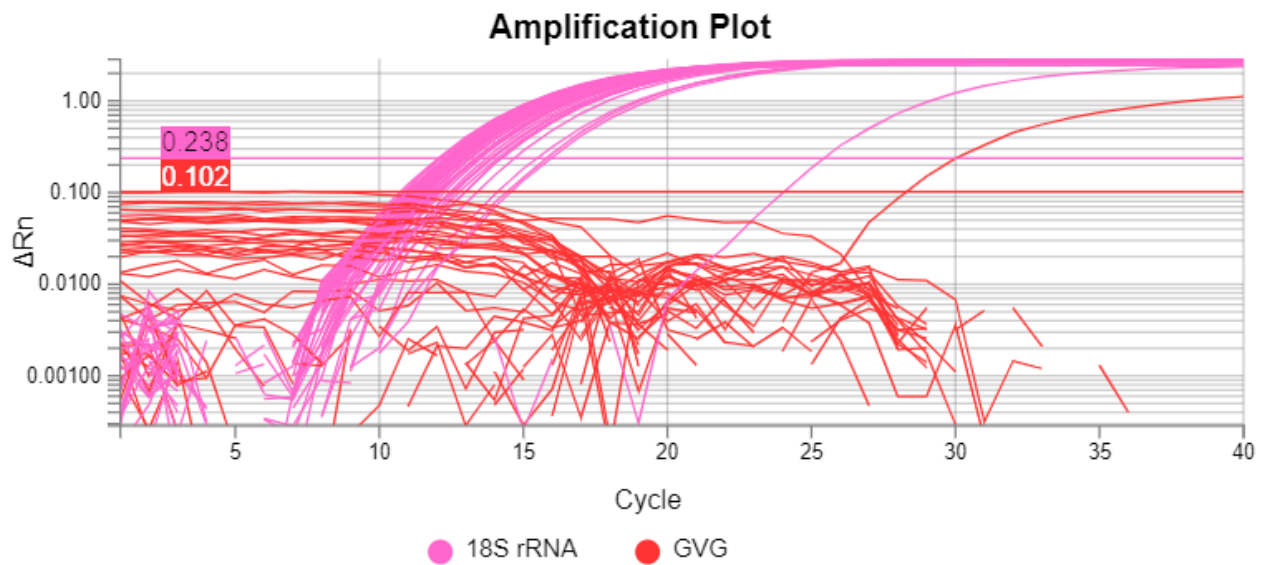
Slika 3.3.5. Centrifugiranje uzoraka

Tablica 3.3.1. Početnice i probe za detekciju GVG, GBV-1 te 18S rRNA sa pripadajućom veličinom produkata u parovima baza (pb).

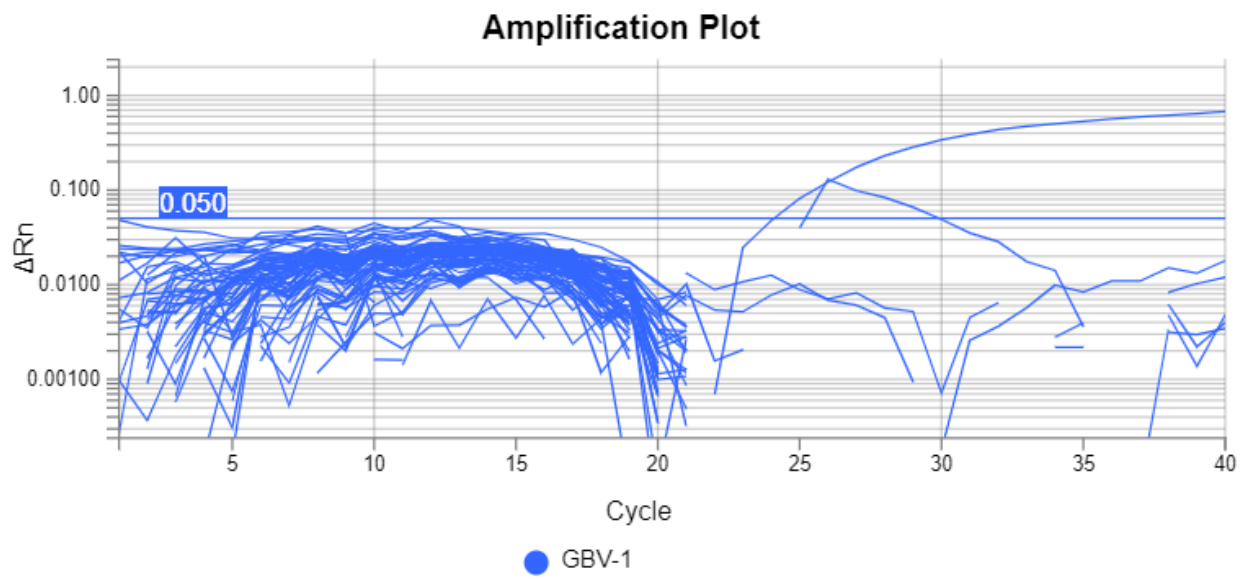
Meta	Početnica	Smjer	Ciljani dio genoma	Sekvenca početnice (5' – 3')	Veličina produkta
GVG	GVG F1	uzvodna	Proteinski omotač (CP)	AAGGATGGGAGAGGAATCAAAGA	73-75 pb
	GVG F2	uzvodna		AAGGATGGGAGAGGAATCCAAG	
	GVG R1	nizvodna		TTTAGAGCCGGGTGCTTCAC	
	GVG R2	nizvodna		TAGAGCCGGATGCTTCACG	
	GVG R3	nizvodna		TTTAGGGCCGGGTGCTTC	
	GVG P	TaqMan proba		NED-AGCAGTACTGACGCTGCT-MGB	
GBV-1	GBV-1-F	uzvodna	Reverzibilna transkriptaza (RT)	GGYAAGGAAAGAATGGTCTTCA	180 pb
	GBV-1-R	nizvodna		TCCATTCTATAGAATCTGGGTGCAT	
	GBV-1-P	TaqMan proba		FAM-AAGATCAATATAGCCTTCCTGGA-MGB	
18S rRNA	18S rRNA 449 f	uzvodna	18S rRNA	GTGACGGAGAATTAGGGTTCGA	70 pb
	18S rRNA 498 r	nizvodna		CTGCCTTCCTTGGATGTGGTA	
	18S rRNA 475 p	TaqMan proba		VIC-CCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGG-TAMRA	

4. Rezultati

Rezultati testiranja provedenog metodom PCR u stvarnom vremenu na 100 sjemenjaka vinove loze u slučaju GVG nisu rezultirali niti jednim pozitivnim uzorkom (slika 4.1.). Slični rezultati dobiveni su i testiranjem 420 sjemenjaka uzgojenih od sjemena matičnih biljaka zaraženih sa GBV-1 pri čemu niti jedan testirani uzorak nije dao pozitivan rezultat (slika 4.2.)



Slika 4.1. Amplifikacijske krivulje za RT-qPCR reakcije na prisutnost GVG. Uz amplifikacijske krivulje za 18S rRNA, jedina pozitivna reakcija dobivena je za pozitivnu kontrolu (crvena linija)



Slika 4.2. Amplifikacijske krivulje qPCR reakcije na prisutnost GBV-1. Jedina pozitivna reakcija (amplifikacijska krivulja) dobivena je kod pozitivne kontrole.

5. Rasprava

Poznavanje načina prijenosa biljnih virusa ima važnu ulogu u njihovoj epidemiologiji i ekologiji, te je od vrlo velikog značaja u definiranju mjera kontrole koje su usmjerene na sprječavanje ili barem usporavanje njihovog prijenosa, odnosno širenja. U vremenu vrlo aktivne razmjene biljnog materijala ne samo unutar istih i susjednih država, nego i između različitih kontinenata, mogući načini prijenosa imaju vrlo veliku ulogu i u planiranju zakonskih, odnosno administrativnih mjera kontrole. Smatra se da je prijenos sjemenom moguć za oko 10% danas poznatih biljnih virusa koje zadržavaju poljoprivredne kulture pri čemu treba razlikovati prijenos kontaminiranim sjemenom -virus prisutan samo na površini sjemena, te prijenos sjemenom u pravom smislu riječi – virus zaražava embrio (Albrechsten, 2006). Prijenos sjemenom je od posebno velikog značaja kod povrtnih kultura i žitarica, gdje zaraza sjemena i u malom postotku, uz uvjet da se virus može prenositi i vektorima – kukcima, u vrlo kratkom periodu može poprimiti epidemijske razmjere. Slikoviti primjeri su virus mozaika krastavca čija se mogućnost prijenosa sjemenom kreće u rasponu od 1 do 50 % te ovisi o biljci domaćinu, soju virusa te stupnju zaraze roditelja. Nadalje, virus običnog mozaika graha najčešće inficira embrio te se u sjemenu može zadržati čak do 30 godina. Simptomi se razvijaju u obliku mozaika a jačina ovisi o soju virusa i genotipu biljnog domaćina. Također, za virus mozaika repe je dokazan prijenos putem sjemena no u vrlo malome postotku (Justić, 2017). Kod drvenastih voćnih vrsta te vinove loze, budući se razmnožavaju uglavnom vegetativno, prijenos sjemenom u proizvodnji sadnica, odnosno cijepova nema većeg značaja. Međutim, važnost prijenosa sjemenom kod ovih biljnih vrsta ogleda se u tome da se u njihovom oplemenjivanju još uvijek koriste križanci, odnosno biljke koje su dobivene križanjem majčinske i očinske biljke i koje se uzgajaju iz sjemena. Doligez i sur. (2013.) u svom radu navode kako su veličina bobica i sadržaj sjemena važne komponente procesa selekcije u oplemenjivanju vinove loze. Ovisno o svojstvu koje se želi dobiti križanjem, za stolne sorte su poželjne bobice i smanjena vidljivost sjemena dok se kod vinskih sorti prvenstveno traži manja veličina bobica kako bi se povećao omjer kožice i mesa čime se poboljšavaju koncentracije antocijana, tanina i aroma u vinu. S druge strane, najvećim izazovom za uspješnost vinogradarske proizvodnje smatraju se biotički čimbenici u koje ubrajamo filokseru (*Daktulosphaera vitifoliae* Fitch), gljivične bolesti poput plamenjače (*Plasmopara viticola*), pepelnice (*Erysiphe .necator*) i sive plijesni (*Botrytis cinerea*), te abiotički čimbenici kojih čine razne klimatske prilike. Stoga se ciljem oplemenjivačkih programa smatra rješavanje krize izazvane filokserom u proizvodnji podloga,

te prilagodbi vinove loze na abiotičke stresore (Reynolds, 2015). Nadalje, kako bi se izbjegla zaraza virusima potrebno je stvarati tolerantne ili otporne sorte. Važno je naglasiti kako smanjenje zaraze počinje već u rasadnicima koji moraju osigurati bezvirusne sadnice. Također, višesortni uzgoj može pogodovati smanjenju prijenosa ako je neka sorta manje osjetljiva.

Iako za većinu virusa koje inficiraju lozu nije dokazan prijenos putem sjemena, istraživanja novijeg datuma ukazuju da je kod pojedinih virusa takav prijenos ipak moguć. Korištenjem molekularnih metoda detekcije baziranih na lančanoj reakciji polimerazom nakon obrnutog prepisivanja Zhang i sur. (2022) identificirali su GLRaV-2, GLRaV-3, GRSPaV, GVA, GFkV te GPGV u svim istraživanim organima i tkivima zaraženih biljaka (list, peteljka, cvijet, sjeme i dr.) kod sorte Moldavia. Međutim, jedino su GLRaV-2 i GPGV pronađeni u sjemenjacima proizvedenima iz sjemenki zaraženih biljaka. Valja spomenuti da su istraživanja vezana za GRSPaV i mogućnost njegovog prijenosa sjemenom oprečna te nerijetko ovise o istraživanom kultivaru. Također, mogu ovisiti o metodama koje se koriste, ali i sadnicama koje mogu potjecati od zaraženog sjemena zaražene biljke ili zaraženog križanca (Hull, 2014). Gasparro i sur. (2017) su utvrdili da se virusi lepezastog lista vinove loze (GFLV) i mozaika gušarke (ArMV) teško prenose sjemenom iz zaraženih križanaca. Našim istraživanjem nije potvrđena mogućnost prijenosa G-virusa vinove loze te badnavirusa vinove loze 1 sjemenom vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Zbog literaturnih podataka koji navode da uspješnost prijenosa sjemenom ovisi o više čimbenika (sorta, metode istraživanja, porijeklo sjemena i dr.) ne možemo sa 100 %-tnom sigurnošću tvrditi da prijenos sjemenom oba istraživana virusa nije moguć. Stoga su potrebna dodatna istraživanja, prvenstveno u pogledu različitih sorata, budući je ovim istraživanjem u slučaju GVG bila uključena samo sorta Žlahitna, dok je u slučaju GBV-1 bilo uključeno samo sedam sorata (Stara brajda, Gaklac crni, Gustopupica, Pavicić, Mekuja, Oskorušica te Krstičevica). Dodatna istraživanja svakako bi trebala uključiti osim autohtonih i introducirane sorte zastupljene u Hrvatskoj.

6. Zaključak

Istraživanjem provedenim u ovom radu, može se zaključiti:

1. Testiranjem sjemenjaka dobivenih od sjemena koje potječe od biljaka zaraženih sa G-virusom vinove loze te badnavirusom vinove loze 1 nije dokazana mogućnost njihovog prijenosa sjemenom vinove loze.

7. Literatura

1. Alabi O.J., McBride S., Appel D.N., Al Rwahnih M., Pontasch F.M. (2019). Grapevine virus M, a novel vitivirus discovered in the American hybrid bunch grape cultivar Blanc du Bois in Texas. *Archives of Virology*. 164:1739–1741.
2. Albrechsten S.E. (2006). Testing methods for seed-transmitted viruses: principles and protocols. CABI publishing. New York.
3. Andret-Link P., Laporte C., Valat L., Ritzenthaler C., Demangeat G., Vigne E., Laval L., Pfeiffer P., Stussi-Garaud C., Fuchs M. (2004). Grapevine fanleaf virus: still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*. 86:(3) 183-195.
4. Bennett W. (2008). Seed transmission of plant viruses. Agricultural Research Station, Crops Research Division. U. S. Department of Agriculture, Salinas, California.
5. CABI (2021). Grapevine virus A - datasheet. Invasive Species Compendium - <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26189#todistribution>, pristupljeno: 02. rujna 2022.
6. Cory L., Hewitt W.B. (1968). Some grapevine viruses in pollen and seeds. *Phytopathology*. 58: 1316–1318.
7. Doazan J.P. (1978). On the seed-transmission of some grapevine virus disease. U: Proceedings 6th meeting of ICVG, Cordova, Spain. 83.
8. Bhat A.I., Hohn, T., Selvarajan R. (2006). Badnaviruses: the current global scenario. *Viruses*. 8(6): 177.
9. Blaszczak V. (1964). Transmission of virus diseases by seed. *Postepy Nauk Rolniczych*. 86(2): 41-56.
10. Blouin A.G., Chooi K.M., Warren B., Napier K.R., Barrero R.A., MacDiarmid R.M. (2018a). Grapevine virus I, a putative new vitivirus detected in co-infection with grapevine virus G in New Zealand. *Archives of Virology*. 163:1371–1374.
11. Blouin A. G., Keenan S., Napier K. R., Barrero R. A., MacDiarmid R. M. (2018b). Identification of a novel vitivirus from grapevines in New Zealand. *Archives of Virology*. 163: 281-284.
12. Bosci, D., Savino V., Minafra A., Namba S., Elicio V., Castellano M.A., Gonsalves D., Martelli G.P. (1993). Properties of a filamentous virus isolated from grapevines affected by corky bark. *Archives of Virology*. 130: 109–120.
13. Candress, T., Theil S., Faure C., Marais A. (2018). Determination of the complete genomic sequence of grapevine virus H, a novel vitivirus infecting grapevine. *Archives of Virology*. 163(1): 277-280.

14. Conti, M., Milne R.G., Luisoni E., Boccardo G.A. (1980). A closterovirus from stem pitting diseases grapevine. *Phytopathology*. 70:394–399.
15. Debat H., Zavallo D., Brisbane R.S., Vončina D., Almeida R.P.P., Blouin A.G., Asurmendi S. (2019). Grapevine virus L: A novel vitivirus in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*. 155: 319–328.
16. Diaz Lara A., Brisbane R.S., Aram K., Golino D., Al Rwahnih M. (2019). Detection of new vitiviruses infecting grapevine in California. *Archives of Virology*. 164: 2573-2580.
17. Doligez A., Bertrand Y., Farnos M., Grolier M., Romieu C., Esnault F., Dias S., Berger G., François P., Pons T., Ortigosa P., Roux C., Houel C., Laucou V., Bacilieri R., Péros J.P., This P. (2013). New stable QTLs for berry weight do not colocalize with QTLs for seed traits in cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*. 13:217.
18. Domac R. (2002). *Flora Hrvatske. Školska knjiga*. Zagreb.
19. Dombrovsky A., Smith E. (2017). Seed transmission of tobamoviruses: aspects of global disease distribution. U: *Seed Biology* (Ur. Jimenez-Lopez, J.C.) InTech. London. 234-260.
20. Fortusini A.G., Scattini S., Prati S., Cinquanta G., Belli G. (1997). Transmission of grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and grapevine virus A (GVA) by scale insects. U: *Proceedings 12th Meeting of ICVG, Lisbon, Portugal*. 121–122.
21. Garau R., Prota V.A., Boscia D., Fiori M., Prota U. (1995). *Pseudococcus affinis* new vector of grapevine trichoviruses A and B. *Vitis*. 34:67–68.
22. Gasparro M., Caputo A. R., Forleo L. R., Perniola R., Alba V., Milella R. A., Antonacci D., (2017). Evidence of non-seed transmission of viruses in grapevine breeding material. *Vitis*. 56: 11-13.
23. Gašpar M., Karačić A. (2011). *Podizanje vinograda sa zaštitom vinove loze*. Federalni agromediteranski zavod, Mostar.
24. Hulina N. (2011). *Više biljke – stablašice. Sistematika i gospodarsko značenje*. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb.
25. Hull R. (2014). *Plant Virology*. John Innes Centre, Norwich.
26. Ivić D., Fazinić T., (2011). *Gospodarski značajni virusi vinove loze*. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo. Zavod za zaštitu bilja, Zagreb.
27. Jagunić M., Diaz-Lara A., Rwahnih M.A., Preiner D., Stevens K., Zdunić G., Hwang M., Vončina D. (2022a). Grapevine Badnavirus 1: detection, genetic diversity, and distribution in Croatia. *Plants*. 11(16):2135.

28. Jagunić M., Diaz-Lara A., Szőke L., Rwahnih M.A., Stevens K., Zdunić G., Vončina D. (2022b). Incidence and genetic diversity of grapevine virus G in Croatian vineyards. *Plants*. 11(18): 2341.
29. Justić H. (2017). Prenosivost virusa sjemenom u mahunarki. Diplomski rad. Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb.
30. Maletić E., Karoglan Kontić J., Pejić I. (2008). Vinova loza, ampelografija, ekologija, oplemenjivanje. Školska knjiga. Zagreb.
31. Maliogka V.I., Martelli G.P., Fuchs M., Katis N.I. (2015). Control of viruses infecting grapevine. *Advances in Virus Research*. 91(1): 175-227.
32. Martell, G.P. (2014). Grapevine-infecting viruses. *European Journal of Plant Pathology* 96: 7– 8.
33. Mekuria G., Ramesh S.A., Alberts E., Bertozzi, T., Wirthensohn M., Collins G., Sedgley M. (2003). Comparison of ELISA and RT-PCR for the detection of prunus necrotic ring spot virus and prune dwarf virus in almond (*Prunus dulcis*). *Journal of Virological Methods*. 114 (1): 65- 69.
34. Mirošević N. (1996). Vinogradarstvo. Nakladni zavod Globus. Zagreb.
35. Morelli M., Minafra A., Boscia D. (2009). Molecular variability and seed transmission of grapevine rupestris stem pitting-associated virus isolates from southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 92: 4-75.
36. Nakaune R., Toda S., Mochizuki M., Nakano M. (2008). Identification and characterization of a new vitivirus from grapevine. *Archives of Virology*. 153(10):1827-32.
37. OIV (2019). OIV - The International Organisation of Vine and Wine <https://www.oiv.int/en/statistiques/?year=2019&countryCode=HRV> Pristupljeno: 06. srpnja 2022.
38. Osman F., Rowhani A. (2008). Real-time RT-PCR (TaqMan®) assays and low density array detection of viruses associated with rugose wood complex of grapevine. *Journal of Virological Methods*. 154(1-2): 69-75.
39. Pagán I. (2022). Transmission through seeds: the unknown life of plant viruses. *Plos Pathogens* 18(8): e1010707.
40. Pavletić B. (2019). Detekcija virusa u hrvatskim autohtonim kultivarima vinove loze metodom RT-PCR prije i nakon ozdravljivanja. Rektorski rad. Prirodoslovno matematički fakultet, Zagreb.

41. Reynolds A.G. (2015). Grapevine breeding programs for the wine industry. Woodhead Publishing. Cambridge.
42. Šutić D.D., Ford R.E., Tošić M.T. (1999). Handbook of Plant Virus Diseases. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA.
43. Vončina D. (2021). Rasprostranjenost ekonomski važnih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj i njihov utjecaj na vinogradarsku proizvodnju. Glasilo biljne zaštite, 21(3): 344-349.
44. Vončina D., Almeida R.P.P. (2018). Screening of some Croatian autochthonous grapevine varieties reveals a multitude of viruses, including novel ones. Archives of Virology 163:2239–2243.
45. Zhang C.W., Huang H.Q., Huang W.T., Li H.W., Chi H., Cheng Y.Q. (2022). Grapevine leafroll-associated virus 2 and grapevine 'Pinot gris' virus are present in seedlings developed from seeds of infected grapevine plants. Vitis. 61: 21–25.

Životopis

Mateja Ćosić rođena je 12.10.1998. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Malešnica završava 2013. godine. Nagrađena je za odličan uspjeh tijekom cijelog osnovnoškolskog obrazovanja, nakon čega upisuje Športsku gimnaziju u Zagrebu. Tijekom osnovnoškolskog i srednjoškolskog obrazovanja bavila se taekwondo-om te je, uz mnoge uspjehe na međunarodnim natjecanjima, dva puta bila viceprvakinja države. 2015. i 2016. godine imala je status kategoriziranog sportaša od strane Hrvatskog olimpijskog odbora. Srednju školu završava 2017. godine te upisuje preddiplomski studij Zaštite bilje na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Titulu univ. bacc. ing. agr. stječe 2020. godine obranom završnog rada naslova: “Utjecaj dužine stratifikacije na prekidanje dormantnosti sjemena ambrozije” pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šćepanović, Zavod za herbologiju. Iste godine upisuje studij “Fitomedicina” na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Govori dva strana jezika, a to su engleski C1 razine te njemački A1 razine. U slobodno vrijeme bavi se raznim sportovima, volontiranjem i pjevanjem.