

Molekularna detekcija virusa šarenila agruma

Sarađen, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:650552>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Željka Sarađen

Molekularna detekcija virusa šarenila agruma

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Dijane Škorić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. inž. biologije, smjer ekologija.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Dijani Škorić što mi je omogućila izradu diplomskog rada u Zavodu za mikrobiologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te na njezinoj nesebičnoj pomoći, savjetima i strpljenju.

Zahvaljujem se dr. sc. Gustavu Nolascu, dr. sc. Kaledu Djelouahu, dr. sc. Katarini Hančević te djelatnicima Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu koji su svojim radom na bilo koji način doprinijeli izradi ovog diplomskog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima što su me strpljivo podržavali tijekom studiranja.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

MOLEKULARNA DETEKCIJA VIRUSA ŠARENILA AGRUMA

ŽELJKA SARAĐEN

Rooseveltova trg 6, Zagreb

Cilj ovog rada bio je utvrditi prisutnost virusa šarenila agruma (*Citrus variegation virus*, CVV) izravno iz uzoraka s terena i njegovu eventualnu rasprostranjenost u Hrvatskoj primjenom suvremenih laboratorijskih metoda utemeljenih na otkrivanju virusnog genoma. Pri tome su obuhvaćeni uzorci različitih tipova agruma, od komercijalnih nasada, obiteljskih vrtova do kolekcijskog nasada agruma Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu. Provedena molekularna detekcija CVV-a u uzorcima tkiva izravno s terena bila je prvo testiranje ove vrste kod nas te je bilo potrebno pronaći najprikladnije metode i optimizirati protokole. Za detekciju gena kapsidnog proteina CVV-a primijenjena je molekularna metoda RT-PCR i IC/RT-PCR, dok su za izolaciju ukupnih nukleinskih kiselina primijenjene 2 metode, RNeasy Plant Mini Kit i izolacija prema protokolu Bennani i sur. (2002). Kao prihvatljiva i ekonomična metodologija za dokazivanje gena za kapsidni protein ovog virusa pokazao se postupak izolacije nukleinskih kiselina prema navedenom protokolu nakon kojeg slijedi RT-PCR. Elektroforetske analize amplikona provedene su uspješno u jeftinijem puferskom sustavu koji ima manji utjecaj na okoliš (Brody i Kern, 2004). Niti jedan testirani uzorak agruma nije pokazao prisutnost CVV-a primjenom navedene metodologije.

(37 stranica, 6 slika, 8 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika-hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: CVV, agrumi, RT-PCR, IC/RT-PCR

Mentor: Dr. sc. Dijana Škorić, izvanredni profesor

Ocjenjivači: Dr. sc. Dijana Škorić, izvanredni profesor
Dr. sc. Renata Šoštarić, docent
Dr. sc. Jasna Lajtner, docent

Rad prihvaćen: 19. listopada, 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

MOLECULAR DETECTION OF CITRUS VARIEGATION VIRUS

ŽELJKA SARAĐEN

Rooseveltova trg 6, Zagreb, Croatia

The purpose of this study was to determine the presence of *Citrus variegation virus* (CVV) from field samples and its possible distribution in Croatia using laboratory methods based on the detection of viral capsid protein gene. Citrus samples of various origins were included: from commercial orchards, gardens and citrus collection planting of the Institute for Adriatic Crops and Karst Reclamation in Split. Conducted molecular detection of CVV was the first study of that kind in our country and it was necessary to find the most appropriate detection methods and optimize the protocols. For the detection of CVV molecular methods RT-PCR and IC/RT-PCR were applied, while for the nucleic acids isolation RNeasy Plant Mini Kit and the procedure described in Bennani *et al.* (2002) were evaluated. The methodology using extraction procedure by Bennani *et al.* including the amplification of CVV coat protein gene by RT-PCR proved to be adequate and cost effective method for this purpose. Additional improvements were made by introducing Tris-free buffer system (Brody and Kern, 2004) that is also safer for the environment. All tested samples of citrus collected here were negative for the presence of CVV.

(37 pages, 6 figures, 8 tables, 38 references, original in Croatian)

The thesis is deposited in the Central Biological Library.

Keywords: CVV, citrus, RT-PCR, IC/RT-PCR

Supervisor: Dr. sc. Dijana Škorić, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. sc. Dijana Škorić, Assoc. Prof.
Dr. sc. Renata Šoštarić, Asst. Prof.
Dr. sc. Jasna Lajtner, Asst. Prof.

Thesis accepted: October 19, 2011.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Općeto o biljnim virusima	1
1.2. Virus šarenila agruma (<i>Citrus variegation virus</i>, CVV)	1
1.2.1. Taksonomski položaj	1
1.2.2. Građa virusne čestice	2
1.2.3. Biljke domaćini CVV-a	3
1.2.4. Simptomi zaraze	4
1.2.5. Prijenos virusa	5
1.3. Uzgoj agruma u Hrvatskoj	6
1.4. Certifikacijski program za agrume	8
1.5. Cilj istraživanja	11
2. MATERIJALI I METODE	12
2.1. Biljni materijal	12
2.2. Osnovne kemikalije	13
2.3. Otopine i puferi	14
2.4. Testiranje na prisutnost CVV-a	14
2.4.1. Izolacija ukupne stanične RNA	15
2.4.1.1. Metoda 1 - RNeasy Plant Mini Kit	15
2.4.1.2. Metoda 2 - izolacije ukupnih RNA (Bennani i sur., 2002)	16
2.4.2. Sinteza cDNA i umnažanje metodom lančane reakcije polimerazom (RT-PCR)	18
2.4.3. Kontrola virusne cDNA gel elektroforezom	19
2.4.4. IC/RT-PCR metoda	19
2.4.4.1. Priprema protutijela	19
2.4.4.2. Priprema antigena	20

3. REZULTATI	21
4. RASPRAVA	28
5. ZAKLJUČAK	33
6. LITERATURA	34

1. UVOD

1.1. Općenito o biljnim virusima

Do danas je opisano više od 700 biljnih virusa, ali je u prirodi njihov broj naravno mnogo veći (Juretić, 2002). Viruse često nije lako otkriti u biljkama budući da neki od njih inficiraju biljke bez vidljivih simptoma ili uzrokuju simptome slične onima koji nastaju kao posljedica fizioloških poremećaja ili genskih promjena. Budući da je većina biljnih virusa vrlo virulentna, u nasadima kultiviranih biljaka, pogotovo kod uzgoja monokultura i stakleničke proizvodnje, virusne bolesti brzo mogu poprimiti epifitocijske razmjere, tako da su virusi sve prisutniji ograničavajući čimbenici u biljnoj proizvodnji. Kod proizvodnje voća i sadnog materijala agruma, virusi se kontroliraju i eliminiraju što uključuje provjeru prisutnosti cijelog niza uzročnika bolesti u sadnicama. Najvažnije bolesti agruma do sada zabilježene u našoj zemlji uzrokovane su virusom „tristeza“ (*Citrus tristeza virus*, CTV), „egzokortis“-viroidom (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) i drugim viroidima agruma (*Citrus viroids*, CVd) (Černi i sur., 2005). Ozbiljne bolesti agruma mogu uzrokovati i virus patuljavosti japanske mandarine (*Satsuma dwarf virus*, SDV), te virus šarenila agruma (*Citrus variegation virus*, CVV). Istraživanje prisutnosti potonjeg upravo je tema ovoga rada.

1.2. Virus šarenila agruma (*Citrus variegation virus*, CVV)

1.2.1. Taksonomski položaj

Virus šarenila agruma (*Citrus variegation virus* – CVV ili *Citrus infectious variegation virus* – CIVV) taksonomski pripada porodici *Bromoviridae* te rodu *Illarvirus*. Porodici *Bromoviridae* pripadaju rodovi *Alfamovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Illarvirus* i *Oleavirus* (Roossinck i sur., 2006). Rod *Illarvirus* (illarvirusi) dobio je naziv kao kratica za *isometric labile ringspot* prema karakteristikama virusa tog roda. Illarvirusi imaju trodijelan

genom sastavljen od triju jednolančanih RNA koje se pakiraju u zasebne izometrične ili baciliformne čestice veličine od 26 do 35 nm u promjeru. Za mogućnost zaraze potrebne su sve tri nukleoproteinske čestice. Osim genomskih RNA, kod ovih virusa zabilježena je i jedna subgenomska RNA koja dolazi u zasebnoj čestici. Prema ustroju genoma, ilarvirusi jako slični virusu mozaika lucerne (*Alfalfa mosaic virus*, AMV) koji pripada rodu alfamovirusa i za sada je jedini član tog roda. Ilarvirusi se prenose biljnim sokom, te sjemenom i peludom (Juretić, 2002). Neke od vrsta virusa koje pripadaju ovom rodu su virus crtičavosti duhana (*Tobacco streak virus*, TSV), kao tipična vrsta roda, virus mozaika jabuke (*Apple mosaic virus*, ApMV), virus hrapavosti lista agruma (*Citrus leaf rugose virus*, CiLRV), virus nekrotične prstenaste pjegavosti trešnje (*Prunus necrotic ringspot virus*, PNRSV), virus kržljivosti šljive (*Prune dwarf virus*, PDV) itd.

CVV je od posebnog značenja budući da je to prvi virus agruma koji je eksperimentalno mehaničkim putem prenesen s agruma na agrum i s agruma na ostale biljne domaćine. Godine 1939. je prvi put opisana zaraza uzrokovana ovim virusom i imenovana je zaraznim šarenilom agruma (*infectious variegation*). Simptomi zaraze uočeni su na stablima limuna u Glendori (Kalifornija) i uspješno su cijepljenjem inficirana stabla gorke naranče. Zatim je dokazano da CVV vrlo lako inficira i druge vrste agruma mehaničkim putem (Roistacher, 1995).

1.2.2. Građa virusne čestice

CVV karakterizira pozitivna jednolančana RNA (+ssRNA) koja je okružena samo proteinskom kapsidom. Izometrična kapsida (okrugla do izdužena) promjera je 25-32 nm, a izgrađena je od ponavljajućih molekula kapsidnog proteina (*capsid protein*, CP) veličine 24kDa (Roistacher, 2004). Genom je multikomponentan što zapravo znači da su virusni geni smješteni na tri različita segmenta +ssRNA, a ti segmenti su pakirani u odvojene čestice tri tipa. Dvije veće čestice sadržavaju ili monocistranske molekule RNA-1 (sedimentacijska komponenta B, *bottom*) ili bicistranske molekule RNA-2 (sedimentacijska komponenta M, *middle*). RNA-1 i RNA-2 kodiraju nestrukturane proteine važne u replikaciji virusa tj. komponente virusne replikaze. Treća virusna čestica je manjeg

sedimentacijskog koeficijenta (komponenta T, *top*) i sadržava dvije molekule RNA; RNA-3 i RNA-4. RNA-3 je virusna genomska bicistronska molekula s dva otvorena okvira čitanja (*open reading frame*, ORF). ORF-1 kodira virusni protein za koji se vjeruje da ima ulogu u pokretanju virusa kroz biljku (*movement protein*, MP). ORF-2 na RNA-3 kodira virusni kapsidni protein, no ovaj protein se zapravo ne translatira s RNA-3. Za ekspresiju kapsidnog proteina neophodnog za infekciju služi tzv. subgenomska RNA, odnosno RNA-4 veličine 0,9 kb. Scott i Ge (1995) sekvencirali su RNA3 (GenBank acc. no. U17389), dok su nukleotidni sljedovi RNA1 (EF584664) i RNA2 (EF584665) poznati tek unazad nekoliko godina (Li i sur. 2008), tako da je cijeli genom CVV-a u potpunosti sekvenciran.

1.2.3. Biljke domaćini CVV-a

Biljke domaćini CVV-a su vrste roda *Citrus* iz porodice *Rutaceae*, kao što su *Citrus limon* (L.) Burm.f. (limun, Slika 1), *Citrus aurantium* L. (gorka naranča), *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle (limeta) itd. Vrste roda *Citrus* zajedno s vrstama rodova *Fortunella* i *Poncirus* nazivaju se agrumima, a zajednička karakteristika im je što imaju sočan plod hesperidijum. Iako je u prirodi CVV pronađen samo unutar roda *Citrus*, osjetljivost na CVV eksperimentalno je dokazana i kod vrsta *Vigna unguiculata* (L.) Walp., *Cucumis sativus* L. (krastavac), *Capsicum frutescens* L. (paprika), *Phaseolus vulgaris* L. 'Bountiful' i drugih kultivara crvenog bubrežastog graha, koje se koriste kao bioindikatora za detekciju CVV-a (ICTVdB Management, 2006).

Zaraze CVV-om zabilježene su na području SAD-a, Mediterana i Australije, iako se pretpostavlja da je rasprostranjen i šire. CVV nije čest i uobičajen virus, ali najviše je rasprostranjen u zemljama u kojima rastu vrste roda *Citrus*.



Slika 1. Tipični simptomi virusa šarenila agruma (*Citrus variegation virus*, CVV) na limunu u Cavtatu (foto. D. Škorić).

1.2.4. Simptomi zaraze

Agrumi zaraženi CVV-om mogu imati niz simptoma koji upućuju na infekciju virusom, od blagih simptoma kod naranči i mandarina do vrlo izraženih kod limuna (Slika 1), koji su povezani sa smanjenjem uroda i malformacijama ploda. Simptomi na agrumima ovise o virusnom soju, ali i o vrsti i kultivaru agruma.

Simptomi jačeg CVV-soja (*infectious variegation*) vide se na listovima zaražene biljke u obliku iskrivljenosti, ispupčenosti i naboranosti lista uz različite stupnjeve kloroze na dijelovima lista i zahvaćaju gotovo sve listove na biljci (Roistacher, 2004). Listovi također mogu biti uži s nepravilnim rubom lista (Slika 2). Blaži soj CVV-a (*crinkly leaf*) ne mora nužno izazvati vidljive simptome, ali ako ih ima oni uključuju blaže savijanje i nabore na listu bez promijene u boji i bez redukcije u veličini lista (Bennani i sur., 2002). Ukoliko su prisutni nabori listova, to vrlo čvrsto upućuje na prisustvo CVV-a (Roistacher, 1991). Simptomi također variraju i sezonski (Brunt i sur., 1996).



Slika 2. Simptomi virusa šarenila agruma na listovima indikatorske naranče (*Citrus sinensis* L.) 'Madam Vinous' (Roistacher, 1995).

Vizualno identični simptomi uočeni su 1931. godine na Siciliji (Italija) na stablima gorke naranče i bili su nazvani Petrijeva variegacija prema znanstveniku L. Petriju koji ih je opisao. Ustanovilo se da ti simptomi nisu rezultat zaraze CVV-om budući da nisu prenosivi na drugu biljku te da se najvjerojatnije radi o simptomima uzrokovanim preosjetljivošću mladica gorke naranče na niske zimske temperature, jer ih one iz staklenika nisu imale (Wallace, 1978).

1.2.5. Prijenos virusa

Zbog specifične građe stanične stijenke biljne stanice biljni virusi se ne mogu adsorbirati na staničnu stijenku biljke domaćina, nego ulaze kroz rane na staničnoj stijenci ili ektodezmije, a u biljci se dalje prenose plazmodezmijama između stanica i provodnim kanalima (najčešće floemom) na veće udaljenosti.

CVV se može prenijeti na drugu biljku-domaćina mehaničkim putem i cijepljenjem dok prijenos putem sjemena nije zabilježen (Brunt i sur., 1996). Primarni način rasprostranjenja virusa je mehanički prijenos, odnosno uzrokovan je upravo djelovanjem čovjeka. Inače, mehanički prijenos CVV-a kod orezivanja i cijepljenja agruma preko alata može se spriječiti njegovim potapanjem u 1%-tnu otopinu natrijeva hipoklorita. Prema

istraživanju Roistachera i sur. (1980), prijenos CVV-a rezovima kontaminiranim nožem nije bio zabilježen ukoliko je nož bio ispran vodom i obrisao, dok je kod rezova nožem bez opisanih postupaka uspješnost prijenosa virusa iznosila čak 90%. Prijenos ovog virusa putem kukaca vektora nije zabilježen (Roistacher, 1991).

1.3. Uzgoj agruma u Hrvatskoj

Agrumi se u svijetu uzgajaju na području između 20° južne i 40° sjeverne geografske širine. U Hrvatskoj se agrumi uzgajaju između 42° i 44° sjeverne geografske širine, što je moguće zbog utjecaja tople morske struje koja se kreće od juga prema sjeveru uzduž istočne obale Jadranskoga mora. Našu obalu to čini najsjevernijim komercijalnim područjem uzgoja agruma u svijetu. Jedino je područje sjeverne obale Crnog mora oko Sukhumija u Abhaziji, autonomnoj pokrajini Gruzije, donekle usporedivo s našim područjem po agroekološkim uvjetima. Uzgoj agruma u Hrvatskoj je ipak zbog nepovoljnih klimatskih uvjeta, prvenstveno niskih zimskih temperatura, moguć samo u priobalnom području od Trogira do Konavala, srednjodalmatinskim otocima te sjevernije na otoku Lošinju i na najjužnijem dijelu Istre, oko Pule (Gatin i sur., 1983).

Najčešće uzgajana i komercijalno najznačajnija vrsta agruma u Hrvatskoj je tzv. japanska mandarina koja se u uzgojnim područjima s anglosaksonskim jezicima najčešće spominje kao Satsuma, odnosno u stručnoj literaturi kao mandarina Unshiu (*Citrus unshiu* Marc.). Ponajviše je to zbog njene otpornosti na niske temperature tako da se može komercijalno uzgajati na obali srednje i južne Dalmacije bez većeg rizika. Stabla ove vrste kada su u stanju mirovanja mogu podnijeti mrazeve od -8 do -9°C bez velikih oštećenja (Bakarić, 1983). Najveće površine agruma pod mandarinom Unshiu nalaze se u dolini rijeke Neretve. U ostalim podregijama areal uzgoja je ograničen zemljištima lošije bonitetne klase ili nedostatkom vode. Komercijalni nasadi ostalih vrsta nalaze se samo u manjoj količini na srednjodalmatinskim otocima, ponajviše na Visu i Braču (Rošin i sur., 2009).

Mandarina je trenutno jedina voćna vrsta koja se izvozi iz Hrvatske, zbog čega ima veliku gospodarsku važnost. Proizvodnja se povećava iz godine u godinu, a najveća je zabilježena prošle godine sa 55 486 tona (Tablica 1). Iako se za 2009. godinu

pretpostavljalo da će proizvodnja biti veća, ona je iznosila za 25% manje od prethodne 2008. godine zbog loših vremenskih prilika (DZS, 2011). U svibnju i lipnju došlo je do odbacivanja cvjetova zbog previsokih temperatura neuobičajenih za ovo podneblje, a u kolovozu je tuča uništila veći dio nasada neretvanskog područja.

Tablica 1. Ukupna godišnja proizvodnja mandarina u Hrvatskoj prema podacima Državnog zavoda za statistiku Republike Hrvatske 2011.

Godina	Mandarine (t)
2002.	16 057
2003.	11 102
2004.	nema podataka
2005.	8 067
2006.	42 120
2007.	43 136
2008.	50 138
2009.	37 500
2010.	55 486

Mandarina Unshiu prvi puta je u svrhu komercijalnog uzgoja stigla na našu obalu 1934. godine kada je dobiveno oko 1000 sadnica kao dar japanske vlade. Oko 1950. godine prve sadnice stigle su iz rasadnika Čibača (Dubrovnik) u Opuzen gdje su posađene na obali Male Neretve te se pokazalo da daje kvalitetne plodove i visok urod, a plodovi zriju najesen prije prvih mrazeva. Budući da se raspolagalo samo jednom sortom mandarine Unshiu, sortom Owari, koja dozrijeva u studenom, a sama berba traje 20-ak dana, bilo je neophodno stvoriti sortiment koji će omogućiti berbu i pokriti tržište u mnogo duljem vremenskom periodu.

Na području Donje Neretve, na pokusnom polju "Luke" kod Opuzena tadašnjeg PIK-a "Neretva-Opuzen" u razdoblju od 1965. do 1984. god. prikupljen je fond od 110 sorti i klonova raznih vrsta agruma većinom s područja Gruzije, Korzike, Japana i Kalifornije (Gatin, 1992). Taj genofond služio je za razvoj agrumarstva na području donje Neretve i njegovo širenje na otoke i obalno područje Dalmacije. Najveći dio fonda odnosi se na mandarinu Unshiu sa sortama kao što su Chahara, Ichimaru, Kuno, Kawano-Wase, Zorica Rana, ali prisutne su naravno i ostale vrste agruma (naranča, limun, grejp) sa svojim sortama. Daljnjim uvođenjem novih kvalitetnih sorti nije se omogućilo samo produljenje perioda zriobe i berbe, već i nova kakvoća i količina uroda u novim nasadima, budući da se nove sorte odlikuju sve boljim karakteristikama većim plodovima, tanjom korom ploda, boljim omjerom šećera i kiselina koji utječe na okus te su sama zrioba i veličina ploda ujednačeniji u nasadima. Nažalost, godinama sakupljan unikatni genofond agruma u dolini Neretve većinom je uništen za vrijeme rata početkom devedesetih godina. Jedan dio ipak je prenesen u private rasadnike u Kaštelima ili se održao kao proizvodni nasadi po obalnom i otočnom dijelu srednje i južne Dalmacije, te je kasnije poslužio Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša iz Splita za zasnivanje kolekcijskog nasada mandarine Unshiu u Kaštelima (D. Škorić, usmeno priopćenje).

1.4. Certifikacijski program za agrume

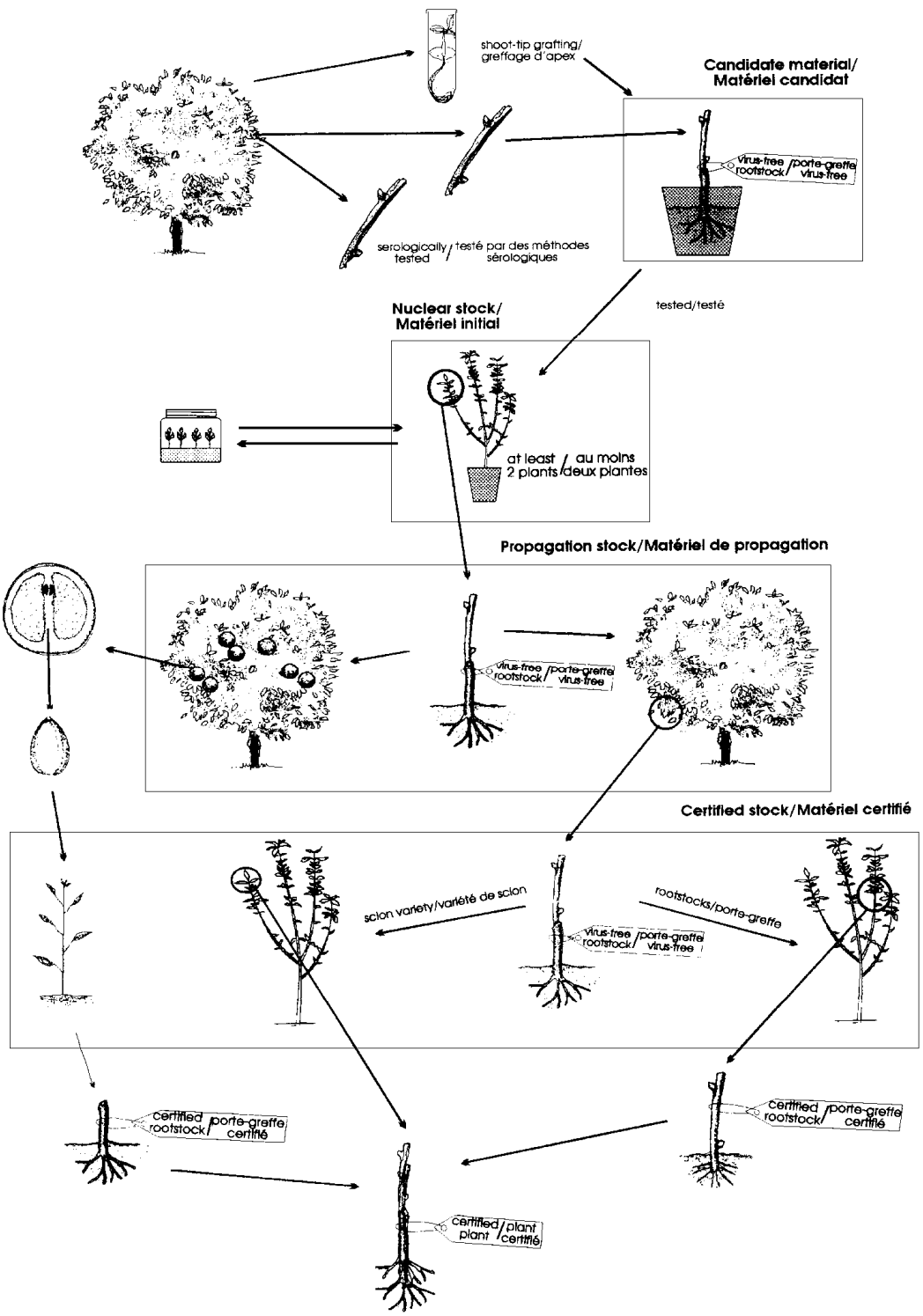
Za kontrolu virusa i bolesti agruma te proizvodnju zdravog sadnog materijala postoji čitav niz sistematiziranih postupaka obuhvaćenih certifikacijskim programom. Certifikacijski program uključuje program ozdravljivanja biljaka, za dobivanje zdravog sadnog materijala za daljnju komercijalnu proizvodnju, zatim karantenski program koji sprečava introdukciju novih virusa i bolesti prilikom uvoza novih sorti i certifikacijski program u užem smislu koji osigurava održavanje sanitarnog statusa biljnog materijala kakav je bio u matičnom nasadu tijekom daljnje komercijalne proizvodnje (Navarro, 1993).

Zbog velikih šteta koje virusi i njima slični patogeni nanose biljnoj proizvodnji sve više zemalja uvodi posebne sanitacijske i certifikacijske programe kojima potiču domaću proizvodnju i reguliraju trgovinu sjemenskim i sadnim materijalom. Takve programe su razvile gotovo sve mediteranske zemlje u kojima su agrumi značajna poljoprivredna

kultura (Italija, Španjolska, Francuska, Portugal, Grčka, Egipat i dr.). Programi se zasnivaju na kontinuiranom provođenju kontrole nasada, brzom testiranju i njima sličnih patogena te postupku njihove eliminacije (Hančević, 2005). Svi ovi postupci bi trebali pridonijeti proizvodnji zdravog bezvirusnog materijala i sprečavanju širenja virusnih i njima sličnih bolesti, što je i zakonski regulirano (Zakon o sjemenu, sadnom materijalu i priznavanju sorti poljoprivrednog bilja, 2005).

Certifikacijski program za Hrvatsku još nije u cijelosti razrađen. Takav program predviđa zasnivanje predosnovnog i osnovnog matičnog nasada koji služi dobivanju velikog broja pupova za proizvodnju sadnica u rasadnicima. Terenska istraživanja i laboratorijske analize su pokazale da je većina stabala agruma u Hrvatskoj, uključujući i matična stabla, zaražena nekom od bolesti uzrokovanih virusima ili virusima sličnim organizmima. Naročito je izražena zaraza virusom "tristeza", jednim od najopasnijih patogena agruma, koji je rasprostranjen u najmanje 50% komercijalnog uzgojnog područja citrusa (Škorić i sur., 2002). Tretiranjem zaraženih biljaka povišenom temperaturom (termoterapija) i cijepljenjem na bezvirusne sjemenjake podloge *in vitro* (mikrocijepljenje) moguće je ozdraviti zaraženi biljni materijal od uzročnika bolesti. Spomenutim postupcima i introdukcijom određenog sortimenta dobiveno je 25 sorti mandarina, limuna i drugih vrsta agruma slobodnih od poznatih bolesti čime je zasnovan predosnovni matični nasad agruma kojemu slijedi postupak priznavanja od strane nadležnih institucija. Zbog opasnosti od rekontaminacije zdravi biljni materijal čuva se u uvjetima optimalne zaštite u mrežarniku za bezvirusnu reprodukciju u Institutu za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu uz provođenje strogog sanitarnog nadzora (Rošin i sur., 2009).

Zasnivanjem predosnovnog matičnog nasada ostvareni su preduvjeti za proizvodnju certificiranog sadnog materijala agruma prema certifikacijskoj shemi (Slika 3) EPPO-a (European and Mediterranean Plant Protection Organization). Postupak dobivanja ozdravljenog biljnog materijala može se uz određene izmjene i prilagodbe primijeniti i za dobivanje predosnovnih matičnih nasada drugih voćnih kultura.



Slika 3. Faze certifikacije agruma prema Europskoj i mediteranskoj organizaciji za zaštitu bilja (EPPO, 1995).

1.5. Cilj istraživanja

Primarni cilj ovog rada bio je utvrditi prisutnost virusa šarenila agruma (CVV) izravno iz uzoraka s terena i njegovu eventualnu rasprostranjenost u Hrvatskoj primjenom suvremenih laboratorijskih metoda utemeljenih na otkrivanju virusnog genoma. Pri tome su obuhvaćeni uzorci različitih tipova agruma, iz komercijalnih nasada, obiteljskih vrtova do kolekcijskog nasada agruma Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu.

Budući da je u ovom diplomskom radu po prvi puta u nas provedeno istraživanje ovog tipa, bilo je potrebno pronaći najprikladnije metode i optimizirati protokole kojima bi se CVV mogao detektirati iz uzoraka agruma. Za detekciju CVV-a primijenila sam molekularnu metodu RT-PCR i IC/RT-PCR, dok sam za izolaciju ukupne stanične RNA primijenila 2 metode, RNeasy Plant Mini Kit-om i izolaciju prema protokolu Bennani i sur. (2002) i pokušala procijeniti njihovu uspješnost u otkrivanju ovog virusa.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Biljni materijal

Uzorci agruma koje sam testirala na prisutnost CVV-a sakupljeni su iz staklenika Botaničkog zavoda Biološkog odsjeka PMF-a u Botaničkom vrtu (9 uzoraka *Citrus wilsonii* Tanaka), dok su ostali sakupljeni u nasadima na više lokaliteta uglavnom s područja srednje i južne Dalmacije (70 uzoraka), koje su u okviru svojih programa i projekata sabrali stručnjaci Zavoda za zaštitu bilja u poljoprivredi i šumarstvu Republike Hrvatske (danas Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo), te stručnjaci Instituta za jadranske kulture i melioraciju krša u Splitu.

Također sam testirala na CVV 15 uzoraka smrznutog tkiva sačuvanog od prijašnjih istraživanja (Černi, 2009), zatim 4 uzorka *Citrus unshiu* Marc. koji su prošli proces termoterapije (Hančević, 2005) te 2 uzorka gorke naranče (CVV OBC9) i limuna (CVV 60X) iz staklenika IJK-a kao pozitivne kontrole. Pozitivne kontrole dobivene su od dr. Khaleda Djelouaha iz Barija (IAMB, Istituto Agronomico Mediterraneo di Bari), izolat OBC 9 uvezen je kao inficirani pup gorke naranče, a 60X kao inficirani pup limuna Eureka te su cijepljeni na agrumske bioindikatore u IJK. Oba izolata daju karakteristične simptome za CVV, ali vrlo različite na različitim bioindikatorima. OBC 9 tako pokazuje prošaranost listova na gorkoj naranči, a 60x na slatkoj naranči mjehuraste i naborane listove (Slika 4).



Slika 4. Karakteristični simptomi zaraze koje uzrokuju izolati virusa šarenila agruma koji su poslužili kao pozitivne kontrole. Izolat OBC 9 uzrokuje na prošaranost lista na gorkoj naranči (lijevo), a izolat 60X (desno) nastanak mjehurastih i naboranih listova limuna (foto. D. Škorić).

Budući da su za testiranje potrebni uzorci mlade kore, odnosno floema iz nje, za uzorke biljnog tkiva su uzimani mladi listovi ili mlade grančice agruma. Biljni materijal poslije uzimanja bio je pohranjen u zamrzivač na temperaturu od -20°C radi očuvanja nukleinskih kiselina. Skalpelom sam odrezala i usitnila koru s grana, a ukoliko su uzorci imali već stariju koru sa čvrstim sklerenhimom tada sam uzimala koru s peteljki mladih listova.

2.2. Osnovne kemikalije

- NP-40 (nonilfenil-polietilen glikol), Fulka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska
- Natrij-deoksikolat, 97%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka
- SDS (natrij-dodecil sulfat), 99%, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Njemačka
- Triton X - 100, Sigma Chemical, SAD
- Boratna kiselina, Kemika, Hrvatska
- Etidijev bromid, Sigma Chemical, SAD
- EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina), Merck, Darmstadt, Njemačka
- Etanol, Kemika, Hrvatska

- 2-merkaptoetanol, Fulka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska
- Kloridna kiselina, Kemika, Hrvatska
- Tris (Tris(hidroksimetil)aminometan), Kemika, Hrvatska
- Litijev klorid, Kemika, Hrvatska
- Izopropanol, Kemika, Hrvatska
- PCR Buffer II, Applied Biosystems, SAD
- MgCl₂ solution, Applied Biosystems, SAD
- Ampli Taq DNA Polymerase, Applied Biosystems, SAD
- RNase Inhibitor, Applied Biosystems, SAD
- MuLV Reverse Transcriptase, Applied Biosystems, SAD
- Agaroza, Sigma Chemical, SAD

2.3. Otopine i puferi

- SB-pufer (20X): 8 g NaOH i 45 g H₃BO₃ otopi se u 1L redestilirane vode
- agarozni gel (1,2%): 600 mg agaroze, 50 ml 1X SB pufera
- otopina etidijeva bromida: 0,1 mg na 1 l redestilirane vode
- obojeni pufer: bromfenol-plavo (BFB) 0,25%, ksilen-cijanol (XC) 0,25%, glicerol 30% u redestiliranoj vodi

2.4. Testiranje na prisutnost CVV-a

Za detekciju virusnih gena primijenila sam metodu RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*), budući da se ona odgovarajuća za detekcije RNA-virusa kojima pripada i CVV. RT-PCR je metoda kojom se na temelju molekula RNA kao kalupa sintetizira njoj komplementarna jednolančana molekula DNA (cDNA) koja se zatim dalje umnožava lančanom reakcijom polimeraze. U usporedbi s imunoenzimskim metodama, RT-PCR bi trebala biti osjetljiviji i specifičniji način otkrivanja ciljanog virusa.

Na nekoliko uzoraka primijenjena je i metoda IC/RT-PCR (*immunocapture* RT-PCR) kojom se virusne čestice, a u njima i virusni genomi, vežu preko specifičnih poliklonskih ili monoklonskih protutitijela na stijenku same epruvete u kojoj se zatim provodi reverzna transkripcija i reakcijski ciklusi lančane reakcije polimerazom.

2.4.1. Izolacija ukupne stanične RNA

Izolaciju virusne RNA koja bi se trebala nalaziti unutar ukupne stanične RNA je postupak koji obično prethodi detekciji virusa metodom RT-PCR jer osigurava kalup za enzimске reakcije koji je dovoljno čist i koncentriran za optimalne rezultate. Ovo je ujedno i kritični korak kod detekcije mnogih biljnih patogena. Virusne RNA sam iz uzoraka izolirala na dva načina; pomoću komercijalnog kompleta kemikalija RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Njemačka) i postupkom koji uključuje uporabu ekstrakcijskog pufera prema nešto prerađenom protokolu opisanom u radu Bennanija i suradnika (2002).

2.4.1.1. Metoda 1 - RNeasy Plant Mini Kit

Od uzorka kore odvagala sam 100 mg tkiva koje sam odmah homogenizirala u tekućem dušiku pomoću tučka i tarionika te ga prebacila u malu plastičnu epruvetu (Eppendorf-epruvetu) od 2 ml prethodno ohlađenu u tekućem dušiku, pazeći da se pri tome tkivo ne odmrzne. Dodala sam 450 µl RLT-pufera i snažno sam vorteksirala (vortex). Zatim je slijedila inkubacija 1-3 minute na 56°C u vodenoj kupelji. Lizate sam odrezanim nastavkom pipetirala u kolonice QIAshredder smještene u Eppendorf-epruvete od 2 ml koje sam potom centrifugirala 2 min na 11000 rpm (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Njemačka). Supernatant sam pipetom prenijela u nove epruvetice pazeći da se ne uzmuti eventualno nastali talog i tome sam dodala 0.5 volumena etanola (96-100%), što je obično iznosilo oko 225 µl, te sam otopinu izmiješala pipetom. Lizate, zajedno s eventualno nastalim talogom, nanijela sam na RNeasy mini-kolone smještene u originalne epruvete od 2 ml koje sam potom centrifugirala 15 sekundi na 11000 rpm. Sadržaj epruvetice sam zatim bacila, a na RNeasy kolonu sam dodala 700 µl RW1-pufera. Nakon ponovnog centrifugiranja od 15 sekundi pri 11000 rpm epruvetu zajedno

sa sadržajem sam bacila, dok sam RNeasy kolonu stavila na novu originalnu epruvetu. Na kolonu sam pipetirala 500 µl RPE-pufera, centrifugirala (15 s/11000 rpm), bacila eluat te ponovo nanijela 500 µl RPE-pufera na kolonu, koju sa opet centrifugirala na 2 minute dok se membrana kolone nije osušila. Za eluciju kolonu sam stavila u novu Eppendorf-epruvetu od 1,5 ml te sam odpipetirala 30 µl RNase-free vode direktno na silika-gel membranu u kolonici. Nakon centrifugiranja (1min/11000 rpm) u epruveti sam dobila izoliranu ukupne stanične RNA.

Eluat se može staviti ponovo na kolonu i centrifugirati kako bi se povećala njegova koncentracija. Inače taj korak se ponavlja s eluatom ili RNase-free vodom, naravno u istu epruvetu ukoliko je očekivani prinos veći od 20 µg.

Sva centrifugiranja odvijala su se pri sobnoj temperaturi (20-25°C). Korišteni puferi dolaze u samom setu RNeasy Plant Mini Kit-a, potrebno je jedino RPE-puferu dodati 4 volumena etanola (95-100%), a RLT-puferu po 10 µl 2-merkaptoetanolu na 1 ml pufera.

2.4.1.2. Metoda 2 izolacije ukupnih RNA (Bennani i sur., 2002)

Uzorak kore od po 200 mg smrznula sam tekućim dušikom i homogenirala u tarioniku. Neke od uzoraka homogenirala sam pomoću uređaja za homogeniranje TissueLyser (Qiagen, USA) tako da sam epruvete (od 2 ml) s uzorcima (200 mg tkiva) smrznula umakanjem u tekući dušik te sam u svaku stavila po jednu čeličnu kuglicu pomoću koje se uzorak homogenirao nakon stavljanja epruvetice u plastični nosač (blok) uređaja koji se trese visokom frekvencijom (3000 rpm) i na taj način usitnjava uzorak smrznutog tkiva. Uređaj sam koristila kod testiranja većeg broja uzoraka odjednom jer su tako svi uzorci bili istovremeno i brzo homogenirani te je spriječena eventualna oksidacija tkiva.

Tablica 2. Sastav puferne otopine potrebne za izolaciju RNA (za 20 ml), (Bennani i sur., 2002).

sastojak	volumen/masa	konačna koncentracija
Tris-HCl, pH 8.5, 1M	4 ml	200 mM
LiCl, 4M	1,5 ml	300 mM
EDTA, 0.5M	0,4 ml	10 mM
SDS, 1,5%	300 mg	300 mg
natrijev deoksikolat	200 mg	1 %
NP-40	0,2 ml	1 %
2-merkaptioetanol	100 μ l	0,5 %
H ₂ O	14,1 ml	-

Homogeniranom tkivu dodala sam po 400 μ l pufera kojeg sam priredila prema Tablici 2. te sam uzorak prebacila u epruvetu od 1,5 ml koju sam zatim centrifugirala 5 minuta pri 11000 rpm. Sva centrifugiranja sam provodila u centrifugi pri 11000 rpm, na uređaju Centrifuge 5804R (Eppendorf, Netheler, Hinz GmbH, Hamburg, Njemačka). Supernatant sam odpipetirala u nove epruvete mjereći mu volumen te sam dodala jednak volumen (1 vol) kalij-acetata (5M, pH 6,5) nakon čega je slijedila inkubacija od 10 minuta na -20°C. Nakon centrifugiranja od 15 minuta supernatant sam odvojila i dodala mu jednak volumen izopropanola (-20°C). Centrifugiranjem (20 minuta) uzoraka nukleinske kiseline su se istaložile na dnu epruveta. Supernatant sam bacila, a kada se talog osušio otopila sam ga u 25 μ l vode, čime sam dobila izoliranu ukupnu RNA.

Metodu izolacije malo sam prilagodila u početnim izolacijama u nedostatku natrijeva deoksikolata i NP-40 za ekstrakcijski pufer te sam ih zamijenila s TritonomX koji također ima ulogu neionskog detergenta.

2.4.2. Sinteza cDNA i umnažanje metodom lančane reakcije polimerazom (RT-PCR)

Sintezu virusne cDNA i njeno umnažanje radila sam prema uputama iz rada Bennani i sur. (2002). Koristila sam reagense za reverznu transkripciju i lančanu reakciju polimerazom tvrtke Applied Biosystems (SAD), a reakcijsku smjesu za RT-PCR sam pripremila prema receptu iz Tablice 3. Ukupni volumen po uzorku iznosio je 25 μ l od čega je 23 μ l bila reakcijska smjesa, a 2 μ l je bila izolirana RNA (kalup).

Tablica 3. Komponente reakcijske smjese za RT-PCR.

SASTOJAK	VOLUMEN/ μ l	KONAČNA KONCENTRACIJA
10 x PCR-pufer	2,5	10 mM Tris-HCl
MgCl ₂ (50mM)	1	2 mM
inhibitor RNaze	0,25	5 U
smjesa dNTP (10mM)	4 x 2	0,4 mM
CVVa-početnica (10 μ M)	1	400 nM
CVV4-početnica (10 μ M)	1	400 nM
reverzna transkriptaza	0,125	6 U
<i>Taq</i> -polimeraza	1	0,5 U
H ₂ O	15,025	-

Reverzna transkripcija i reakcijski ciklusi lančane reakcije polimerazom odvijali su se u uređaju Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems, SAD) prema slijedećem profilu: 30' na 39°C; 2' na 94°C; zatim 35 ciklusa: 30" na 92°C, 45" na 56°C, 1' na 72°C; i na kraju 5' na 72°C. Upotrebene početnice za umnažanje virusnog gena bile su CVVa-početnica 5'-GGA GGA GAT TTG TCT TGA AG-3' i CVV4-početnica 5'-ATG CAC GGC ACC AGT TG-3' (Bennani i sur., 2002), dok je dobiveni umnoženi fragment virusnog genoma bio veličine 624 bp te je obuhvatio cijeli gen za kapsidni protein virusa (*coat protein*, CP).

Uz uzorke sam u reakcijama RT-PCR kao pozitivnu kontrolu uvijek imala i plazmid (razrijeđen 40x) u koji je ugrađen gen za kapsidni protein virusa šarenila agruma (Bennani i sur., 2002). Rekombinantni plazmid pribavljen je ljubaznošću prof. dr. sc. Gustava Nolasca (Sveučilište Algarve, Faro, Portugal).

2.4.3. Kontrola virusne cDNA gel elektroforezom

Pojavljivanje virusnih cDNA provjeravala sam horizontalnom elektroforezom u 1,2%-tnom agaroznom gelu. Gel sam priredila u 1X SB-puferu (Brody i Kern, 2004), kojeg sam koristila i kao elektroforetski pufer. Koristila sam elektroforetske kadice BIO-RAD Wide Mini-Sub Cell GT (BioRad Laboratories Inc, SAD) i Pharmacia LKB GN A100 (Uppsala, Švedska) u koje se mogu smjestiti gelovi dimenzija 10 x 15 x 0,5 cm i 8 x 10,5 x 0,5 cm.

U jažice gela nanosila sam 6 µl PCR-produkta pomiješanog s 2 µl obojenog pufera. Standard za određivanje molekularne mase bio je Marker 9 (Fermentas, Litva) koji sadržava 11 fragmenata dvolančane DNA duljine 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 i 72 bp. Elektroforeza se provodila pri konstantnom naponu od 100 V u periodu od jednog sata pri sobnoj temperaturi.

Nakon elektroforeze agarozni gel sam potopila u etidijev bromid koncentracije 0,1 µl/ml u trajanju od 10 minuta pri čemu je došlo do bojanja razdvojenih DNA-fragmenata što sam nakon ispiranja gela u vodi promatrala UV-transiluminatorom (T2202, Sigma, SAD), a rezultate sam fotografirala ručnom kamerom (GelCam, Polaroid, SAD).

2.4.4. Metoda IC/RT-PCR

2.4.4.1. Priprema protutijela

Razrijedila sam 1000 x monoklonska i poliklonska CVV-protutijela (Invitrogen, SAD) u puferu za oblaganje jažica. U Eppendorf-epruvete od 0,2 ml dodala sam 25 µl razrijeđenih protutijela i inkubirala ih 4 sata na temperature od 37°C. Nevezana protutijela isprala sam iz epruveta pomoću pufera za ispiranje (Tablica 4), 3 puta po 3 minute.

2.4.4.2. Priprema antigena

Biljno tkivo (200 mg) sam homogenirala u ekstrakcijskom puferu napravljenom prema Tablici 4. u omjeru 1:15 (m/v). Nakon centrifugiranja na 5000 rpm 5 minuta u epruvice s vezanim protutijelima dodala sam po 25 μ l supernatanta i sve zajedno inkubirala preko noći pri temperaturi od 4°C. Nakon toga sam ekstrakte isprala puferom za ispiranje (Tablica 4) 3 puta po 3 minute. Četvrto ispiranje napravila sam vodom za PCR (Invitrogen, UK).

Tablica 4. Sastojci za ekstrakcijski pufer i pufer za ispiranje potrebni za 1000 ml H₂O.

ekstrakcijski pufer	pufer za ispiranje	količina
NaCl	NaCl	8,00 g
KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	0,20 g
Na ₂ H PO ₄	Na ₂ H PO ₄	1,15 g
KCl	KCl	0,20 g
NaN ₃	NaN ₃	0,20 g
Tween 20 (Sigma, Njemačka)	Tween 20 (Sigma, Njemačka)	20,00 g
PVP 25 (Fluka, Njemačka)	-	0,5 ml

Nakon navedenih priprema slijedio je RT-PCR. Reverzna transkripcija i reakcijski ciklusi lančane reakcije polimerazom odvijali su se kao i prema već opisanim uputama (Tablica 3), samo što je volumen reakcijske smjese iznosio 25 μ l po uzorku, a ne 23 μ l kao kod običnog RT-PCR-a (23 μ l reakcijske smjese + 2 μ l kalupa).

3. REZULTATI

Svi uzorci agruma dobiveni s terena (Tablica 5), svi uzorci *Citrus wilsonii* Tanaka prikupljeni u stakleniku (Tablica 6) i ostali uzorci zamrznutog tkiva (Tablica 7) podvrgnuti su postupcima koji su imali za cilj izolirati virusne RNA u svrhu detekcije virusa. Na uzorcima *Citrus wilsonii* Tanaka iz staklenika izolacija virusnih RNA izvršena je i RNeasy Mini Plant Kit-om i ekstrakcijskim puferom (Bennani i sur., 2002), no rezultati se u pogledu kvalitete ekstrakata (omjer apsorbancija kod 260 i 280 nm) i koncentracije ukupnih RNA nisu razlikovali (rezultati nisu prikazani).

Kao pozitivne kontrole u postupke ekstrakcije bili su uključeni usporedno i CVV-izolati 60X i OBC 9 (rezultati prikazani niže u tekstu). S njima su provedeni postupci optimizacije protokola za ekstrakciju ukupnih nukleinskih kiselina čiji su rezultati primijenjeni za ekstrakcije ukupnih RNA iz uzoraka s terena.

RT-PCR kojim je moguće otkriti prisutnost gena za kapsidni protein virusa šarenila agruma primijenjen je na jednak način za sve uzorke i pozitivne kontrole (Bennani i sur., 2002). Pozitivna kontrola za odvijanje samog RT-PCR-a (CVV-CP kloniran u plazmid) bila je uključena u svaki eksperiment amplifikacije. Na svim elektroforetskim gelovima pozitivna amplifikacijska kontrola je bila dobro uočljiva. Prikazani su samo neki reprezentativni rezultati tih analiza (Slika 5).

Testirala sam i 4 uzorka mandarine Unshiu (Kuno VU2/20-98, Zorica Rana 9/12-01, Zorica Rana 5/19-01, Zorica Rana 3/21-01) koji su zbog postupka eliminacije CTV-a bili podvrgnuti termoterapiji i svi su bili CVV-negativni. Dobiveni uzorci agruma već su bili u laboratoriju testirani na prisutnost virusa "tristeza" (*Citrus tristeza virus*, CTV) i većina ih je bila pozitivna (usmeno priopćenje D. Škorić), odnosno inficirana virusom "tristeza" (Tablica 5).

Tablica 5. Rezultati testiranih uzoraka agruma s terena na prisutnost virusa šarenila agruma (CVV). Svi uzorci su ranije u laboratoriju testirani i na virus "tristeza" (CTV) i nisu bili dio eksperimentalnog rada u ovom diplomskom zadatku.

lokalitet	uzorak agruma i kultivar*	CTV	CVV
Čibača	naranča Washington Navel	+	-
	mandarina Unshiu	-	-
	mandarina Unshiu elitni	-	-
	mandarina Saigon	-	-
	mandarina Kawano Wase	+	-
	limun Meyer	-	-
	limun Lisbon	-	-
	<i>Citrus medica</i>	-	-
Opuzen	mandarina Zorica Rana	+	-
	mandarina Kawano Wase	-	-
	mandarina Okitsu	-	-
	mandarina Aoshima	-	-
	mandarina Otsu	-	-
	naranča Washington Navel	+	-
	limun Lisbon	+	-
	limun Meyer	+	-
	mandarina Saigon	-	-
	mandarina Kuno	+	-
	mandarina Chahara	+	-
	naranča Skaggs Bonanza	+	-
	grejp Natzu Mikan	-	-
Opuzen	Limun Lisbon	-	-
	grejp Natzu Mikan	-	-
	naranča Skaggs Bonanza	-	-
	naranča Washington Navel	+	-
	mandarina	-	-
	mandarina Kuno	-	-
	mandarina Saigon	-	-
	mandarina Clementine	-	-
	mandarina Okitsu	-	-
	mandarina Chahara	-	-
	mandarina 70/7	-	-
	mandarina 73/6	-	-
Prud	mandarina Clementine	-	-
	mandarina Zorica Rana	+	-
Komin	mandarina Clementine	-	-
	grejp March Seedless	-	-
	mandarina Chahara	-	-
Kaštel Štafilić	grejp Guljripški	+	-
	grejp Hasaku	-	-
	mandarina Ichimaru	+	-
	mandarina Seto	+	-
	mandarina Zorica Rana	+	-
Bužinija	mandarina	-	-
	limun	-	-
	naranča	-	-
Brijuni	gorka naranča	-	-
	grejp	-	-

lokalitet	uzorak agruma i kultivar*	CTV	CVV
Brijuni	mandarina Clementine 103	+	-
	mandarina Clementine 104	-	-
	mandarina Clementine 105	+	-
	mandarina Clementine 106	+	-
	mandarina Clementine 107	-	-
	mandarina Clementine 108	+	-
	mandarina Clementine 109	-	-
	mandarina Clementine 110	-	-
Mala Neretva	mandarina 1	+	-
	mandarina 10	-	-
	mandarina 16	+	-
	mandarina 22	+	-
	mandarina 32	+	-
	mandarina 41	+	-
	mandarina 50	+	-
	mandarina 60	+	-
	mandarina 65	+	-
	mandarina 69	+	-
	mandarina 72	+	-
	mandarina 74	+	-

*Ukoliko kultivar agruma nije naveden, nije bio poznat pri uzimanju uzorka.

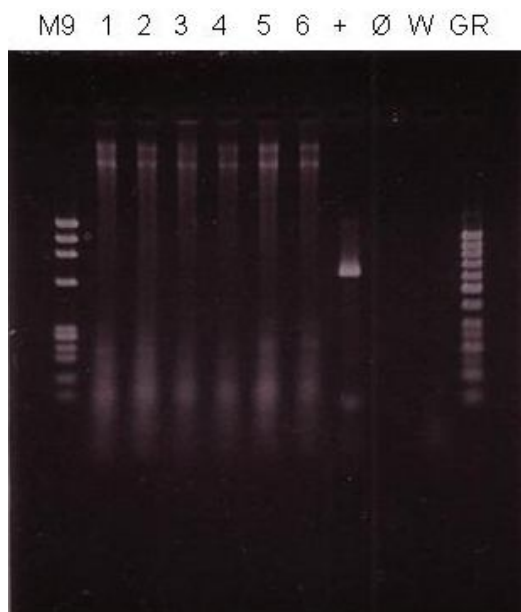
Tablica 6. Rezultati uzoraka agruma *Citrus wilsonii* Tanaka iz staklenika Biološkog odsjeka PMF-a testiranih na virus šarenila agruma (CVV).

oznaka uzorka	simptomi	CVV
1	veća biljka, kloroza listova	-
2	patuljasta biljka, mali listovi, kloroza, nabori lista	-
3	patuljasta biljka, više nabora na lišću, mladi listovi bez kloroze	-
4	veća biljka, nepravilan rub lista, nabori oko vene, mladi listovi bez kloroze	-
5	patuljasta biljka, nabori lista	-
6	biljka srednje veličine, kloroza, nabori lista	-
7	patuljasta biljka, kloroza listova, malo naborani	-
8	patuljasta biljka, malo kloroze na listovima	-
9	patuljasta biljka, malo kloroze na listovima	-

Tablica 7. Rezultati uzoraka agruma iz smrznutog tkiva testiranog na virus šarenila agruma (CVV).

oznaka uzorka	vrsta <i>Citrus</i>	kultivar	lokalitet	simptomi na polju	CVV
E9	<i>C. limon</i>	Lisbon	Sutivan, Brač	-	-
4	<i>C. unshiu</i>	Chahara	Stombrata	-	-
6	<i>C. sinensis</i>	Skaggs Bonanza	-	-	-
Fu	<i>C. sinensis</i>	Fukumoto Navel	Kaštel Štafilić	jamičavost drva	-
S4	<i>C. unshiu</i>	Ichimaru	Stombrata	-	-
ZR	<i>C. unshiu</i>	Zorica Rana	kolekcijski nasad IJK	-	-
A4	<i>C. limon</i>	Lisbon	Komiža, Vis	-	-
Z1	<i>C. limon</i>	Zorica Rana	Komiža, Vis	-	-
A1	<i>C. limon</i>	Eureka	Komiža, Vis	-	-
1	<i>C. sinensis</i>	Sanguinella	Komiža, Vis	jamičavost drva	-
S2	<i>C. unshiu</i>	Chahara	Stombrata	kržljivost stabla	-
B1	<i>C. unshiu</i>	Chahara	Seget Donji	-	-
S5	* <i>Fortunella sp.</i>	-	Stombrata	-	-
STV	<i>C. limon</i>	Lisbon	Sutivan, Brač	-	-
1	<i>C. limon</i>	Lisbon	Korčula	-	-

* *Fortunella* (kumkvat) je agrum izvan roda *Citrus*.



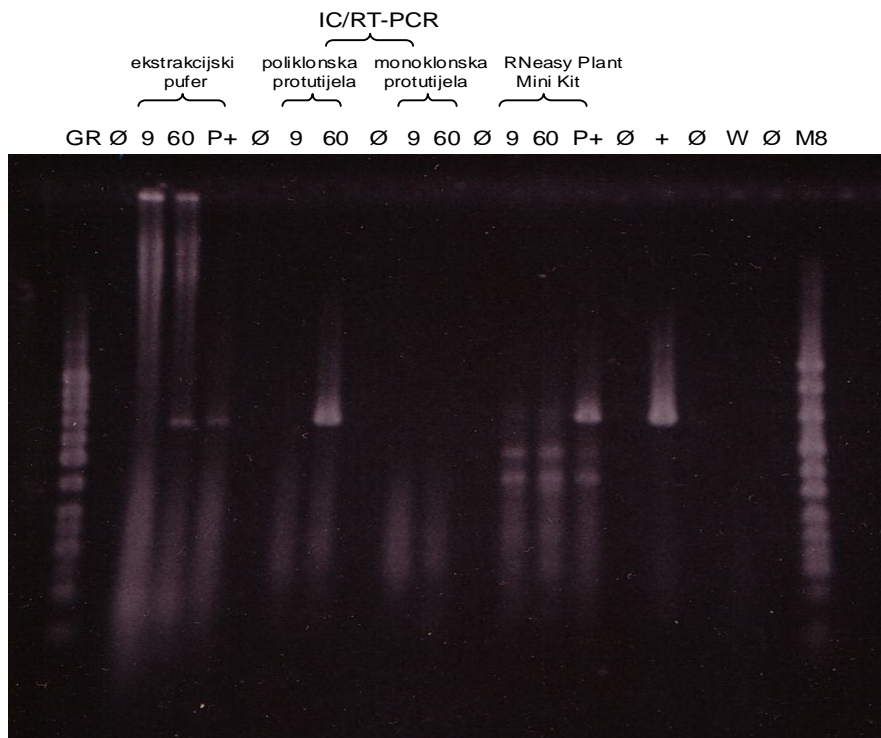
Slika 5. Rezultati umnažanja gena virusa šarenila agruma (CVV) metodom RT-PCR iz uzoraka mandarine Unshiu: 1- Kuno Vu2/20-98; 2-Zorica Rana 9/12-01(1); 3-Zorica Rana 9/12-01(2); 4-Zorica Rana 5/19-01(1); 5-Zorica Rana 5/19-01(2); 6-Zorica Rana 3/21-01; (+) - pozitivna kontrola CVV-a (plazmid s ugrađenim genom za kapsidni protein virusa), Ø-prazna jažica; W-uzorak s vodom umjesto kalupa; molekularni DNA-standardi M9 (Marker 9, Fermentas, Litva) i GR (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva).

Posebna pozornost je u ovome radu bila posvećena dvama uzorcima koji su bili uvedeni u pokuse kao pozitivne tkivne kontrole za detekciju CVV-a. Osim navedenih načina ekstrakcije virusnih nukleinskih kiselina primijenjenih na uzorke s terena, kod njih je primijenjena i metoda IC/RT-PCR.

Uzorak limuna *Citrus limon* (L.) Burm. F. cv. Eureka (CVV 60X) je u prijašnjim testiranjima ELISA-testom u IAMB-u dao zbunjujuće rezultate (u nekim pokusima pozitivan, a u drugima negativan rezultat) na prisustvo CVV-a, dok je RT-PCR-test bio uvijek negativan (K. Djelouah, usmeno priopćenje). U ovom istraživanju pozitivan rezultat za CVV 60X dobiven je samo kod primjene IC/RT-PCR-a s poliklonskim protutijelima, ali negativan s monoklonskih protutijelima. Kod testiranja RT-PCR-om

dobiven je pozitivan rezultat detekcije CVV-a samo kad se izolacija RNA vršila ekstrakcijskim puferom (Bennani i sur., 2002), dok je kod izolacije RNeasy Plant Mini kit-om rezultat i dalje bio negativan. Ujedno to je jedini uzorak koji je bio pozitivan na CVV u ovom radu (Slika 6).

Drugi virusni kontrolni uzorak iz tkiva agruma, gorka naranča *Citrus aurantium* L. (CVV OBC 9), dosad je u IAMB-u bila testirana samo ELISA-testom gdje je bila pozitivna na CVV (K. Djelouah, usmeno priopćenje). U ovom radu kontrolni uzorak OBC 9 nije dao pozitivne rezultate ni IC/RT-PCR-om ni RT-PCR-om, neovisno o načinu izolacije virusne RNA. Za taj uzorak izvela sam i reamplifikaciju dobivenih produkata, za slučaj da je amplikon nastao, ali da zbog niske koncentracije DNA nije vidljiv nakon bojanja etidij-bromidom u elektroforetskom gelu, no i dalje je rezultat bio negativan.



Slika 6. Uzorci 9- CVV OBC 9; 60 - CVV 60X; P+ - pozitivna kontrola CVV-a korištena u prijašnjim istraživanjima dr. K. Djelouaha; (+) - pozitivna kontrola CVV-a (plazmid); Ø- prazna jažica; W-uzorak s vodom umjesto kalupa; molekularni DNA-standardi M9 (Marker 9, Fermentas, Litva) i GR (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas, Litva).

Tablica 8. Rezultati testiranja na virus šarenila agruma (CVV) virusnih izolata 60x i OBC 9 uvedenih u pokuse kao potencijalne pozitivne tkivne kontrole za detekciju CVV-a

metoda		60x	OBC 9
istraživanja IAM-Bari	ELISA	+/-	+
	RT-PCR	-	∅
IC/RT-PCR	poliklonska protutijela	+	-
	monoklonska protutijela	-	-
RT-PCR	RNeasy Plant Mini Kit	-	-
	puffer sa NP-40 i Na-deoxycholatom	+	-

Nakon primjene dviju različitih metoda izolacije ukupnih nukleinskih kiselina iz nekih uzoraka agruma prikazanih ovdje, te detekcije gena za kapsidni protein CVV-a primjenom metode RT-PCR na svim ekstraktima nukleinskih kiselina, zaključno se može reći da uzorci agruma dobiveni s terena (Tablica 5), uzorci *Citrus wilsonii* Tanaka prikupljeni u stakleniku (Tablica 6) i ostali uzorci zamrznutog tkiva (Tablica 7) nisu pokazali prisutstvo CVV-a.

4. RASPRAVA

Istraživanja prisutnosti virusa kod agruma može se provoditi različitim laboratorijskim metodama. Od seroloških primijenjuju se DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich ELISA*) i DTBIA (*Direct Tissue Immunoblotting Assay*), a od ostalih su najčešće primijenjivane RT-PCR i IC/RT-PCR (Dietzgen, 2002). Za detekciju CVV-a obično se primjenjuju metode ELISA i RT-PCR, no na uzorcima prikupljenima u Grčkoj su provedena istraživanja i metodom molekularne hibridizacije „dot-blot“ (Barbarossa i sur., 2007). PCR-metoda je generalno gledajući $10^2 - 10^5$ puta osjetljivija od ELISA-testova te nam omogućuje ranu detekciju virusne infekcije prije nego što se simptomi očituju ili kod asimptomatičnih biljaka. Tako je npr. detekcija CTV-a PCR-om moguća tijekom cijele godine, dok istovjetna primjena ELISA-testa nije moguća, budući da je koncentracija virusnih čestica čiji epitopi se otkrivaju potonjim testom preniska za detekciju u nekim periodima (Dietzgen, 2002). Metoda IC/RT-PCR ujedinjuje značajke serološkog testa i RT-PCR-a, sa svim njihovim prednostima i nedostacima, zbog „hvatanja“ virusnih čestica putem specifičnih protutijela vezanih na unutrašnju stijenku epruvete u kojoj će se kasnije metodom RT-PCR detektirati dio virusnog genoma. Stoga je odabir odgovarajuće metode detekcije virusa vrlo važan temelj za istraživanje njegove pojavnosti i rasprostranjenosti, a pogotovo je značajno odabrati najbolja metodološka rješenja kad se neki virus u određenom okruženju istražuje po prvi puta.

Budući da su agrumski domaćini drvenaste i dugovječne biljke, negativni rezultati istraživanja prisutnosti virusa kod njih, ne samo da ovise o odabiru odgovarajućih laboratorijskih postupaka, već mogu biti povezani s niskom koncentracijom virusa u dijelu biljke uzetom za testiranje. Često se pogrešno pretpostavlja da je titar virusa koji inficiraju biljku-domaćina jednolik unutar biljke, ali to se događa vrlo rijetko. Na detekciju virusa agruma osim njihove rasprostranjenosti i titra unutar zaražene biljke utječe i starost tkiva i doba godine tj. vegetacijski period u kojem se uzima tkivo zaraženog agruma. Prema istraživanju Davina i suradnika (1988) koje se izvodilo kroz period od jedne godine, CVV je detektiran na uzorcima zaraženih limuna kontinuirano u periodu od travnja do srpnja u mladim grančicama (do 1 godine starosti), peteljka i

listovima (mladi i srednje stari), iako je većina sakupljenih listova tijekom ljeta bila bez simptoma zaraze. CVV nisu detektirali u korijenu, ali jesu u nekoliko cvjetova i plodova, te po prvi puta u sjemenu. Daljnjim istraživanjem na limunu Volkamer, otkriveno je da čak do 90% sjemena zaraženih biljaka može biti pozitivno na CVV. Prijenos virusa sjemenom nije tako čest, no kod agruma je zabilježeno nekoliko takvih virusa (npr. *Citrus psorosis virus*, CPsV). No CVV, iako prisutan u sjemenu, ne prenosi se na novu biljku ovim putem. Od 600 testiranih klijanaca dobivenih iz zaraženog sjemena niti jedna nije bila pozitivna na CVV, vrlo vjerojatno iz razloga što CVV ne može inficirati embrio (Davino i sur., 1991). U ovom radu po prvi puta su u Hrvatskoj iskušane metode za laboratorijsku detekciju CVV-a što je zahtijevalo optimizaciju eksperimentalnih postupaka zbog uvođenja u laboratorijsku praksu, ali i zbog specifičnosti mandarine kao najzastupljenijeg agruma u našem uzgoju. Uzorci tkiva su uzimani tijekom cijelog vegetacijskog razdoblja uz izbjegavanje najtoplijeg perioda u kojem se inaktivira virus u biljkama, no prikupljanje uzoraka nije bilo sustavno i opetovano (više puta godišnje iz iste biljke), tako da i u ovom dijelu procesa ima mjesta za poboljšanja. Biološko testiranje komplementiralo bi ovo istraživanje koje se oslanja samo na laboratorijske metode. Testove na agrumskim indikatorima (Roistacher, 1991) nije praktično provoditi kad se radi o probiru (*screening*), odnosno istraživanju pojavnosti virusa na cijelom području zemlje, te stoga i nisu bili provedeni, no biotestovi na zeljastom indikatoru crvenom bubrežastom grahu provedeni su naknadno i predmet su već obranjenog diplomskog rada (Celinščak, 2007).

U uvođenju laboratorijskih testova detekcije važno je riješiti problem pozitivnih kontrola ukoliko se one ne mogu pribaviti na komercijalan način. Stoga su pribavljeni uzorci tkiva za koje se smatralo da mogu poslužiti kao pozitivne tkivne kontrole u detekciji CVV-a. S uzorcima tkiva izolata 60x i OBC 9, već opisanima u prethodnim poglavljima, u stakleniku IJK u Splitu provedeni su biološki testovi na agrumskim indikatorima (Slika 4) i utvrđeno je da bi se prema sindromima na različitim agrumskim indikatorima moglo raditi o sojevima CVV-a (usmeno priopćenje, K. Hančević). No svakako je za te izolate trebalo laboratorijski identificirati viruse, a pogotovo kad se imaju na umu literaturni podaci i proturječni rezultati koje su u takvim prethodno provedenim istraživanjima dobivali talijanski kolege iz IAM-Bari (usmeno priopćenje, K.

Djelouah). Primjerice, istraživanja provedena u Turskoj, uz primjenu metode ELISA, na uzorcima agruma od kojih su svi imali tipične simptome zaraze CVV-om pokazala su da je samo 26% uzoraka doista inficirano ovim virusom tako da nije uočena čvrsta povezanost između simptoma zaraze i rezultata ELISA-testiranja. Razlog takvih rezultata može biti u niskom titru virusa, degradaciji biljnog tkiva zbog visoke temperature prilikom sakupljanja uzoraka, ili se radi o zarazi nekim drugim virusom, ili čak kombinacijom virusa koji su mogli uzrokovati slične simptome kao CVV (Yilmaz i Baloglu, 2002).

Iz navedenih razloga je s izolatima 60X i OBC 9 bila provedena ekstrakcija ukupnih nukleinskih kiselina primjenom komercijalnog kompleta kemikalija (RNeasy Plant Mini Kit) i laboratorijskog protokola koji se pokazao uspješnim na nekim agrumskim uzorcima (Bennani i sur., 2002). Izolacija komercijalnim kompletom je brza i već oprobana metoda kojom se iz drvenastih domaćina ne izolira uvijek dovoljna koncentracija RNA odgovarajuće kvalitete. Ekstrakcijski postupak Bennanija i suradnika (2002) je jeftinije rješenje, no iziskuje nešto više vremena po uzorku. RT-PCR detekcija dijela virusnog genoma iz navedenih ekstrakata pokazala je da je komercijalni komplet kemikalija loše rješenje za ekstrakciju ukupnih nukleinskih kiselina i dokazivanje CVV-a metodom RT-PCR jer u toj kombinaciji eksperimentalnih koraka nije dobiven pozitivan rezultat iz izolata 60X, a kod primjene laboratorijskog protokola za ekstrakciju nukleinskih kiselina jest (Tablica 8, Slika 6). Stoga su kod svih daljnjih istraživanja nukleinske kiseline izolirane primjenom navedenog protokola, no povremeno smo i dalje paralelno primjenjivali komercijalni komplet kako bi iskoristili do kraja taj resurs i pohranili još više ekstrakata nukleinskih kiselina za iduća istraživanja viroida i drugih virusa agruma.

Nadalje, primjena metode IC/RT-PCR za dokazivanje CVV-a iz izolata 60X i OBC 9 pokazala se prihvatljivom ukoliko se upotrijebe poliklonska protutijela (Tablica 8). No, ova metoda je upravo zbog toga nešto skuplja, pa se odustalo od njene dalje primjene u istraživanju pojavnosti CVV-a u Hrvatskoj. Rezultati koje smo dobili njenom primjenom za potencijalne tkivne pozitivne kontrole, izolate 60X i OBC 9, potvrdili su da se jedino izolat 60X može smatrati pouzdanom pozitivnom CVV-kontrolom u

laboratorijskim testovima (Tablica 8, Slika 6) što je u skladu s rezultatima talijanskih kolega (usmeno priopćenje, K. Djelouah).

RT-PCR je kao metoda detekcije CVV-gena primijenjena u postupku budući da je osjetljivija od ELISA-testa te omogućuje detekciju virusne infekcije pri manjoj koncentraciji virusnih čestica. Može se zaključiti da je sama metoda RT-PCR bila uspješna budući da je pozitivna kontrola za CVV (CVV-CP kloniran u plazmid) na svim gelovima bila dobro uočljiva (Slike 5, 6) što znači da su se lančane reakcije polimerazom uspješno odvijale. Također je pri izvedbi elektroforetske analize PCR-produkata u agaroznom gelu istraženo može li se u analitičke svrhe uspješno primijeniti izvedba s tzv. SB-puferom (Brody i Kern, 2004). Pokazalo se da se puferskim sistemom u kojem nema Tris-a dobivaju dobri rezultati uz povećanje ekonomičnosti analize i dobrobiti za okoliš.

Virusi i viroidi su uzročnici ozbiljnih biljnih bolesti koje u pravilu štetno utječu na kvalitetu i kvantitetu plodova. U Turskoj gdje se nalazi 70% proizvodnje agruma na području zapadnog Mediterana uočen je do 40% manji urod agruma u usporedbi sa ostalim mediteranskim zemljama upravo zbog zaraženosti nasada raznim virusima i viroidima (Çinar i sur., 1993). CVV najčešće ne utječe značajno, za razliku od virusa tristeza primjerice, na sam razvoj zaraženih agruma i na njihovu produktivnost u vidu kvalitete i kvantitete plodova (D'Onghia i Lacirignola, 1998). Kod naših agruma u ovom radu nije dokazana prisutnost CVV-a u uzorcima s terena, no niti u onima iz kolekcijskog nasada IJK, no zaraženost virusom tristeza (Tablica 5, Škorić i sur., 2002; Černi i sur., 2005) je ozbiljan i perzistirajući problem. Virusne bolesti nije moguće liječiti kao gljivične ili bakterijske bolesti biljaka te je jedini način njihovog sprečavanja proizvodnja bezvirusnog tj. certificiranog sadnog materijala.

Što se tiče inaktiviranja CVV-a, no i u našem slučaju važnijeg CTV-a, Roistacher i Calavan (1974) su uspjeli toplinskim tretmanom na temperaturi 28-40°C u trajanju od 3-4 mjeseca inaktivirati CVV, CTV, CPsV (*Citrus psorosis virus*) i uzročnike gumoze (*concave gum*). Daljnja razrada tehnike termoterapije i mikrocijepljenja u svrhu eliminacije virusa i viroida kod agruma trebala bi rezultirati ozdravljanjem zaraženog biljnog materijala što je osnovni korak za dobivanje predosnovnog i osnovnog sadnog materijala predviđenog certifikacijskim programom, čime bi se dobio certificirani reprodukcijski materijal agruma.

Rad na ozdravljivanju zaraženog biljnog materijala je dugotrajan proces. U Hrvatskoj su dobivene prve biljke mandarine Unshiu kultivara Zorica Rana oslobođene od tristeza-virusa, inače uzročnika najopasnije i najrasprostranjenije virusne bolesti agruma. Postupak eliminacije virusa tristeza kod biljaka mandarine Unshiu (*Citrus unshiu* Marc., engl. *Satsuma mandarin*), kultivara Zorica Rana proveden je primjenom tehnike cijepjenja vegetacijskog vrška na bezvirusni sjemenjak podloge Troyer Citrange u kombinaciji s termoterapijom (na temperaturi od 32°C u trajanju od tri mjeseca) te se pokazao kao djelotvorna metoda, a uspješnost eliminacije CTV-a potvrđena je laboratorijskim testovima, ELISA i IC/RT-PCR (Hančević, 2005). Eliminacija virusa tristeza iz mandarine Unshiu kultivara Kuno također je provedena te je nakon kultiviranja mikrocijepjenih biljaka i adaptacije na stakleničke uvjete, virus eliminiran iz 42% zaraženih biljaka kultivara Kuno (Hartl-Musinov i sur., 2006). Sudeći prema preliminarnim rezultatima dobivenima u ovom radu, navedeni kultivari mandarina oslobođeni su i od virusa šarenila agruma.

5. ZAKLJUČAK

- Provedenom molekularnom detekcijom CVV-a po prvi puta je istražena prisutnost CVV-a na vrstama naših agruma.
- Izolacija virusne RNA ekstrakcijskim puferom (Bennani i sur., 2002) pokazala se prikladnom, budući da je dosljedno dobivan pozitivan rezultat RT-PCR-om izolata korištenog kao tkivna pozitivna kontrola (CVV60x), a i jeftinija je metoda od RNeasy Plant Mini Kit-a. Dodatno pojeftinjenje postupka elektroforetske analize amplikona postignuto je primjenom pufera koji ne sadržava Tris (Brody i Kern, 2004), a takav postupak bolji je i za okoliš.
- Na 2 uzorka koja su u istraživanje uvedena kao potencijalne tkivne pozitivne CVV-kontrole (60X i OBC 9) metodom IC/RT-PCR uz primjenu poliklonskih protutijela potvrđeni su rezultati postupaka dokazivanja CVV-a uvedenih ovdje iz kojih se zaključuje da samo izolat 60X može poslužiti kao pozitivna CVV-kontrola.
- Svi uzorci testirani uzorci agruma nakon izolacije ukupnih nukleinskih kiselina i provedenog RT-PCR-a bili su negativni na prisutstvo CVV-a neovisno o metodi izolacije ukupnih nukleinskih kiselina.

6. LITERATURA

- Bakarić P. (1983) Uzgoj mandarine Unšiu. Stanica za južne kulture, Dubrovnik.
- Barbarossa L., Loconsole G., Vovlas C. (2007) Virus and virus-like diseases of citrus in Epirus. *Journal of Plant Pathology* 89, 273-276.
- Bennani B., Celso Mendes C., Zemzami M., Azeddoug H., Nolasco G. (2002) Citrus variegation virus: molecular variability of a portion of the RNA 3 containing the coat protein gene and design of primers for RT-PCR detection. *European Journal of Plant Pathology* 108, 155-162.
- Bernard L., Duran-Vila N. (2006) A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes* 20, 105-113.
- Brody J. R., Kern S. E. (2004) Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* 36, 214-216.
- Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson L., Zurcher E. J. (ur.) (1996 onwards). *Plant Viruses Online: Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Version: 20th August 1996.
- Celinščak, M. (2007) Rasprostranjenost virusa šarenila agruma u Hrvatskoj, diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Çinar C., Kersting U., Önelge N., Korkmaz S., Sas G. (1993) Citrus virus and virus-like diseases in the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Proceedings of the 12th IOCV Conference, Riverside, University of California*, 397-400.
- Čemi S., Škorić D., Krajačić M., Gatin Ž., Santos C., Martins V., Nolasco G. (2005) Occurrence of stem-pitting strains of *Citrus tristeza virus* in Croatia. *Plant Disease* 89, 342.
- Čemi S. (2009) Doktorska disertacija: Molekularna varijabilnost i populacijska struktura hrvatskih izolata virusa tristeza (*Citrus tristeza virus*). Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Davino M., Areddia R., Garnsey S. M. (1988) Distribution of citrus variegation virus within citrus host. *Proceedings of the 10th IOCV Conference, Riverside, University of California*, 322-326.

- Davino M., Areddia R., Pelicani L., Grimaldi V. (1991) Indexing of seeds of different citrus species for tristeza and variegation viruses. Proceedings of the 11th IOCV Conference, Riverside, University of California, 368-372.
- Dietzgen R. G. (2002) Application of PCR in plant virology. In: Plant viruses as molecular pathogens. Khan J. A., Dijkstra J. (ur.). Food Products Press, The Haworth Press Inc., USA, 471-501.
- D'Onghia A.-M., Lacirignola C. (1998) Major virus and virus-like diseases of citrus in the Mediterranean. U: Options Méditerranéennes Series B, N° 21, Proceedings of the Mediterranean network on certification of citrus 1995-1997. Martelli G. P., D'Onghia A. M. (ur.). CIHEAM-IAMB, Bari. 5-10.
- Državni zavod za statistiku [DZS] (2011). *Priopćenja 2003-2010*. Državni zavod za statistiku Republike Hrvatske, Zagreb.
- EPPO (1995) EPPO standards: Certification schemes, Pathogen-tested citrus trees and rootstocks PM 4/12(1). EPPO Bulletin 25, 737-755.
- ICTVdB Management (2006). 00.010.0.02.007. Citrus variegation virus. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (ur.), Columbia University, New York, USA.
- Gatin Ž. (1992) Ugrožen unikatni genofond agruma u Hrvatskoj. Hrvatski voćarski glasnik, Zagreb, 1, 10-13.
- Gatin Ž., Tabain F., Adamič F., Plamenac M., Bakarić P., Kaleb M. (1983). Sortiment citrusa i pitanja introdukcije. Jugoslovensko voćarstvo, Čačak, 17, 61-70.
- Hančević K. (2005) Magistarski rad: Eliminacija virusa tristeza (*Citrus tristeza virus*) iz primjeraka vrste *Citrus unshiu* Marc. 'Zorica Rana'. Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
- Hartl-Musinov D., Hančević K., Rošin J., Gatin Ž. (2006). Indeksiranje i eliminacija virusa tristeza iz mandarine Unshiu (*Citrus unshiu* Marc.) cv. Kuno. Pomologia Croatica 12, 285-294.
- Ito T., Ieki H., Ozaki K. (2002) Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 106, 235-239.
- Juretić N. (2002) Osnove biljne virologije. Školska knjiga, Zagreb.

- Li W., Adkins S., Hilf M. E. (2008) Characterization of complete sequences of RNA1 and RNA2 of citrus variegation virus. *Archives of Virology* 153, 385-388.
- Navarro L. (1993) Citrus sanitation, quarantine and certification programs. Proceedings of the 12th IOCV Conference, Riverside, University of California, 383-395.
- Roistacher C. N., Calavan E. C. (1974) Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glass-house temperatures. *Plant Disease Reporter* 58, 850-853.
- Roistacher C. N., Nauer E. M., Wagner R. L. (1980) Transmissibility of cachexia, dweet mottle, psorosis, tatterleaf and infectious variegation viruses on knife blades and its prevention. Proceedings of the 8th IOCV Conference, Riverside, University of California, 225-229.
- Roistacher C. N. (1991) Infectious variegation and leaf rugose. A handbook for detection and diagnosis of graft-transmissible diseases of citrus. IOCV/FAO, Rome, 107-114.
- Roistacher C. N. (1995) Historical review of the major graft-transmissible diseases of Citrus. FAO, Rome, 40-43.
- Roistacher C. N. (2004) Diagnosis and Management of virus and virus like diseases of citrus. In: Diseases of fruits and vegetables: diagnosis and management Volume 1, S. A. M. H. Naqvi (ur.), Kluwer Academic Publishers, 109-191.
- Roossinck, M. J., Bujarski, J., Ding, S. W., Hajimorad, R., Hanada, K., Scott, S. and Tousignant, M., *Index of Viruses - Bromoviridae* (2006). U: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C. (ur.), Columbia University, New York, USA.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_index.htm
- Rošin J., Hančević K., Radunić M. (2009) Predosnovni matični nasad agruma. *Pomologia Croatica* 15, 129-140.
- Roy A., Fayad A., Barthe G., Brlansky R. H. (2005) A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. *Journal of Virological Methods* 129, 47-55.
- Scott S. W., Ge X. (1995) The complete nucleotide sequence of RNA3 of citrus leaf rugose and citrus variegation ilarvirus. *Journal of General Virology* 76, 957-963.

- Škorić D., Krajačić M., Hartl M., Gatin Ž. (2002) The past and the present of citrus certification in Croatia. U: Options Méditerranéennes Series B, N° 43, Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. D'Onghia A. M., Djelouah K., Roistacher C. N. (ur.).CIHEAM-IAMB, Bari, 45-47.
- Wallace J. M. (1978) Virus and virus-like diseases. U: The citrus industry Vol. 4., Reuther W., Calavan E. C., Carman G. E. (ur.), University of California, Richmond, 67-184.
- Yilmaz M.A., Baloglu S. (2002) Elisa detection of Citrus infectious variegation virus (CVV) in the Eastern Mediterranean region of Turkey. U: Options Méditerranéennes Series B, N° 43, Proceedings of the Mediterranean research network on certification of citrus (MNCC): 1998-2001. D'Onghia A. M., Djelouah K., Roistacher C. N. (ur.).CIHEAM-IAMB, Bari, 61-62.
- Zakon o sjemenu, sadnom materijalu i priznavanju sorti poljoprivrednog bilja (2005). Narodne novine 140/05.