

## Nazočnost virusa u maslinicima Hrvatske

Presence of viruses in Croatian olive groves

**Bjeliš, M., Loconsole G. i Saponari M.**

### SAŽETAK

Tijekom 2005. i 2006. godine, prvi puta u Hrvatskoj je provedeno testiranje biljnog materijala masline na prisutnost virusa. Uzorci za testiranje su sakupljeni na tradicionalnim maslinarskim područjima iz komercijalnih nasada masline, na dvadeset i pet lokaliteta. Uzorci su testirani na prisutnost osam vrsta virusa: ArMV, CMV, CLRV, OLV-1, OLV-2, OLRV, OLYaV i SLRV.

Rezultati analiza provedenih primjenom RT-PCR metode, potvrdili su nazočnost virusa na oko 25 % uzoraka, a ukupno je potvrđena nazočnost četiri vrste virusa: OLYaV - Olive leaf yellowing-associated virus, CMV - Cucumber mosaic virus, OLV-2 - Olive latent virus 2 i SLRV – Strawberry latent ringspot virus.

Nazočnost virusa CMV je utvrđena na uzorcima sorata Istarska bjelica i Lastovka, SLRV na sortama Levantinka i Oblica, OLV-2 na sorti Lastovka, te OLYaV na sortama Bjelica, Istarska bjelica, Lastovka i Levantinka. Uzorci sorata Buža, Perišićeva mastrinka i Rosulja bili su negativni na nazočnost virusa.

Ključne riječi: CMV, maslina, OLV-2, OLYaV, SLRV, virusi.

### ABSTRACT

During the years 2005 and 2006, testing of the olive plant material on the presence of olive viruses was conducted for the first time in Croatia. The samples for testing were collected from twenty five locations in commercial olive orchards, from traditional olive growing areas. All samples were tested on the presence of eight virus types: ArMV, CMV, CLRV, OLV-1, OLV-2, OLRV, OLYaV and SLRV.

The results of analyses conducted by using the RT-PCR method, confirmed the presence of viruses in 25% of samples, and four virus types were confirmed: OLYaV - Olive leaf yellowing-associated virus, CMV - Cucumber mosaic virus, OLV-2 - Olive latent virus 2 and SLRV – Strawberry latent ringspot virus.

Presence of CMV was confirmed on Istarska bjelica and Lastovka samples, SLRV was confirmed on Levantinka and Oblica samples, OLV-2 was confirmed on Lastovka samples, OLYaV was confirmed on Bjelica, Istarska bjelica, Lastovka and Levantinka samples. Samples of Buža, Perišićeva mastrinka and Rosulja cultivars were free from tested viruses.

Key words: CMV, olive, OLV-2, OLYaV, SLRV, Viruses.

## UVOD

Maslina je nesumnjivo domaćin velikog broja virusa, od kojih je do sada poznato trinaest koji pripadaju različitim rodovima (Martelli i Gallitelli 1985). Simptomi nazočnosti virusa su različiti, a najčešće se radi o promjeni boje lista prema žutoj u obliku mrlja, ukupnog bljedila lista, slabljenje ili odumiranje dijela ili cijelog stabla masline. Nadalje, poznati su simptomi fascijacije mladica (izgled podsjeća na dvije slijepljene mladice), grbavosti ili deformacija na plodovima. Međutim, biljke bez simptoma prisutnosti virusa su još češći slučaj. Neki od navedenih simptoma su uočeni i u našim maslinicima (Bjeliš 2005), a njihova je nazočnost često povezivana s problemima ishrane.

Posljednjih godina je postignut značajan napredak u smislu dijagnostike virusnih infekcija i otkrića prenosioca (Marteli i Prota 1997). Ove spoznaje su osobito značajne u rasadničkoj proizvodnji, u smislu korištenja i puštanja u promet repromaterijala (upotreba sjemenjaka, reznica, okulanata) odgovarajućeg zdravstvenog stanja, čime je moguće spriječiti daljne širenje uzročnika bolesti.

Utvrđeno je nekoliko načina prenosa virusa na maslinu kao domaćina. Pet vrsta virusa koji se razvijaju na maslini mogu se prenositi tlom (putem nematoda i gljivica) ili izravno kroz rane na korijenu, a neki se virusi prenose polenom. Poznato je da nepovirusi i cucumovirusi mogu zaraziti sjeme, isto predstavlja dodatnu mogućnost širenja (Martelli i Gallitelli 1985). Iako je kod nas manje zastupljena, upotreba sjemenjaka u rasadničarskoj proizvodnji velikih maslinarskih zemalja Sredozemlja, još uvijek predstavlja značajan udio u razmnožavanju, a uvoz iz tih područja svakako predstavlja opasnost od unošenja uzročnika virusnih bolesti iz navedenih rodova.

Virusi na maslini su izolirani iz različitih biljnih dijelova (Marteli i Prota 1997). Tako su CLRV i OLV1 utvrđeni u TNA izoliranoj iz cvijeta, i to u ekstraktima cijelog cvijeta, a oba virusa su izolirana i nakon mehaničkog prijenosa sa cvijeta masline. U sjemenu je utvrđena je nazočnost vrsta CLRV i OLV-1 virusa u visokom postotku. Štoviše, dokazana je nazočnost OLV-1 u stanicama budućih kotiledona i endospermi, te prisutnost CLRV na embriju.

Rezultati istraživanja virusnih bolesti na sjemenjacima masline pokazali su, da u razdoblju od stadija dikotiledona do stadija tri razvijena lista, nije moguće utvrditi nazočnost virusa. Kasnije tijekom faze razvoja četiri do pet listova, zbog niske koncentracije virusa u staničju, moguće je u malom postotku utvrditi nazočnost CLRV i OLV-1. Najviše pozitivnih rezultata moguće je zabilježiti na sjemenjacima nakon 7-8 mjeseci.

Nazočnost većine vrsta virusa koji se razvijaju na masline je prvi put utvrđena u Italiji, a kasnije su provedena istraživanja i u drugim maslinarskim zemljama svijeta i na Sredozemlju.

Nazočnost virusa OLRSV (olive latent ringspot nepovirus), na maslini je prvi puta utvrđena u Italiji, u okolici Lacija 1983. godine. Prirodni domaćin ovog virusa je rod *Olea* spp., a može biti nazočan i na vrstama iz porodica Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Solanaceae. Virus se može prenositi mehanički, tj. cijepljenjem u rasadničkoj proizvodnji. Ovaj virus ne pokazuje simptome prisutnosti na maslini.

OLV-1 (olive latent 1 sobemovirus) je prvi put pronađen u južnoj Italiji, (Apulia) 1985. godine. Virus se može prenositi mehanički, tj. cijepljenjem u rasadničkoj proizvodnji. Prirodni domaćin ovog virusa je rod *Olea* spp., a može biti prisutan i na vrstama iz porodica Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Solanaceae, Oleaceae. Ovaj virus ne pokazuje simptome prisutnosti na maslini.

OLV-2 (olive latent 2 ourmiavirus) je prvi put pronađen u južnoj Italiji (Apulia) 1984. godine. Prirodni domaćin ovog virusa je rod *Olea* spp., a može biti prisutan i na vrstama iz porodica Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae, Solanaceae, Oleaceae. Ovaj virus ne pokazuje simptome prisutnosti na maslini.

CLRV (cherry leaf roll nepovirus) prvi je put pronađen na *Ulmus* spp., *Prunus* spp. i *Juglans* spp. vrstama. Na vrstama *Olea europaea*, *Rumex obtusifolius*, *Berteroa incana*, *Delphinium elatum* ovaj virus ne pokazuje simptome prisutnosti. Može se prenositi trima nematodama roda *Xiphinema* spp. i mehanički, tj. cijepljenjem. Osobito je značajna prisutnost vrste *Xiphinema diversicaudatum*, vektora ovog virusa. Ovaj se virus ne prenosi kontaktom između biljaka. Rasprostranjen je na području Euroazije, Australije, Kine, Turske, Novog Zelanda itd. Domaćini su mu vrste iz preko 36 porodica.

Kompleks virusa OLYaV i OYMDaV, koji uzrokuje žućenje lišća je prvi put pronađen 1995. (OYMDaV) i 1998. (OLYaV) u Italiji. Karakteristični simptomi prisutnosti navedenih virusa su pojava jednoličnog žućenja lišća, grane oboljelih biljaka se slabije razvijaju, a nakon nekog vremena slijedi pojava nekroze vršnog lišća i defolijacija pojedinih grana, te ukupno slabljenje i stagniranje porasta biljke. Kod prisutnosti OLYaV redovito se javljaju početni simptomi žućenja nervature na listovima, dok je kod OYMDaV u početku češća pojava žutih mrlja po listu (Beaino i sur. 2005).

Iako se prvi podatci o nazočnosti SLRV ( Strawberry latent ring spot virus - Virus kvrgavosti plodova) virusa spominju 1979. godine, značajnija pojava u Italiji je utvrđena 1986. na području Umbrije, prvo na sorti Ascolana tenera, a zatim i na sortama Roggirole, Frantoio i dr. Ovaj virus je polifagan i značajna je

štetočinja drugih kultiviranih biljaka. Prenose ga nematode, osobito iz roda *Xiphinema* spp., a posebno vrsta *Xiphinema diversicaudatum*, najznačajniji vektor ovog virusa.

Zaražene biljke pokazuju simptome deformacija na lišću koje se nalazi na grančicama zakrivljenog oblika, moguće gušćih internodija. Krošnja oboljelih stabala maslina je gusta i zbijena, te poprima oblik grma. Osnovne grane mogu biti izdužene, a sekundarne imaju pendulast rast. Plodovi su izduženi i kvrgavi, asimetričnog oblika, te mogu podsjećati na plod lješnjaka. Zaražene biljke slabije rastu. Poznati su primjeri da u zaraženim maslinarskim zonama s populacijom maslina koje pokazuju simptome ove viroze, ova pojava se pogrešno tumači i pripisuje joj se status lokalnog ekotipa neke sorte.

OLRV i TMV (virus blijeđenja i kloroze nervature i virus mozaika duhana) je kompleks virusa koji uzrokuje klorozu nervature. Simptomi nazočnosti su vidljivi tijekom vegetacije, kada dolazi do žućenja cijele biljke, iza kojeg slijedi propadanje vegetativnog porasta.

## MATERIJALI I METODE

**Lokaliteti:** Uzorci biljnog materijala su sakupljeni na obalnom i otočnom području Hrvatske sa sljedećih lokaliteta: Bačina, Banići, Biograd, Brgat, Brsečine, Čara, Doli, Drage, Gradac, Gornje Selo-Šolta, Igrane, Kaštel Stari, Lumbarda, Makarska, Milna na Braču, Nečujam, Novigrad, Poljica, Poreč, Potirna, Prigradica, Primošten, Raba, Rovinj, Slano, Supetar, Sutivan i Umag. Ukupno je sakupljeno 45 uzoraka. Uzorkovanje biljnog materijala je provedeno u privatnim maslinicima starosti preko dvadeset godina, u kojima se provode redovite agrotehničke mjere.

**Uzimanje uzoraka:** Uzimanje uzoraka je provedeno tijekom prve polovice svibnja. Uzorak se sastojao od 4 do 5 mladica, koje u naravi predstavljaju bazalni dio jednogodišnje mladice masline sa listovima, dužine oko 10-15 cm. Mladice su stavljene u pvc vrećice uz dodatak pamučne vate namočene vodom, označene i pospremljene u hladnjak na temperaturu od °C.

**Analiza uzoraka:** Analiza nazočnosti virusa je provedena u suradnji s Dipartimento di Protezione delle Piante, Università degli Studi di Bari and Istituto di Virologia Vegetale del CNR, sezione di Bari. Analiza uzoraka je provedena primjenom dot-blot hibridizacije TNA za detekciju ArMV, CLRV, SLRV, OLRV, OLV-1, OLV-2, i mini dsRNA za detekciju OLYaV. TNA je ekstrahirana iz 100 mg tkiva kore maldice, mikrokromatografijom uz upotrebu silicijskih dijelova (Foissac i sur. 2000), denaturirana u 100 ml NaOH i 5 mM EDTA i postavljena na membranu (Hybond N+, Amersham) za dot-blot hibridizaciju (Saponari i sur. 2001a). Mini dsRNA je ekstrahirana iz 100 mg

tkiva kore u otopini pufera (STE 2X, 0.2% Sodium metabisulfite, 1% SDS) miješanjem 5 minuta, a zatim tretirana fenol-kloroformom 15 minuta. dsRNA je pročišćena mikrokromatografijom uz upotrebu celuloze CF 11 (20 mg/ml) i izdvojena (Saponari i sur. 2001b). Nakon toga je razrijeđena i postavljena na membranu za dot-blot hibridizaciju. Specifične riboprobe za svih osam virusa su provedene korištenjem DIG RNA kita za markiranje (Roche). Prehibridizacija i hibridizacija su provedene na 58°C slijedeći upute proizvođača - Dig Nucleic Detection kit (Roche).

## REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati analize uzoraka na pristnost virusa potvrdili su nazočnost virusa na oko 25 % uzoraka, a ukupno je potvrđena nazočnost četiri vrste virusa: OLYaV - Olive leaf yellowing-associated virus, CMV - Cucumber mosaic virus, OLV-2 - Olive latent virus 2 i SLRV – Strawberry latent ringspot virus.

Nazočnost virusa je utvrđena na području Dubrovačko-nerevanske (4 pozitivnih uzoraka), Splitsko-dalmatinske (9 pozitivnih uzoraka) i Istarske županije (3 pozitivna uzorka), dok na području Šibensko-kninske i Zadarske županije nije utvrđena (Tablica 1).

**Tablica 1: Lokaliteti na kojima je analizom utvrđena nazočnost virusa.**

**Table 1: Locations where analysis confirmed presence of viruses.**

	ArMV	SLRV	CLRV	OLV1	OLV2	OLRV	CMV	OLYaV	Ukupno Total
Baćina	-	+	-	-	-	-	-	-	1
Brgat	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Brsečina	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Umag	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Novigrad	-	-	-	-	-	-	+	+	2
Čara	-	-	-	-	-	-	-	+	1
G.Selo	-	-	-	-	-	-	-	+	1
K.Stari	-	++	-	-	+	-	+	++++	8
Ukupno Total		3			1		2	10	16

*Legenda/Legend:*

ArMV = *Arabis mosaik virus*, CLRV = *Cherry leafroll virus*, SLRV = *Strawberry latent ringspot virus*, OLV-1 = *Olive latent virus 1*, OLV-2 = *Olive latent virus 2*, OLRV = *Olive latent ringspot virus*, CMV = *Cucumber mosaic virus*, OLYaV = *Olive leaf yellowing associated virus*, „+“ pozitivan uzorak/ positive sample, n, „+“ (n) pozitivnih uzoraka/ positive samples, „-“ negativan uzorak/ negative sample

Među četrdeset i pet uzoraka sakupljenih na dvadeset i pet lokaliteta na kojima su uzimani uzorci, na osam lokaliteta je analizom utvrđena nazočnost virusa. Uočeno je da postoje razlike među lokalitetima i među raširenosti pojedinih vrsta virusa. Tako je na lokalitetu Kaštel Stari utvrđena nazočnost sve četiri vrste virusa, a od ukupnog broja pozitivnih nalaza, polovica otpada na ovaj lokalitet. Na lokalitetu Novigrad utvrđena je nazočnost dvije vrste virusa, dok je na ostalim lokalitetima utvrđena nazočnost samo jedne vrste. Nadalje, najzastupljeniji je virus OLYaV, čija je nazočnost utvrđena u deset uzoraka.

Postoje razlike među istraživanim sortama masline u odnosu na broj utvrđenih vrsta virusa. Tako je na sorti Lastovka utvrđena nazočnost OLV-2, CMV i OLYaV, a od ukupnog broja pozitivnih uzoraka, pet uzoraka se odnosilo na virus OLYaV. Na sorti Levantinki, utvrđena je nazočnost SLRV i OLYaV, na Istarskoj Bjelici CMV i OLYaV, na Bjelici OLYaV, te na Oblici SLRV. Na sortama Buža, Leccino, Perišićeva mastrinka i Rosulja, nije utvrđena nazočnost virusa (Tablica 2).

Nadalje, razvidan je veliki broj pozitivnih uzoraka na lokalitetu Kaštel Stari i pronalazak sve četiri vrste virusa na ovom lokalitetu, u odnosu na druge lokalitete gdje je u svim slučajevima utvrđena nazočnost samo jedne vrste, s iznimkom lokaliteta Novigrad, gdje je utvrđena nazočnost dvije vrste.

**Tablica 2: Sorte masline na kojima je analizom utvrđena nazočnost virusa.**

**Table 2: Olive cultivars where analysis confirmed presence of viruses.**

	SLRV	OLV2	CMV	OLYaV	Ukupno pozitivnih uzoraka Total no. of positive samples
Bjelica	-	-	-	++	2
Buža	-	-	-	-	0
Istarska bjelica	-	-	+	++	3
Lastovka	-	+	+	+++++	7
Leccino	-	-	-	-	0
Levantinka	++	-	-	+	3
Oblica	+	-	-	-	1
P.mastrinka	-	-	-	-	0
Rosulja	-	-	-	-	0

*Legenda/Legend:*

*SLRV = Strawberry latent ringspot virus, OLV-2 = Olive latent 2 virus, CMV = Cucumber mosaic virus, OLYaV = Olive leaf yellowing associated virus,*

*„+“ pozitivan uzorak/ positive sample, n, „+“ (n) pozitivnih uzoraka/ positive samples,*

*„-“ negativan uzorak/ negative sample*

Ovakvi rezultati se mogu protumačiti geografskim položajem ovog žarišta, koje se prije svega nalazi u zoni intenzivnog kretanja biljnog materijala. Nadalje, do sada nisu provedene analize nazočnosti virusa na sadnom materijalu masline u Hrvatskoj, niti prilikom uvoza istog (Bjeliš 2005).

Također, valja spomenuti da je na području Splitsko dalmatinske Županije maslinarstvo u posljednjih nekoliko desetljeća predstavljalo pokretačku snagu razvoja maslinarstva u Dalmaciji. Na to se područje slijevala velika količina sadnica novih sorata iz cijelog Sredozemlja, koje su se kasnije zbog dobrih gospodarskih svojstava umnožavale i širile.

Veliki napredak u rasadničarskoj proizvodnji masline na Sredozemlju je proizvodnja bezvirusnog sadnog materijala (Martelli 1999, Martelli i sur. 1995). U Italiji i Španjolskoj se već proizvodi certificirani bezvirusni materijal uglavnom autohtonog sortimenta, pa je i kod nas moguće očekivati nove zahtjeve u proizvodnji sadnog materijala masline, poglavito autohtonog podrijetla. Istraživanjima utvrđena nazočnost virusa na oko 25% uzoraka uglavnom sorata autohtonog podrijetla, potvrđuje mogućnost i potrebu nastavka istraživanja u pravcu pronalaženja nezaraženih stabala autohtonih sorata masline i njihovog daljnjeg korištenja za reprodukciju.

## ZAKLJUČCI

Rezultatima analize vegetativnog materijala masline na nazočnost virusa u Hrvatskoj je utvrđeno sljedeće:

- Analizom je utvrđena nazočnost virusa na oko 25% uzoraka,
- Među osam istraživanih vrsta, potvrđena je nazočnost četiri vrste virusa i to: OLYaV, CMV, OLV-2 i SLRV,
- Unutar pozitivnih uzoraka, najveći broj se odnosi na OLYaV (10 uzoraka), te manje na ostale vrste, SLRV ( 3 uzorka), CMV (2 uzorka) i OLV-2 (1 uzorak),
- Utvrđena je razlika u prostornoj rasprostranjenosti vrsta. Sve četiri vrste virusa su utvrđene samo na lokalitetu Kaštel Stari, gdje je utvrđen i najveći broj pozitivnih uzoraka.

## LITERATURA

BEAINO T. EL., M. SAPONARI, A. MINAFRA, M. A.CASTELLANO, V.SAVINO I G. P. MARTELLI (2005): Further characterization of Olive leaf yellowing associated virus. *Jurnal of Plant Pathology* no83, 223-228.

- BJELIŠ M., (2006): Testiranje maslina na prisutnost virusa. Maslina, Časopis za maslinarstvo i uljarstvo Godina 3, br. 11, str. 60-61.
- FOISSAC X., SVANELLA-DUMAS L., GENTIT P., DULUCQ M.J., CANDRESSE T., (2000) : Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested rt-pcr using degenerated and inosine containing primers (pdo rt-pcr). Acta Horticulturae (ISHS) 550: 37-40.
- MARTELLI G. P., (1999): Infectious diseases and certification of olive; an overview. Bulletin OEPP/EPPO Buletin, 29: 127-133.
- MARTELLI G. P. I D GALLITELLI, (1985): Virosi dell'olivo. Italia Agricola, 122, 150-156.
- MARTELLI G. P. I U. PROTA, (1997): Malattie e patogeni del olivo trasmessi col materiale di propagazione. In: La certificazione del materiale vivaistico, indirizzi per l'olivo. I.Georgofili, Quanderni 1997-II, 73-96.
- MARTELLI G. P., V.SAVINO, I. CATALANO, B. DI TERLIZZI, S. SABANADZOVIC I N. GRECO, (1995): Viruses and certification of olive in Apuglia (Southern Italy). Acta Horticulturae, 386, 569-573.
- SAPONARI M., GRIECO F., PANTALEO A., SAVINO V., MARTELLI G.P., (2001a): produzione di reagenti molecolari per la diagnosi dei virus dell'olivo. Acts of Project POM A32, Volume II, 799-808, Locorotondo (Ba), 4-7 dicembre.
- SAPONARI M., EL BEAINO T., GRIECO F., SAVINO V., MARTELLI G.P., (2001b): Diagnosi dei virus dell'olivo mediante l'impiego degli RNA a doppia elica. Acts of Project POM A32, Volume II, 793-798, Locorotondo (Ba), 4-7 dicembre.

**Adrese autora – Authors's address:**

Dr.sc. Mario Bjeliš  
Zavod za zaštitu bilja u poljoprivredi i šumarstvu RH,  
Zvonimirova 14 A, 21210 Solin,  
e-mail: mario.bjelis@zzb.hr

**Primljeno – received:**

Loconsole G. i Saponari M.  
Dipartimento di Protezione delle Piante,  
Università degli Studi di Bari and Istituto di Virologia Vegetale del CNR,  
Via Amendola 165 / A, 70126 Bari, Italy