

Pojavnost ekonomski značajnih virusa kod sorte Lasina (*Vitis vinifera* L.)

Šimetić, Eni

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:261810>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**Pojavnost ekonomski značajnih virusa kod sorte
Lasina (*Vitis vinifera* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Eni Šimetić

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

**Pojavnost ekonomski značajnih virusa kod sorte
Lasina (*Vitis vinifera* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Eni Šimetić

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Eni Šimetić**, JMBAG 0269132469, rođena 26.12.1999. u Rijeci, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**POJAVNOST EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA KOD SORTE LASINA (*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 studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Eni Šimetić**, JMBAG 0269132469, naslova

**POJAVNOST EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA KOD SORTE LASINA (*Vitis
vinifera* L.)**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Darko Vončina mentor
2. prof. dr. sc. Edi Maletić član
3. doc. dr. sc. Domagoj Stupić član

ZAHVALA

Ovim putem najprije želim izraziti iskrenu zahvalnost svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Darku Vončini, na neizmjernom razumijevanju i velikoj dozi strpljenja koju mi je pružio tijekom izrade diplomskog rada. Njegova podrška i vođenje bili su ključni za moj uspješan napredak.

Također, želim zahvaliti svojoj obitelji, roditeljima i bratu, na neopisivoj podršci koju su mi pružali tijekom cijelog školovanja. Bez njihove ljubavi i potpore, ne bih bila u mogućnosti ostvariti svoje ciljeve.

Hvala Vam svima što ste bili uz mene na ovom putovanju obrazovanja i što ste vjerovali u mene. Vaša mi je podrška bila beskrajno važna i ponosno dijelim svoj uspjeh s Vama.

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Pregled literature	3
2.1. Vinova loza – <i>Vitis vinifera</i> L.	3
2.1.1. Sorta Lasina	5
2.2. Bolesti vinove loze	7
2.3. Virusne bolesti vinove loze	9
2.3.1. Virus mozaika gušarke	10
2.3.2. Virus lepezastog lista vinove loze	12
2.3.3. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1 i 3	13
2.4. Klonska i zdravstvena selekcija vinove loze	15
2.5. Serološke metode detekcije biljnih virusa – metoda ELISA.....	17
3. Materijali i metode	19
3.1. Materijali	19
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Priprema uzoraka i provedba metode ELISA	21
4. Rezultati	24
5. Rasprava	29
6. Zaključci	32
7. Popis literature	33
7.1. Popis mrežnih stranica	36
8. Životopis	37

Sažetak

Diplomskog rada studentice Eni Šimetić, naslova

Pojavnost ekonomski značajnih virusa kod sorte Lasina (*Vitis vinifera* L.)

Vinova loza kao najraširenija voćna kultura ima dugu povijest uzgajanja. U skorijoj povijesti otkriveni su i proučavani virusi koji mogu inficirati vinovu lozu. Ekonomski je značajno manji broj virusa, ali zaraženost njima ima drastične posljedice na vinovu lozu. U ovom radu istražena je pojava četiri ekonomski značajna virusa vinove loze na sorti Lasina. Uzorci su uzeti za vrijeme mirovanja vegetacije s bazalnog dijela trsa u obliku 2-3 dobro odrvenjele rozgve dužine 10 – 15 cm. Uzorci su prikupljeni na glavnom uzgojnom području sorte Lasina (lokacije Plastovo, Promina, Suhovare i Badanj). Testiranje je provedeno metodom ELISA i to na viruse infektivne degeneracije (virus mozaika gušarke – ArMV i virus lepezastog lista vinove loze - GFLV) te viruse iz skupine uvijenosti lista vinove loze (uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1 i 3, GLRaV-1 i GLRaV-3). Provedenim istraživanjem u kojem je testirano ukupno 120 trsova sa 4 lokacije nije potvrđena prisutnost ArMV, ali je utvrđena prisutnost ostalih virusa obuhvaćenih istraživanjem. Najzastupljeniji virus je bio GLRaV-3, koji je utvrđen u 84,17% uzoraka. U nešto manjoj zastupljenosti pronađen je GLRaV-1 (28,33%) te GFLV (5,83%). Osim pojedinačnih zaraza utvrđena je učestala pojava mješovitih zaraza s dva ili tri virusa obuhvaćenih istraživanjem, pri čemu su najučestalije bile kombinacije GLRaV-1+GLRaV-3 (22,5%) te GLRaV-3+GFLV (4,16%). Provedeno istraživanje ukazuje na narušeno zdravstveno stanje sorte Lasina u pogledu zaraženosti virusima i potrebu za intenziviranjem rada na njezinoj klonskoj i zdravstvenoj selekciji.

Ključne riječi: ekonomski značajni virusi, vinova loza, Lasina, ELISA

Summary

Of the master's thesis – student Eni Šimetić, entitled

Occurrence of economically important viruses in variety Lasina (*Vitis vinifera* L.)

The grapevine, as the most widespread fruit crop, has a long history of cultivation. In recent history, viruses that can infect grapevines have been discovered and studied. Economically, the number of viruses is significantly lower, but infection with them has drastic consequences on the grapevine. In this study, the occurrence of four economically important grapevine viruses on the variety Lasina was investigated. The samples were taken during the dormancy from the basal part of each vine in the form of a 2-3 well-wooded cuttings 10-15 cm long. The samples were collected from main growing area of the variety Lasina (locations Plastovo, Promina, Suhovare and Badanj). Testing was carried out using the ELISA method for infectious degeneration viruses (arabis mosaic virus - ArMV and grapevine fanleaf virus - GFLV) and viruses from the leafroll complex (grapevine leafroll-associated virus viruses 1 and 3, GLRaV-1 and GLRaV -3). The conducted research in which a total of 120 vines from 4 location were examined, the presence of ArMV was not confirmed, but the presence of other viruses included in the research was determined. The most prevalent virus was GLRaV-3, which was found in 84,17% of samples. GLRaV-1 (28,33%) and GFLV (5,83%) were found in slightly lower abundance. In addition to individual infections, a frequent occurrence of mixed infections with two or three viruses included in the research was found, with the most frequent combinations being GLRaV-1+GLRaV-3 (22,5%) and GLRaV-3+GFLV (4,16%). The conducted research indicates the impaired health of the Lasina variety in terms of virus infection and the need to intensify work on its clonal and sanitary selection.

Keywords: economically important viruses, grapevine, Lasina, ELISA

1. Uvod

Vinova loza je jedna od najrasprostranjenijih kultura koja se uzgaja širom svijeta, posebno u područjima s povoljnim klimatskim uvjetima. Prvobitno se vinova loza nalazila u divljini, no otprilike 6000 godina prije Krista, ljudi su počeli prepoznavati potencijal ove biljke (Lesinger, 2006). Hrvatska, sa svojom umjerenom klimom, kako kontinentalnom tako i mediteranskom, idealno je područje za uzgoj vinove loze. Unutar vinogradarskih regija u Hrvatskoj utvrđeno je čak 130 autohtonih sorti, iako značajan udio u proizvodnji zauzimaju introducirane sorte. Različiti se dijelovi vinove loze mogu iskoristiti, uključujući lišće, vitice i cvjetove u ljekovite te prehrambene svrhe, ali glavni razlog uzgoja vinove loze je zbog grožđa, koje se najčešće koristi za proizvodnju vina (Andabaka, 2015).

Sorta Lasina, iako nije veoma raširena, ima važnost u Dalmatinskoj zagori. Ima potencijal za širenje na većim površinama, ali potrebno je podići svijest javnosti o njezinim karakteristikama i prednostima, prvenstveno stabilnim i redovitim prinosisima. Područje pod ovom crnom sortom zauzima manju površinu u usporedbi s popularnijim sortama poput Merlota, ali očuvanje ove autohtone hrvatske sorte je i dalje važno. Međutim, njezin uzgoj uvelike otežavaju bolesti, uključujući gljivične, bakterijske i virusne infekcije. Gljivične bolesti se svake godine suzbijaju u različitom obimu, ovisno o godišnjim klimatskim uvjetima, dok se kod virusnih bolesti suočavamo s izazovima prevencije jer jednom zaražena biljka ne može biti izliječena. Među najzastupljenijim i najdestruktivnijim virusima vinove loze ubrajaju se virusi naboranosti drveta, infektivne degeneracije, uvijenosti lista vinove loze i pjegavosti lista vinove loze. U Republici Hrvatskoj, stanje širenja ovih virusa nije dovoljno istraženo, pa je potrebno uložiti dodatne resurse kako bi se omogućilo certificiranje i proizvodnja čistog sadnog materijala (Maletić i sur., 2015).

Ukratko, ekonomski isplativa proizvodnja grožđa i vina suočava se s brojnim izazovima, a među njima su i virusi. Vinova loza je domaćin mnogim virusima, a za njihovu kontrolu važno je poznavanje zdravstvenog statusa sorata u proizvodnim nasadima (Andret-Link i sur., 2004). Osim toga, Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja u Hrvatskoj postavlja stroge zahtjeve za testiranje sadnog materijala vinove loze na prisutnost virusa (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2020). Virusne infekcije predstavljaju ozbiljan izazov u proizvodnji vinove loze, i stoga je važno provesti kontinuirana istraživanja kako bi se razumjelo širenje i utjecaj ovih virusa na vinogradarsku industriju (Gomez Talquenca i sur., 2023).

1.1. Cilj rada

Cilj rada je utvrditi pojavnost virusa mozaika gušarke, virusa lepezastog lista vinove loze te uvijenosti lista vinove loze pridruženih virusa 1 i 3 kod sorte Lasina u njezinim glavnim uzgojnim područjima.

2. Pregled literature

2.1. Vinova loza – *Vitis vinifera* L.

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) biljka iz porodice lozica (*Vitaceae*), smatra se trajnom penjačicom koja u prirodi može doseći veličinu do 20 metara. Rezidbom se u uzgoju ne dopušta rast u beskraj već se ograničava najčešće na 2 do 3 metara, ali može biti i više i manje. Vinova loza kao plod daje grožđe koje može biti različite veličine, oblika, boje; odnosno drukčijih olfaktornih i vizualnih karakteristika (Parihar i Sharma, 2021). Porijeklo vinove loze smatra se Zapadna Azija, područje oko Kavkaza i Kaspijskog jezera (Aghbali i sur., 2013), a još se 6000 prije nove ere uzgajala u Egiptu. Iz Egipta preko Grčke dolazi do Rima odakle se počinje širiti Europom. Vino, nastalo kao sekundarni produkt vinove loze, smatra se pićem hrabrih (Lesinger, 2006). Vinova loza, odnosno vino, usko je povezano sa Kršćanstvom; poslovi i obaveze u vinogradu prate religiju. Svi važniji radovi u vinogradu koherentni su sa crkvenim blagdanima, stoga se na dan Svetog Vinka prvi put u godini posjećuje vinograd, zatim strah od „ledenih svetaca“ započinje sa Svetim Filipom i završava sa Svetom Sofijom. U tom razdoblju loza kreće sa kolanjem sokova i vrlo je osjetljiva na mraz. Berba grožđa počinje sa danom Svetog Mihaela i najčešće traje do dana Svete Terezije. Nakon toga mošt vrije do dana Svetog Martina (Lesinger, 2006).

Vinova loza je brzorastuća biljka koja se uzgaja u svim područjima umjerene klime, zbog tolike rasprostranjenosti nastale su razne sorte. Smatra se da je opisano oko 10 000 sorti vinove loze, dok je u Hrvatskoj čak 130 autohtonih sorata (Bučar, 2008), a jedna od njih je i sorta Lasina. Sagledavajući vinovu lozu općenito, biljka je dugovječni grm s jakim, dubokim i dobro razvijenim korijenom. Korijen najčešće prodire do 3 metara u dubinu, ali u pojedinim slučajevima može i dublje, pa čak i do 10 – 12 metara (Lesinger, 2006). Kora se na stablu trsa ljušti uzdužno. Iz starog stabla izlaze mlađe izbrazdane grane smeđe-sive ili tamnocrvene boje koja ovisi o sorti (slika 2.1.1). Ti izdanci dalje razvijaju jednogodišnje zelene mladice sa žutim ili crvenim pigmentima koje na jesen odrvene. Mladice se pomoću vitica pridržavaju za različite konstrukcije (Bučar, 2008).



Slika 2.1.1. Trs vinove loze

Izvor: <https://www.agroklub.com/vinogradarstvo/lipanj-je-vrijeme-za-optrgavanje-vinove-loze-prvo-krenite-s-rajskim-rizlingom/68963/> (pristupljeno 12.8.2023.)

Grožđe je primarni produkti vinove loze i prvenstveno se uzgaja zbog plodova. Listovi su važan organ vinove loze; zelene su boje, a naličje im je prekriveno vunanim dlačicama, no kod nekih je sorata golo. Imaju od tri do pet jače izraženih žila koje dijele list, a može biti slabije ili jače razdijeljen (slika 2.1.2.). Rubovi lista su nazubljeni i ovisno o sorti mogu biti različitih oblika; okrugli, jajasti, scoliki (Lesinger, 2006). Lišće vinove loze se nerijetko koristi u medicini zbog svojih antigljivičnih, antivirusnih, protuupalnih te ostalih karakteristika. Često se koristi kao prehrambeni sastojak ili kao dodatak prehrani (Fernandes i sur., 2013).



Slika 2.1.2. Slabije (lijevo) i jače (desno) razdijeljen list

Izvor: <https://ovinu.info/prepoznavanje-sorti-grozdja/> (pristupljeno 18.9.2023.)

Cvat vinove loze čini skup cvjetova složenih u grozd, a oblikuje se u zimskim pupovima. Cvatovi su smješteni na mladici koja je na koljencu nasuprot lista (slika 2.1.3.). Cvatnja započinje kada se dnevne temperature kreću između 10 °C u jutarnjim satima i do 25 °C u popodnevnim satima, ali kada krene u cvatnju to traje 10 – 20 dana (Mirošević, 1996).



Slika 2.1.3. Cvat i grozd nasuprot listu

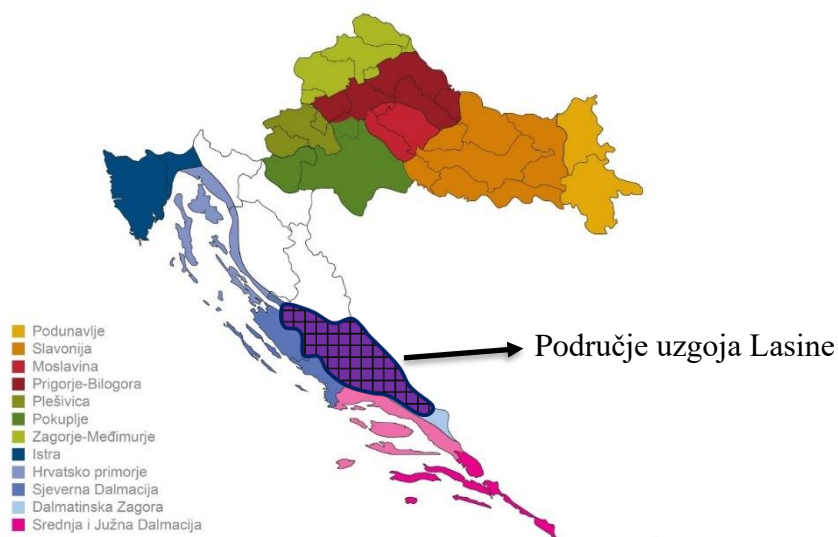
Izvor: https://www.newworldencyclopedia.org/entry/File:Vigne_inflorescence_2.jpg (pristupljeno 12.8.2023.)

Berbom grožđa započinje se krajem kolovoza i traje do početka listopada. U današnje se vrijeme uzgaja na tisuće različitih sorti vinove loze; veći broj sorti je lokalnog značaja, dok je tek nekoliko sorti gospodarski značajno na globalnoj razini. Sorte vinove loze dijele se na stolne i vinske sorte. Daleko više je vinskih sorti koje se dalje dijele na bijele i crne. Kod vinskih sorti postoji neformalna podjela prema kvaliteti vina koja se od njih dobivaju (Martelli, 2014).

2.1.1. Sorta Lasina

Sorta Lasina lokalnog je karaktera i nije poznata široj populaciji. Naime, Hrvatska ima četiri vinogradarske regije, a sorta Lasina uzgaja se u regiji Dalmacija. Uzgoj sorte Lasina bazira se na podregiju Dalmatinska zagora, no može se je u nešto manjem broju naći i u ostalim podregijama Primorske regije. Sorta Lasina naziva se još i Krapljenica, Zlarinština, Zlarina, Kuć mali, Pošipanj; autohtona je Hrvatska sorta koja je implementirana na Nacionalnu listu priznatih kultivara vinove loze gdje je uvedena kao preporučena sorta za podregije Sjeverna Dalmacija i Dalmatinska zagora (Ministarstvo poljoprivrede, 2020).

Na području podregije Dalmatinska zagora, sorta Lasina vrlo je cijenjena što se može zaključiti po staroj uzrečici „*Nema vina do Lasina*“ koja je i dalje aktualna u govoru mještana (Andabaka, 2015), ali svejedno nije se proširila van određenog područja. Prema Vinogradarskom registru kojeg vodi Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju, 2015. godine bilo je svega 12 hektara površine vinograda pod sortom Lasina na području Republike Hrvatske, dok je primjerice sorte Babić bilo na više od 180 hektara ili pak sorte Merlot na oko 260 hektara. Iako Lasina nije najzastupljenija, odnosno najbrojnija sorta, gospodarski je vrlo važna na području podregije Dalmatinska zagora (slika 2.1.1.1.) gdje je uz sortu Plavina najznačajnija crna sorta (Andabaka, 2015).



Slika 2.1.1.1. Područje Dalmatinske zagore i uzgoja sorte Lasina

Izvor: <https://www.cimerfraj.hr/slike/zajednica/vinski-turizam-hrvatska-vinske-regije.jpg> (pristupljeno 15.8.2023.)

Lasina je sorta koja daje grožđe crne boje; nije poznata kod većeg broja potrošača zato što se tradicionalno u procesu proizvodnje vina, grožđe ove sorte uglavnom miješa s nekim drugim sortama. Odlika ove sorte je nakupljanje velike količine šećera u mesu bobica tijekom dozrijevanja, ali slabijeg nakupljanja antocijana u kožici (Maletić i sur., 2015). Zbog toga su vina proizvedena od Lasine često nedovoljno obojena. Često se grožđe Lasine koristi kao osnova pri izradi desertnih vina (Vračar, 2011). Zreli grozd (slika 2.1.1.2.) poprima oblik lijevka srednje zbijenosti i veličine, a bobice su blago jajastog oblika. Kožica bobice prelazi od tamnocrvene boje pa do ljubičaste, ali unutrašnjost bobice nije obojana. Rast ove sorte je brz i bujan. Listovi su srednje veličine, klinastog oblika i žilama podijeljeni na tri dijela, a peteljka poprima oblik slova V (Maletić i sur., 2015).



Slika 2.1.1.2. Zreli grozd sorte Lasina

Izvor: <https://www.njuskalo.hr/voce/cabernet-sauvignon-gradacija-20-drnis-oglas-32412155> (pristupljeno 15.8.2023.)

S fenološke strane, uzimajući u obzir kretanje vegetacije, Lasina je srednja kasna sorta, dok je prema dozrijevanju kasna sorta. Prinos koji daje je redovit svake godine. Zbog svoje jake bujnosti preporuča se nasad podizati na propusnim, odnosno škrtijim tlima, ali sa dovoljno raspoložive količine željeza. Sorti najviše odgovaraju niski uzgojni oblici kratkog reza sa otprilike 10 pupova po trsu. Lasina u jako plodnim tlima iziskuje redovito plijevljenje kako bi došlo do bolje prozračnosti i slabijeg razvijanja bolesti te bolje oplodnje što dovodi do punog kapaciteta pojedine jedinice. Od plodova Lasine proizvode se laganija vina koja su najčešće u kombinaciji sa Plavinom, te kao što je već je navedeno grožđe Lasine može se iskoristi za proizvodnju desertnog vina prošeka zbog izuzetno dobre kvalitete i činjenice da se lako suši, no to nije jedina mogućnost iskorištenja. Sorta Lasina smatra se gotovo ugroženom, iako joj je trenutno populacija stabilna. Problem se stvara kod toga što nema nekog značajnijeg interesa za podizanje novih nasada, niti se vidi mogućnost širenja sorte van svog prvobitnog uzgojnog područja (Maletić i sur., 2015).

2.2. Bolesti vinove loze

Poput čovjeka, tako i biljku mogu napasti različite bolesti biotskog uzročnika ili abiotskog porijekla. Neovisno o uzročniku bolesti, biljka gubi normalan ritam životnih procesa. U bolesnoj biljci dolazi do promjene u iskorištavanju vode te hranjiva iz tla, otežane proizvodnje organskih spojeva i problema u translokaciji sokova unutar biljke. Vinovu lozu napadaju bolesti uzrokovane gljivama, bakterijama, virusima te nešto rjeđe fitoplazmama i viroidima (Maletić i sur., 2015).

Mikoze i pseudomikoze koje su najzastupljenije u vinogradima poput plamenjače (*Plasmopara viticola*), pepelnice (*Uncinula necator*), sive plijesni (*Botrytis cinerea*) ili pak crne pjegavosti (*Phomopsis viticola*) javljaju se redovite svake godine u jačem ili slabijem intenzitetu. Suzbijanje gljivičnih bolesti bazira se na različitim agrotehničkim mjerama i raznim fungicidima, ali i pomoću nekih bioloških preparata. Gljive su sposobne napraviti veliku štetu u vinogradima i uvelike smanjiti prinos, ali ako se u vinogradu održava pravilna obrada te redovno prati stanje biljaka moguće je u potpunosti zadržati zdrav i puni kapacitet loze (Maletić i sur., 2015).

Osim gljivičnih bolesti, vinovu lozu napadaju i bakterijske bolesti. Jedna od najraširenijih bakterija, koja je zastupljena diljem svijeta gdje se uzgaja vinova loza, je *Agrobacterium vitis*, a ona je uzročnik raka vrata korijena. Tumori uzrokovani ovom bakterijom mogu se pojaviti na bilo kojem dijelu biljke vinove loze, nadzemno i podzemno (Križanac, 2021). Borba protiv bakterijskih bolesti je zahtjevnija i kompliciranija u odnosu na suzbijanje gljivičnih bolesti. Kod zaraze bakterijom potrebno je puno pažnje obratiti na sterilnost alata, ali i sterilnost te higijenu samog nasada. Ukoliko se zaraza uoči rano i bakterija nije zahvatila veći dio biljaka, potrebno je eliminirati zaražene biljke i uništiti ih. Tijekom tog postupka važno je uništiti sve dijelove biljaka te ne izlagati ostale biljke zarazi. Kod zaraze većeg dijela nasada može doći do značajne ekonomske štete ako se sve zaražene biljke uništavaju. Kod takve situacije potrebno je suzbijanju bolesti pristupiti na drugi način. Dakle, pri jačoj zarazi preporučuje se smanjenje prihrane dušikom i povećanje prihrane kalijem. Upotrebom folijarnih gnojiva te njegom nasada, praćenjem nematoda i kukaca vektora moguće je održavati visoku razinu produktivnosti (Križanac, 2021).

Zlatna žutica vinove loze (eng. grapevine yellow phytoplasma, GYp) predstavlja jednu od najznačajnijih fitoplazmi koje utječu na vinovu lozu u Republici Hrvatskoj. Ova bolest uzrokuje ozbiljne štete na vinogradima te predstavlja značajan ekonomski problem za vinogadare. Fitoplazme su mikroorganizmi bez stanične stijenke i genetski su slične bakterijama, ali se razlikuju po načinu prenošenja i patogenosti. Prenosnik zlatne žutice vinove loze je američki skakavac *Scaphoideus titanus*, koji se hrani na vinovoj lozi i usput prenosi fitoplazmu s jedne biljke na drugu. Kada vinova loza postane zaražena zlatnom žuticom, dolazi do poremećaja u normalnom razvoju biljke. Simptomi bolesti uključuju žućenje listova, zadebljanje grozdova, te smanjenje prinosa i kvalitete grožđa. Istraživanja o prisutnosti i širenju zlatne žutice vinove loze u Republici Hrvatskoj provode se kontinuirano, a pravodobno

prepoznavanje i suzbijanje od ključne su važnosti za očuvanje vinogradarske proizvodnje u zemlji (Crnogorac i sur., 2021).

2.3. Virusne bolesti vinove loze

Virusne bolesti su veoma štetne, poglavito u višegodišnjim nasadima. Kada virusi jednom uđu u biljku i počnu parazitirati u njoj ne postoji mogućnost liječenja te biljke. Dakle, zaražene biljke se ne mogu izliječiti, a jedina opcija koja je tada moguća je uništavanje tih biljaka (Meng i sur., 2017). Virusne bolesti su prisutne u biljkama puno prije nego što su postale ekonomski značajne. Ekonomska šteta uzrokovana virusima u vinogradima počinje biti značajnija nakon 1860. godine. U to vrijeme iz Amerike preko sadnog materijala biva prenesen razoran štetnik trsov ušenac/filoksera (*Viteus vitifoliae* Fitch). Nakon dugotrajnog istraživanja borba protiv filoksere krenula je sa cijepljenjem europskih kultivara na američke podloge (Rotim, 2018). Posljedično, s time promet sadnim materijalom se značajno povećao što je dovelo do rasprostranjivanja virusa unatoč vizualnom pregledu biljaka (Uyemoto i sur., 2009).

Virusi unutar zaštitnog virusno-kodiranog proteinskog omotača sadrže RNA ili DNA genom. Infekcija biljke započinje na način da virus odbaci proteinski omotač unutar biljne stanice gdje ispusti virusni genom. Virus se razmnožava unutar biljke i tako se širi po svim organima biljke (Modrow, 2013). Poznato je da se vinova loza vegetativno razmnožava od početka komercijalnog uzgoja, što znači da se od matične biljke dobije nova biljka. Svaka novonastala biljka kojoj je ishodišna matična biljka zaražena imati će virus unutar svojih stanica, odnosno biti će zaražena. Ovaj proces je glavna problematika širenja viroza povezanih uzročnika. Osnova održivog uzgoja bezvirusne vinove loze je program certificiranja; odnosno razmnožavanje, prodaja i uzgajanje isključivo nezaraženih biljaka i eliminacija specifičnih virusa (Soltani i sur., 2021).

U literaturi je opisano 95 virusa koji inficiraju vinovu lozu što predstavlja ozbiljnu prijetnju vinogradarstvu na globalnoj razini, ne samo uzrokujući propadanje vinograda već i smanjenjem prinosa te narušavanjem enološke kvalitete (Gomez Talquenca i sur., 2023). Ipak, 30-ak virusa je opisano kao značajniji u kulturi vinove loze te uzrokuju široki spektar simptoma, tj. malformacije lišća i grančica, diskoloracije lišća (crvenilo, žutilo, klorotična ili svijetlo žuta pjegavost, prstenaste pjege i linijski uzorci), brazde i/ili rupičasti nabori na centralnom cilindru, odgođeno otvaranje pupova te zaostajanje u rastu i propadanje (Marelli, 2014). Iako se već godinama velike vinogradarske sile poput Francuske, Portugala, Argentine i ostalih bore protiv virusa, Hrvatska je s proučavanjem zdravstvenog stanja i klonskom selekcijom započela prije

otprilike 20-ak godina. Premalena posvećenost istraživanjima biljnih virusa dovodi do lošeg zdravstvenog stanja sadnog materijala autohtonih sorata te do nedostatka certificiranih cijepova (Vončina i sur., 2019).

Najrasprostranjeniji i ekonomski najznačajniji virusi u Republici Hrvatskoj su podijeljeni u tri skupine; naboranost drveta, uvijenost lista i infektivna degeneracija, ali sve češće se pojavljuje i virus pjegavosti lista vinove loze (eng. grapevine fleck virus, GFkV). Kultivari zaraženi virusom pjegavosti lista uglavnom su bez simptoma, ali dolazi do deformacije lista, smanjenja vegetativnog rasta te propadanja glavnih žila. GFkV se primarno širi preko zaraženog materijala i do sada nije poznat vektor koji prenosi ovaj virus. Vrlo često virus je prisutan u biljnim stanicama zajedno u kombinaciji s nekim drugim biljnim virusima. Smatra se da je prijenos GFkV sporiji u odnosu na ostale viruse koji se mogu rasprostranjivati vektorima (Crnogorac i sur., 2021).

2.3.1. Virus mozaika gušarke

Virus mozaika gušarke, akronim ArMV (od eng. arabis mosaic virus) spada u skupinu infektivne degeneracije. ArMV je vrsta virusa iz roda *Nepovirus* iz porodice *Secoviridae*, a osim vinove loze napada i jagode, hmelj, rabarbaru. Inficira široki raspon biljaka diljem svijeta, u svim regijama gdje se uzgaja vinova loza (Komorowska i sur., 2021). Smatra se da su nematode iz porodice *Longidoridae* prijenosnici ArMV, ali dokazana je uloga u prijenosu virusa samo europskom kopljastom nematomom (*Xphinema diversicaudatum*). Iako je dokazan i prijenos sjemenom ipak glavni način širenja je vegetativno razmnožavanje. ArMV ima virusni genom sačinjen od dvije jednolančane RNA (Komorowska i sur., 2021). Zaraza često može biti bez vidljivih simptoma na biljci, odnosno virus može biti u latentnom obliku. Ukoliko su simptomi vidljivi njihova jačina izraženosti ovisi o općem stanju biljke, starosti, sorti, bujnosti, ali i o soju virusa. Virusi s ribonukleinskom kiselinom, poput ArMV i kasnije opisanog virusa lepezastog lista, imaju visoku tendenciju adaptivnog potencijala. Virus upravo zbog tog potencijala ima sposobnost brze prilagodbe u novom okruženju, promjene u svojstvima, stvaranja novih sojeva koji slabe otpornost biljke ili pak stjecanja većeg broja domaćina (Hewitt, 1985).

Vinova loza zaražena ArMV-om, osim što daje plodove lošijih karakteristika, rezultira i smanjenim prinosom. Također, može biti skraćen i životni vijek zaražene loze. U rasadničkoj proizvodnji dolazi do negativnog utjecaja na način da je zaraženim biljkama smanjena sposobnost ukorjenjivanja podloge, smanjena sposobnost „primitka“ cijepova, odnosno njihovog sraščivanja (Ivić i Fazinić, 2011). Simptomi zaraze (slika 2.3.1.1.) najbolje se

uočavaju u proljeće, a zaraze mogu biti deformirajućim sojem virusa ili kromogenim sojem virusa (Vončina, 2021). Deformacije se mogu pojaviti na svim biljnim organima. Simptomi na listovima su asimetričnost, naboranost, izraženija nazubljenost rubova. Rozgve razvijaju duple nodije, ali sa skraćenim internodijima, dolazi do neprirodnog grananja mladica. Virus zahvaća i plodove (slika 2.3.1.2.); grozdovi su manji sa smanjenim brojem boba, a njihovo dozrijevanje ne nastupa ujednačeno. Kromogni soj virusa uzrokuje promjene boje najčešće na listovima, ali do žućenja može doći i na cvatu, mladicama i viticama (Ivić i Fazinić, 2011).



Slika 2.3.1.1. Simptomi zaraze virusom mozaika gušarke na vinovoj lozi. S lijeva na desno – žućenje lista, skraćeni intrnodiji, nazubljenost rubova listova

Izvor: <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00/photos> (pristupljeno 18.8.2023.)



Slika 2.3.1.2. Usporedba grozda s trsa zaraženog virusom mozaika gušarke (desno) s onim s bezvirusne biljke (lijevo)

Izvor: <https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2021/07/virusi-vinove-loze.pdf> (pristupljeno 18.8.2023.)

2.3.2. Virus lepezastog lista vinove loze

Virus lepezastog lista vinove loze (eng. grapevine fanleaf virus, GFLV) poput virusa mozaika gušarke spada u skupinu infektivne degeneracije. Jedan je od najraširenijih virusa vinove loze i gospodarski najznačajniji upravo zbog svoje rasprostranjenosti. Vrlo je serološki sličan ArMv-u te također se klasificira u rod *Nepovirus*. Virusi iz roda *Nepovirus* prenose se oblicima (Nematodama), a oblik virusnih čestica je poliedričan (POLiedar). GFLV se konkretno prenosi američkom kopljastom nematodom (*Xiphinema indeks*) koja se hrani na korijenu vinove loze (Hewitt, 1958). Kao rezultat prijenosa virusa nematodom u vinogradu nastaju „oaze“ zaraženih biljaka (slika 2.3.2.1.).



Slika 2.3.2.1. Distribucija virusa lepezastog lista vinove loze unutar vinograda
Izvor: <https://www.flickr.com/photos/99758165@N06/3633124221> (pristupljeno 18.8.2023.)

Folijarni simptomi mijenjaju oblik lista i on poprima oblik lepeze; primarne žile se približe i list poprima otvoreni sinus, dolazi do asimetričnosti i iskrivljenosti. Ostali simptomi očituju se u žućenju; pojavljuju se krom-žute mrlje, žuti mozaik, mijenja se boja žila. Zaražene biljke vinove loze imaju kraće internodije i dolazi do dvostrukog grananja ili „cik-cak“ rasta mladica (Andret-Link i sur., 2004). Grozdovi zaražene biljke su manji od uobičajenog, no to nije lako vidjeti i primijetiti. Uočljiviji je znak rehljavost ploda, odnosno male i tvrde bobice na grozdu te neujednačena zrioba. Nerijetko je grožđe sa zaraženih biljka neiskoristivo (Ivić i Fazinić, 2011). Tijekom cijele godine moguće je vidjeti zarazu na mladicama, ali lakše ju je uočiti nakon što lišće padne. Promijene na grozdovima najizraženije su u periodu dozrijevanja i fazi zrelosti, dok je simptome na lišću najlakše detektirati u proljeće ili početkom ljeta (Andret-Link i sur., 2004). Simptomi virusa lepezastog lista (slika 2.3.2.2.) prisutniji su i uočljiviji nego kod zaraze mozaikom gušarke. Osim ove razlike ta se dva virusa razlikuju i po broju domaćina. GFLV ima ograničen broj alternativnih domaćina, dok ArMV ima širi raspon domaćina.

Opravdanost sličnosti simptoma je u serološkom srodstvu GFLV-a i ArMV-a. U vinovoj lozi ova se dva virusa često pojavljuju u mješovitoj zarazi te zajedno štete biljkama (Andret-Link i sur., 2004).



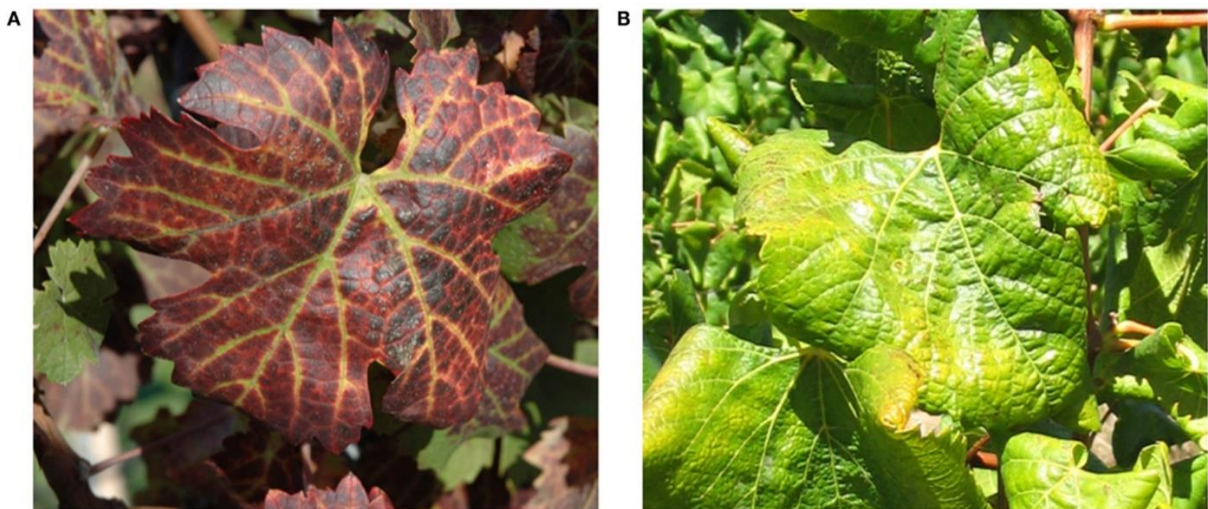
Slika 2.3.2.2. Simptomi zaraze virusom lepezastog lista vinove loze

Izvor: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.26189> i <https://extension.okstate.edu/programs/digital-diagnostics/plant-diseases/grapevine-fanleaf-virus.html> (pristupljeno 19.8.2023.)

2.3.3. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1 i 3

Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1 i 3 (eng. grapevine leafroll- associated virus 1 and 3; GLRaV-1 i GLRaV-3) imaju veći genom, štetniji su i rasprostranjeniji od GLRaV-2, GLRaV-4 i GLRaV-7. Prema trenutno dostupnim podacima GLRaV-1 je drugi najrašireniji i ekonomski najvažniji virus uz GLRaV-3 (Naidu, 2017). Virusi uvijenosti lista pripadaju u porodicu *Closteroviridae* s pozitivnom jednolančanom RNA. Ova porodica sadrži četiri roda, a to su *Ampelovirus* koji ima podskupinu I (GLRaV-1, GLRaV-3) te podskupinu II (GLRaV-4 sa svojim sojevima), zatim rod *Closterovirus* (GLRaV-2), *Velarivirus* (GLRaV-7) te rodovi *Crinivirus*, *Menthavirus* te *Bluvavirus* (Martelli i sur., 2012; ICTV_Master_Species_List_2022_MSL38.v2).

Virusi uvijenosti lista mogu parazitirati većinu kultivara vinove loze, nakon zaraze na biljkama su vidljivi tipični simptomi bolesti uvijanja lišća (eng. grapevine leafroll disease, GLD). Pojava simptoma može varirati ovisno o zemljopisnom položaju i sorti (Burger i sur., 2017). Karakteristični folijarni simptomi kod crnih sorti vinove loze očituju se u crvenim, crveno-ljubičastim bojama međužilnog prostora, dok uske trake sa obje strane primarnih i sekundarnih žila ostaju zelene boje. Kultivari s bijelim plodovima imaju slabije vidljive simptome, ali listovi poprimaju blago žute ili klorotične pjege. Simptomi na listovima postaju vidljivi u fazi zrelog lišća, to jest u vrijeme promjene boje kože ploda. Odmicanjem vegetacije simptomi na listovima postaju sve više izraženiji (Naidu i sur., 2014). U kasnoj fazi vegetacije, odnosno u razdoblju kasnog ljeta, simptomatični listovi se kreću uvijati k svome naličju (slika 2.3.3.1.). Navedeni simptomi su neke općenite karakteristike zaraze virusa, međutim, simptomi se znatno mogu razlikovati ovisno o kombinaciji plemke i podloge, okolišnim uvjetima, sorti i slično. Terensku dijagnozu otežava simptomatologija crvene paleži vinove loze (*Pseudopeziza tracheiphilla*) te neka mehanička, odnosno abiotska oštećenja (Burger i sur., 2017).



Slika 2.3.3.1. Simptomi virusa uvijenosti lista vinove loze na crnoj (A) i bijeloj (B) sorti
Izvor: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00082/full> (pristupljeno 21.8.2023.)

Kao i kod drugih virusnih bolesti tako i kod uvijenosti lista glavni način širenja je zaraženim sadnim materijalom. Poznati prijenosnici GLRaV-a su neke vrste štitastih uši iz porodica *Pseudococcidae* i *Coccidae* koji se hrane sokovima iz floema bodenjem i sisanjem (Naidu i sur., 2014).

Virus značajno može naštetiti prinosu pri čemu prosječni gubitak godišnje može iznositi 10% - 40%. Osim što se gubi na prinosu, zaražene biljke daju plodove lošije kvalitete, prvenstveno u razini šećera, što posljedično utječe na prerađevine. Strategije suzbijanja temelje

se na prevenciji, najučinkovitiji pristup je korištenje nezaraženog biljnog materijala u procesu razmnožavanja. Dakle, prva linija obrane je podizanje nasada zdravim, certificiranim cijepovima. Nadalje, redovitim praćenjem detektiraju se zaražene biljke i uklanjaju iz vinograda. Širenje virusa može se značajno usporiti suzbijanjem vektora, ali ta mjera nije dovoljno učinkovita za potpuno uništenje virusa (Burger i sur., 2017). Direktiva Europske komisije 2005/43/EZ o stavljanju na tržište materijal za razmnožavanje vinove loze regulira viruse u Republici Hrvatskoj te obvezuje proizvođače sadnog materijala na kontrolu uzročnika infektivne degeneracije (ArMV i GFLV), virusa pjegavosti vinove loze (GFkV) te uzročnika uvijenosti lista (GLRaV-1 i GLRaV-3).

2.4. Klonska i zdravstvena selekcija vinove loze

Vinova loza i voćne vrste, ali i većina ostalih višegodišnjih biljaka razmnožava se vegetativnim putem, pupovima ili reznicama, a time se svojstva matične biljke identično prenose na potomstvo i to se naziva kloniranje. Nove sorte nastaju generativno, odnosno kao rezultat oplodnje, a zatim se sorta vegetativno/klonski širi iz ishodišne/majčinske biljke (Maletić i sur., 2016). Iako je teorija kako su sve novonastale biljke vegetativnim putem od iste matične biljke jednakog genotipa, zapravo nisu. Do promjena u genotipu (mutacije) i fenotipu (modifikacije) dolazi zbog utjecaja okoline; biotskih ili abiotskih faktora. Mutacije se odnose na promjene genetskog materijala, stoga su one usađene u genom prenose na potomstvo (Regener i sur., 2000). Pomoću klonske selekcije tijekom niza godina izabiru se, proučavaju i certificiraju jedinke s karakteristikama boljima od prosjeka sorte (Maletić i sur., 2016).

Klonska selekcija temelji se na unutarstornoj varijabilnosti na osnovi elitnih trsova, odnosno potencijalnih matičnih biljka. Danas se procesom klonske selekcije poboljšavaju postojeće sorte, zapravo klonska je selekcija najznačajniji način oplemenjivanja vinove loze. Do oplemenjivanja je došlo iz razloga što proizvođači favoriziraju tradicionalne sorte i skloni su osuđivanju novih sorata, stoga se ovom selekcijom nastoji u što većoj mjeri poboljšati postojeće autohtone sorte (Maletić i sur., 2016). Temeljni fokus klonske selekcije je poboljšati karakteristike neke sorte, ali time ne utjecati na njezina glavna obilježja te sačuvati genom izvornih sorti. Primjerice, ukoliko je sorta prebujna i sklona gljivičnim oboljenjima, potrebno je selekcijskim postupkom postići manju bujnost kako bi cirkulacija zraka bila veća što će pridonijeti manjoj vlažnosti i samim time slabijem razvoju gljivičnih oboljenja unutar trsa (Regener i sur., 2000).

Zdravstvena selekcija vinove loze, poznata i kao sanitarna selekcija, predstavlja ključni korak u očuvanju i unapređenju proizvodnje vinove loze u Dalmatinskoj zagori, ali i širom svijeta. Ovaj proces temelji se na izboru i razmnožavanju isključivo zdravih biljaka kako bi se osigurala visoka kvaliteta i produktivnost vinogradarskih nasada. Prvi korak u zdravstvenoj selekciji je pažljiv odabir matičnih biljaka. Vinogradari pažljivo biraju trsove koji su potpuno zdravi i slobodni od virusnih i bakterijskih oboljenja. Ova selekcija je ključna kako bi se osigurala čistoća sorti i spriječilo unošenje bolesti u reprodukcijski materijal. Pravilna selekcija matičnih biljaka osigurava temelj za dobivanje zdravih potomaka. Nakon odabira matičnih biljaka, slijedi proces razmnožavanja. Najčešći način razmnožavanja je vegetativnim putem, kroz rezanje ili cijepljenje. Ovaj proces osigurava da se genetski identični klonovi matičnih biljaka šire kako bi se očuvala sortna čistoća. Ključno je napomenuti da se ovaj postupak provodi pod strogo kontroliranim uvjetima kako bi se izbjegla mogućnost kontaminacije. Jedna od glavnih prijetnji vinogradima u Dalmatinskoj zagori su virusne bolesti koje se lako prenose putem vegetativnog razmnožavanja i vektora. Stoga je redovito praćenje i testiranje biljaka na prisutnost ovih bolesti ključno za održavanje zdravlja vinograda (Maletić i sur., 2016). Suvremene dijagnostičke tehnike poput molekularnih testova, kao što je PCR (polimerazna lančana reakcija), koriste se za detekciju prisutnosti virusa. Vinogradari također provode testiranje metodom ELISA (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) kako bi potvrdili odsutnost virusa kao što su GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3 i ArMV, koji su posebno štetni za vinovu lozu. Samo biljke koje su negativne na prisutnost ovih virusa smatraju se zdravima i prikladnima za reprodukciju. Sanitarna selekcija vinove loze igra ključnu ulogu u očuvanju bogatstva autohtonih sorti i osigurava da vinogradarska proizvodnja bude održiva i otporna na bolesti. Ovaj proces doprinosi očuvanju kulturne i genetske raznolikosti vinove loze te omogućava proizvodnju vrhunskih vina koja su prepoznata širom svijeta (Martelli, 2014; Andabaka, 2015; Maletić i sur., 2015).

Danas, zdravstveno stanje materijala namijenjenog za vegetativno razmnožavanje vinove loze strogo je regulirano putem *Pravilnika o stavljanju na tržište materijala za vegetativno umnažanje loze* i njegovih kasnijih izmjena i dopuna ("Narodne novine" br. 133/06, 67/10, 30/11, 77/13, 49/20). Ovaj Pravilnik postavlja visoke standarde za reprodukcijski materijal, zahtijevajući da bude gotovo potpuno slobodan od štetnih organizama koji bi mogli narušiti njegovu korisnost i kvalitetu. Pravilnik također zahtijeva da se reprodukcijski materijal uskladi s odredbama koje se odnose na karantenske štetne organizme i karantenske štetne organizme zaštićenih područja u Europskoj uniji. Ovi zahtjevi detaljno su definirani u

provedbenim aktima. Važno je napomenuti da se u procesu uzorkovanja i ispitivanja zdravstvenog stanja reprodukcijskog materijala primjenjuju protokoli koji su priznati na međunarodnoj razini. To uključuje protokole Europske i Sredozemne organizacije za zaštitu bilja (EPPO) i druge međunarodno priznate protokole. Ovi protokoli osiguravaju da se zdravstveno stanje materijala za vegetativno umnažanje vinove loze pažljivo prati i ispituje kako bi se osigurala visoka kvaliteta i očuvao integritet biljaka (Pejić i sur., 2023).

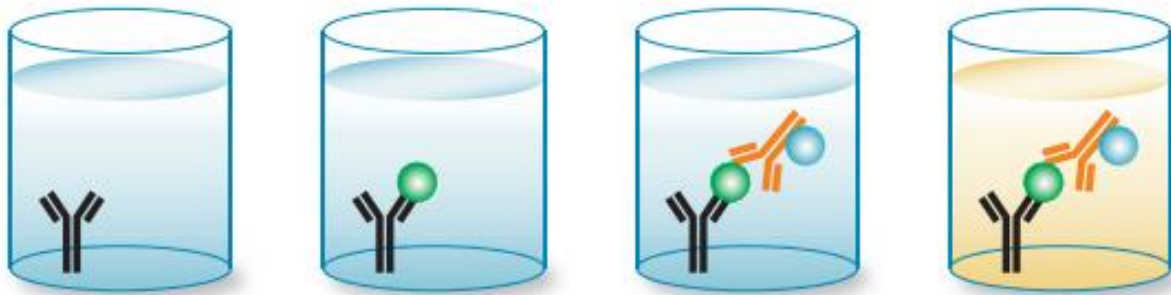
2.5. Serološke metode detekcije biljnih virusa – metoda ELISA

U cilju implementacije integriranog sustava proizvodnje, koji naglašava uzgoj zdravih usjeva uz minimalno narušavanje agroekoloških sustava, postaje sve važnije razvijati brze i precizne metode za identifikaciju i kvantifikaciju biljnih bolesti. Primjena seroloških dijagnostičkih metoda omogućava nam otkrivanje i identifikaciju mnogih značajnih virusa u vinovoj lozi. Jedna od tih metoda je enzimski imunotest na čvrstoj fazi (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), a to je laboratorijski dijagnostički postupak koji koristi specifična protutijela za otkrivanje različitih čestica (Meng i sur., 2017). Ovaj postupak sastoji se od dvije ključne reakcije: imunološke i kemijske. Imunološka reakcija odnosi se na interakciju između epitopa (specifična antigena odrednica u antigenu) i paratopa (mjesto na protutijelu koje se veže za antigen), dok se kemijska reakcija odnosi na interakciju između enzima i supstrata, što rezultira promjenom boje supstrata (Đurišić i sur., 2003.).

Prvi opis ovog postupka datira iz radova Engwalla i Perlmana (1971.), a njihovo istraživanje bilo je inspirirano principima radioimunoloških metoda koje su razvijene šesdesetih godina prošlog stoljeća. Umjesto korištenja radioaktivnih oznaka za mjerenje reakcije između antigena (epitopa) i protutijela (paratopa), ELISA je koristila enzime, pri čemu je najčešće korišten enzim alkalna fosfataza. Ovaj prijelaz s radioaktivnih čestica na enzime omogućio je šire korištenje imunoloških testova u laboratorijskim istraživanjima. Dodatno, upotrebom plastičnih površina koje su bili obložene antigenom ili protutijelom, postupak je znatno pojednostavljen. U 1974. godini, plastične površine zamijenjene su mikrotitarskim pločicama za dijagnosticiranje malarije, a nakon toga se osnovna metoda nije značajno mijenjala. ELISA se počela koristiti za otkrivanje biljnih virusa, što je značajno doprinijelo široj primjeni ove metode u različitim kontekstima. Danas je ELISA najčešće korištena serološka metoda za otkrivanje prisutnosti virusa kod ljudi, životinja i biljaka; može se prilagoditi različitim uzorcima i razinama osjetljivosti, što omogućava brzu i preciznu analizu velikog broja terenskih uzoraka. (Meng i sur., 2017).

Metoda ELISA obično se izvodi unutar dva dana i zahtijeva visoku koncentraciju tijekom rada kako bi se izbjegle lažno pozitivne reakcije i kontaminacija uzoraka. Najčešće se metoda provodi na mikrotitarskim pločicama sa 96 jažica. Postoje četiri osnovne izvedbe metode ELISA: dvostruka sendvič metoda (eng. *double antibody sandwich*, DAS-ELISA), dvostruka protutijelna sendvič indirektna (eng. *double antibody sandwich indirect*, DAS-ELISA) te izravna (eng. *direct ELISA*) i neizravna (eng. *indirect ELISA*). U biljnoj virologiji najčešće se koristi DAS-ELISA izvedba (Meng i sur., 2017).

U ovom istraživačkom radu koristila se DAS ELISA metoda; postupak (slika 2.5.1.) uključuje kompleksan proces detekcije prisutnosti antigena, često u sirovim ekstraktima. Princip DAS ELISA metode temelji se na tome da se uzorak (antigen) nalazi između dva protutijela, poznata kao primarno i sekundarno protutijelo. Početno, primarno protutijelo se veže za antigen koji se nalazi u sirovom ekstraktu koji se ispituje. Nakon toga, provodi se ispiranje kako bi se uklonili nespecifični spojevi. Sljedeći korak uključuje dodavanje konjugiranih protutijela koja se također vežu za antigen. Kao završni korak, dodaje se enzim alkalna fosfataza, koji reagira s odgovarajućim supstratom. Ova reakcija dovodi do promjene boje, koja se može kvantitativno ili kvalitativno izmjeriti. Metoda omogućuje precizno očitavanje prisutnosti antigena u uzorku na temelju promjene boje, što čini DAS ELISA metodu korisnom u različitim laboratorijskim postupcima, uključujući detekciju prisutnosti virusa, bakterija, ili drugih antigena u biološkim uzorcima (Đurišić i sur., 2003; Meng i sur., 2017).



Slika 2.5.1. Shematski prikaz metode DAS- ELISA

Izvor: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html#Sandwich> (pristupljeno 9.9.2023.)

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Za potrebe istraživanja sakupljeno je sveukupno 120 uzoraka. Uzorci su uzeti za vrijeme mirovanja vegetacije tijekom 2022. i 2023. godine iz više vinograda lociranih u glavnom uzgojnom području sorte Lasina, dok je deset trsova/uzoraka uzeto s klonskih kandidata na Baštici, eksperimentalnom vinogradu kraj Zadra (tablica 3.1.1). Svaki uzorak sačinjavao je dvije do tri dobro odrvenjele rozgve/mladice uzete s bazalnog dijela trsa. Odrezane rozgve dužine 10–15 centimetara stavljene su u zasebne plastične vrećice označene određenom oznakom te do testiranja čuvane su na temperaturi od 4 °C u hladnjaku.

U sklopu Zavoda za fitopatologiju (Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet) provedeno je laboratorijsko testiranje svih 120 uzoraka komercijalnim priborom Agritest (Valenzano, Italija) koji se temelji na izvedbi DAS-ELISA. Uzorci su testirani na četiri ekonomski značajna virusa:

- virus mozaika gušarke – (*arabis mosaic virus*, ArMV)
- virus lepezastog lista vinove loze – (*grapevine fanleaf virus*, GFLV)
- uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 – (*grapevine leafroll-associated virus 1*, GLRaV-1)
- uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 – (*grapevine leafroll-associated virus 3*, GLRaV-3)

Tablica 3.1.1. Broj i oznake uzoraka s pojedinih lokacija uključenih u istraživanje

Oznake uzoraka	Broj uzoraka	Lokacija	Položaj
LAS 03 – 10	8	Plastovo	Prilog – stari vinograd
LAS 12 – 25	12		Pod krajem
LAS 26 – 28	3		Prilog – mladi vinograd
LAS 29 - 52	22	Promina	Oklaj
LAS RK 1 – LAS RK 4	4		Mratovo
LAS RK 20 – LAS RK 27	8		
LAS RI 1 – LAS RI 6	6		
LAS DŽ 1 – LAS ĐŽ 13	12		
LAS B1 – LAS B10	10	Suhovare (zaleđe Zadra)	Baštica
LAS 53 – 80	27	Badanj	Polje
LAS 100 – 110	8		

3.2. Metode

Prije provedbe metode ELISA i pripreme uzoraka potrebno je pripremiti pufere, odnosno njihova razrjeđenja prema napatku proizvođača (Agritest, Valenzano, Italija). Potrebni koncentrirani puferi (slika 3.2.1.) se razrjeđuju s destiliranom vodom prema određenom omjeru te im je potrebno podesiti pH koncentriranom klorovodičnom kiselinom (HCl) ili koncentriranom natrijevom lužinom (NaOH) ukoliko za to postoji potreba nakon razrjeđivanja s destiliranom vodom. Puferi, njihova razrjeđenja te radni pH su navedeni u tablici 3.2.1.



Slika 3.2.1. Koncentrirani puferi korišteni za detekciju virusa
Izvor: original

Tablica 3.2.1. Korišteni ELISA puferi, njihova radna razrjeđenja te radni pH

ELISA puferi	Volumen i omjer (koncentriranog pufera /destilirana voda)	pH
Pufer za oblaganje (<i>Coating buffer</i>)	100 mL / 400 mL 1:4	9.6
Ekstrakcijski pufer (<i>Extraction buffer</i>)	100 mL / 300 mL 1:3	7.4
Konjugirani pufer (<i>Conjugate buffer</i>)	100 mL / 400 mL 1:4	7.4
Supstratni pufer (<i>Substrate buffer</i>)	100 mL / 400 mL 1:4	9.8
Pufer za ispiranje (<i>Washing buffer</i>)	100 mL / 1900 mL 1:19	7.4

Pripremljeni puferi čuvani su u hladnjaku na 4 °C do upotrebe. Osim pufera pripremljena su i protutijela. Prema uputama proizvođača (AGRITEST, Valenzano, Italija) primarna protutijela su razrijeđena u puferu za oblaganje naprama omjeru 1:1000 za GFLV te 1:1500 za ArMV, GLRaV-1 i GLRaV-3. Sekundarna su protutijela razrijeđena u konjugiranom puferu prema omjeru 1:1500 za sva četiri virusa. Kvaliteta ove metode osigurana je pozitivnim i negativnim kontrolama; korištene su liofilizirane kontrole (slika 3.2.2.), dobivene u kompletu za provođenje metode ELISA, razrijeđene sa destiliranom vodom (pozitivne kontrole za viruse ArMV i GFLV sa 2 mL, a ostale kontrole sa 4 mL).



Slika 3.2.2. Liofilizirane kontrole
Izvor: original

3.2.1. Priprema uzoraka i provedba metode ELISA

Za pripremu uzoraka sa svake rozgve iz pojedinog uzorka skinut je vanjski sloj kore kako bi se mogao sastrugati floemski dio rozgve. Oštirim nožem ostrugano je 0,1 – 0,2 grama zelene floemske mase (slika 3.2.1.1.). Odvagana masa stavljena je u tarionik te uz pomoć tekućeg dušika smrvljena u sitni prah. Dobiveni prah u tarioniku je pomiješan s ekstrakcijskim puferom u volumenu od 1,5 mL (na 0.1 gram smrvljenog uzorka). Pripremljeni uzorak prebačen je u tubicu s oznakom jednakom onoj na vrećici. Pripremljeni uzorci u tubici su stavljeni na centrifugiranje s ciljem odvajanja tekuće faze od krute (slika 3.2.1.2.) kako bi pipetiranje bilo lakše, a uzorak bez nečistoća. Pripremljeni uzorci čuvani su u hladnjaku na 4 °C za vrijeme pripreme/oblaganja pločica.

Tijekom cijele pripreme vrlo je važno održavati radni stol čistim i sterilnim. Nož kojim se struže potrebno je sterilizirati između svakog uzorka, također i tarionik mora biti čist i sterilan za svako novo mrvljenje tj. novu pripremu uzorka. Nakon što se sastruže dovoljno tkiva rozgve radna površina se briše i kreće se s novim uzorkom.



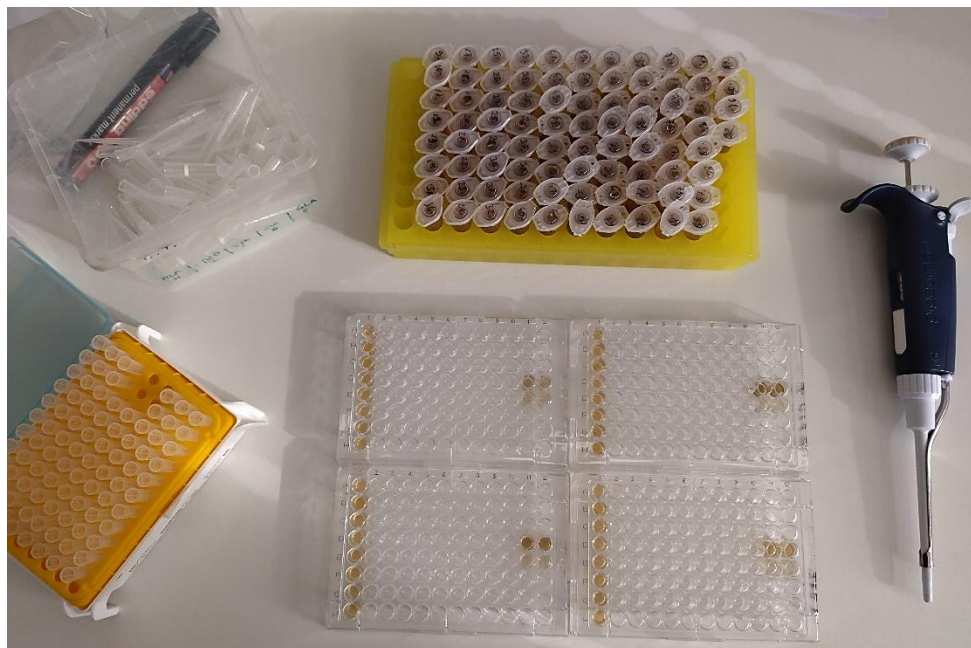
Slika 3.2.1.1. Struganje floemskog tkiva
Izvor: original



Slika 3.2.1.2. Pripremljen uzorak u označenoj tubici (oznaka na čepu)
Izvor: original

Nakon dovršene pripreme uzoraka slijedi priprema mikrotitarskih pločica. Najprije se u svaku jažicu dodaje 200 μ l primarnih protutijela koja su prethodno otopljena u puferu za oblaganje. Po završetku punjenja svih pločica primarnim protutijelima nastupa faza inkubacije gdje se u trajanju od 2 sata mikrotitarske pločice inkubiraju na 37 °C u termostatu (MaxQ 4450, Thermo Scientific, SAD). Nakon uklanjanja pufera za oblaganje pomoću multikanalne pipete

jažice se ispiru 3 puta sa 200 μ l pufera za ispiranje. Iza ispiranja kreće se s punjenjem jažica pripremljenim uzorkom prema prije napravljenom rasporedu kako bi se znalo u kojem je redu i kojem stupcu određeni uzorak, te se stavljaju dvije pozitivne i dvije negativne kontrole na svaku pločicu, uključujući i dvije jažice napunjene samo s ekstrakcijskim puferom (*blank*) (slika 3.2.1.3.). Inkubacija pločica odvija se preko noći u hladnjaku na 4°C.



Slika 3.2.1.3. Punjenje mikrotitarskih pločica uzorcima i kontrolama
Izvor: original

Sljedeći dan pločice su ponovno isprane puferom za ispiranje tri puta s 200 μ l po jažici. U isprane jažice dodana su razrijeđena sekundarna protutijela u puferu za konjugaciju koja su pripremljena prema navodima proizvođača. Nakon inkubacije od 2 sata pločice su isprane kao i prethodnih puta te su napunjene s 200 μ l po jažici supstratnog pufera u kojem je bio otopljen supstrat – p-nitrofenilfosfat (Sigma-Aldrich). Supstratni pufer tj. supstrat mijenja boju otopine u jažicama ovisno o zastupljenosti virusa unutar njih. Nakon dva sata inkubacije na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi uslijedilo je očitavanje rezultata sa mikrotitarskih pločica pomoću EL800 spektrofotometra (Biotek, SAD) pri valnoj duljini od 405 nm. Pozitivnim su smatrani oni uzorci čija je vrijednost spektrofotometrijskog očitavanja bila barem tri puta veća od prosječne vrijednosti očitavanja negativnih kontrola, dok su uzorci sa spektrofotometrijskim očitanjem između dvostruke i trostruke prosječne vrijednosti očitavanja negativnih kontrola smatrani s niskom koncentracijom virusa.

4. Rezultati

Prisutnost ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3 ispitana je serološkom imunoenzimskom reakcijom na čvrstoj fazi (ELISA) na 120 uzoraka sorte Lasina s različitih područja. Dobiveni rezultati pokazuju najveći postotak zaraze s GLRaV-3 (84,17%), nešto manje sa GLRaV-1 (28,33%) i GFLV (5,83%) dok nije utvrđena zaraza s ArMV sa 100% sigurnošću. Određen broj uzoraka (GLRaV-3 10 uzoraka, 8,33%; GLRaV-1 4 uzorka, 3,33%; GFLV 13 uzoraka, 10,83%; te ArMV 5 uzoraka, 4,16%) pokazalo se upitnima, to jest uzorci su bili sa spektrofotometrijskim očitanjima između dvostruke i trostruke prosječne vrijednosti negativnih kontrola. Od svih testiranih uzoraka njih šest (5%) su potvrđeni kao bezvirusni, odnosno bez zaraze od četiri ispitana virusa. Svih šest bezvirusnih trsova su s lokacije Promina (dva sa položaja Oklaj, a ostala četiri sa položaja Mratovo). Detaljan prikaz utvrđenog zdravstvenog stanja u pogledu zaraze virusima za svaki pojedini trs prikazan je u Tablici 4.1.

Od testiranih 120 uzoraka niti jedan nije bio zaražen s ArMV. GFLV je utvrđen u 7 trsova (tri s područje Plastova i četiri s područja Badanj). GLRaV-1 je potvrđen u 34 trsa (13 na lokaciji gore Promina, 20 u mjestu Badanj te 1 na lokaciji Plastovo). Najzastupljeniji virus bio je GLRaV-3 potvrđen u 101 uzorku. Detaljan prikaz postotaka zaraženosti po pojedinim virusima i lokacijama prikazan je u tablici 4.2. Ukupni postotak zaraženosti GFLV-om iznosi 5,83%; na području Plastova je 2,5%, na Badnju 3,33% biljaka zaraženo, dok na lokaciji Promina i Suhovare nema zaraze. Kod GLRaV-1 ukupni postotak zaraženosti iznosi 28,33%; na području Plastova 0,83%, područje gore Promina ima 10,83% zaraženih trsova, a Badanj 16,67%, dok na području Suhovara nije detektirana zaraza. Zaraza GLRaV-3 sveukupno je iznosila 84,17%, te je virus potvrđen na svim lokacijama; Plastovo 18,33%, Promina 30,84%, Suhovare 8,33% i Badanj 26,67%. U nekim je trsovima primijećena mješovita zaraza, a od 120 uzoraka 114 ih je bilo zaraženo barem jednim virusom. Dakle 95% testiranih trsova bilo je zaraženo s jednim ili više virusa uključenih u istraživanje.

Mješovita zaraza najčešće je bila uzrokovana infekcijom GLRaV-3 i GLRaV-1, a detektirana je u 27 (22,5%) trsova, a od toga najviše na području Badanj s ukupno 59,26%, odnosno 16 zaraženih uzoraka. Druga najzastupljenija mješovita zaraza bila je kombinacija GFLV i GLRaV-3 utvrđena u 5 uzoraka 4,16%, dok je u dva trsa (1,67%) pronađena zaraza sa tri virusa (GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3).

Svi uzorci uzeti s područja Suhovare pokazali su pozitivnu reakciju na GLRaV-3, dok su na područjima Promina, Plastova i Badanj ipak utvrđene jedinke bez ovog virusa, ali neke biljke su bile zaražene ostalim virusima ili su u skupini s niskom koncentracijom virusa.

Tablica 4.1. Spektrofotometrijska očitavanja dobivena kod testiranih trsova/uzoraka. Pozitivni uzorci prikazani su ružičastom, upitni žutom, dok su bezvirusne biljke označene zelenom bojom. ArMV – virus mozaika gušarke, GFLV – virus lepezastog lista vinove loze, GLRaV-1 i GLRaV-3 – uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1 i 3.

Oznaka uzorka	Virusi				Lokacija
	ArMV	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	
LAS 3	0,178	0,196	0,116	2,145	Plastovo
LAS 4	0,151	0,195	0,132	2,748	
LAS 5	0,138	0,219	0,141	1,815	
LAS 6	0,165	0,171	0,141	2,12	
LAS 7	0,143	0,219	0,13	1,597	
LAS 8	0,128	0,19	0,119	2,033	
LAS 9	0,132	0,181	0,129	1,61	
LAS 10	0,137	0,199	0,118	1,263	
LAS 12	0,202	1,151	0,145	1,874	
LAS 13	0,137	0,193	0,136	2,478	
LAS 14	0,158	0,182	0,161	2,653	
LAS 15	0,162	0,178	0,122	2,231	
LAS 16	0,165	0,172	0,163	1,929	
LAS 19	0,146	0,197	0,135	1,989	
LAS 20	0,135	0,166	0,141	1,732	
LAS 21	0,136	0,179	0,125	1,596	
LAS 22	0,162	3,135	0,179	1,994	
LAS 23	0,138	0,182	2,017	0,348	
LAS 24	0,169	0,845	0,152	2,064	
LAS 25	0,169	0,166	0,132	1,925	
LAS 26	0,123	0,181	0,129	0,876	
LAS 27	0,123	0,153	0,12	1,441	
LAS 28	0,151	0,161	0,121	1,037	
LAS 29	0,122	0,196	0,116	1,444	
LAS 30	0,195	0,197	0,151	1,728	
LAS 31	0,235	0,379	0,24	3,002	
LAS 32	0,194	0,253	2,007	2,394	
LAS 33	0,302	0,272	0,15	3,397	
LAS 34	0,231	0,242	0,554	2,331	
LAS 36	0,203	0,354	0,402	2,829	
LAS 37	0,269	0,357	0,256	3,293	
LAS 38	0,404	0,303	1,432	0,267	
LAS 39	0,355	0,237	0,221	0,54	
LAS 40	0,14	0,237	0,181	2,078	
LAS 41	0,199	0,2	1,705	2,838	
LAS 42	0,181	0,21	0,172	0,156	
LAS 43	0,141	0,221	1,405	3,303	
LAS 44	0,146	0,237	0,162	2,578	
LAS 46	0,271	0,504	0,153	3,199	
LAS 47	0,208	0,285	0,523	2,361	
LAS 48	0,209	0,335	0,106	3,164	

Tablica 4.1. Nastavak

Oznaka uzorka	Virusi				Lokacija
	ArMV	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	
LAS 49	0,128	0,211	0,934	0,157	Promina
LAS 50	0,129	0,211	1,376	0,18	
LAS 51	0,14	0,243	0,956	3,13	
LAS 52	0,161	0,228	0,133	0,13	
LAS RK 1	0,236	0,273	0,204	0,151	
LAS RK 2	0,133	0,205	0,138	2,932	
LAS RK 3	0,137	0,205	0,137	2,719	
LAS RK 4	0,152	0,254	0,15	0,132	
LAS RK 20	0,361	0,399	0,29	0,543	
LAS RK 21	0,417	0,168	1,028	0,836	
LAS RK 22	0,379	0,542	1,481	0,797	
LAS RK 23	0,349	0,546	0,276	0,723	
LAS RK 24	0,264	0,645	0,543	0,766	
LAS RK 25	0,246	0,639	0,143	0,76	
LAS RK 26	0,256	0,426	0,177	0,233	
LAS RK 27	0,284	0,305	0,915	0,25	
LAS RI 1	0,188	0,259	0,226	3,104	
LAS RI 2	0,134	0,233	0,123	1,33	
LAS RI 3	0,247	0,329	0,161	1,835	
LAS RI 4	0,248	0,232	0,139	2,029	
LAS RI 5	0,181	0,296	1,669	2,931	
LAS RI 6	0,151	0,344	0,128	2,598	
LAS DŽ 1	0,145	0,23	0,657	1,612	
LAS DŽ 2	0,142	0,254	0,149	1,978	
LAS DŽ 3	0,14	0,333	0,154	2,753	
LAS DŽ 5	0,175	0,255	0,124	2,044	
LAS DŽ 6	0,226	0,356	0,155	2,024	
LAS DŽ 7	0,258	0,434	0,15	3	
LAS DŽ 8	0,2	0,23	0,241	1,274	
LAS DŽ 9	0,126	0,209	0,135	2,832	
LAS DŽ 10	0,167	0,231	0,125	3,037	
LAS DŽ 11	0,166	0,27	0,134	2,089	
LAS DŽ 12	0,134	0,271	0,125	3,039	
LAS DŽ 13	0,17	0,546	0,136	2,404	
LAS B1	0,17	0,185	0,157	2,579	Suhovare
LAS B2	0,131	0,247	0,144	1,734	
LAS B3	0,144	0,168	0,175	1,631	
LAS B4	0,124	0,18	0,135	1,799	
LAS B5	0,145	0,159	0,114	1,337	
LAS B6	0,128	0,168	0,122	1,836	
LAS B7	0,128	0,178	0,112	1,265	
LAS B8	0,199	0,22	0,225	1,635	
LAS B9	0,153	0,251	0,13	1,918	
LAS B10	0,143	0,254	0,133	1,818	

Tablica 4.1. Nastavak

Oznaka uzorka	Virusi				Lokacija
	ArMV	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	
LAS 53	0,266	2,372	0,589	3,117	Badanj
LAS 54	0,236	0,986	0,149	2,777	
LAS 55	0,237	0,18	0,831	3,065	
LAS 56	0,196	0,218	1,372	2,424	
LAS 57	0,269	2,669	0,169	3,063	
LAS 58	0,123	0,299	0,209	2,67	
LAS 59	0,163	0,308	1,552	3,146	
LAS 61	0,166	0,468	1,98	3,007	
LAS 62	0,145	0,223	1,182	1,453	
LAS 63	0,188	0,253	1,133	1,946	
LAS 64	0,311	0,244	0,143	1,805	
LAS 65	0,249	0,263	1,314	1,936	
LAS 66	0,226	1,756	0,826	2,043	
LAS 67	0,383	3,471	0,134	2,934	
LAS 68	0,127	0,23	0,166	3,054	
LAS 69	0,129	0,249	1,907	1,885	
LAS 70	0,125	0,243	0,129	2,247	
LAS 71	0,214	0,315	0,305	2,21	
LAS 72	0,224	0,237	1,364	1,452	
LAS 73	0,421	0,259	0,145	1,243	
LAS 74	0,154	0,187	0,211	1,989	
LAS 75	0,175	1,242	0,134	2,444	
LAS 76	0,145	0,224	0,151	2,103	
LAS 77	0,155	0,26	1,276	0,933	
LAS 78	0,133	0,214	1,529	2,62	
LAS 79	0,197	0,272	1,182	1,64	
LAS 80	0,302	0,311	0,187	1,217	
LAS 100	0,32	0,622	2,23	1,004	
LAS 102	0,426	0,825	0,793	0,907	
LAS 103	0,56	0,711	2,844	0,916	
LAS 104	0,39	0,813	2,105	0,859	
LAS 106	0,247	0,614	2,874	0,721	
LAS 108	0,241	0,736	2,168	0,717	
LAS 109	0,217	0,523	1,407	1,15	
LAS 110	0,262	0,423	1,168	1,058	

NAPOMENA: različiti uzorci su za isti virus bili analizirani na različitim mikrotitarskim pločicama zbog čega nisu navedena očitavanja negativnih kontrola iz kojih su računate granične vrijednosti (negativan, upitan - moguća niska koncentracija virusa, pozitivan). To je i razlog zašto su neki uzorci upitni/pozitivni na većim, a neki na manjim vrijednostima spektrofotometrijskih očitavanja.

Tablica 4.2. Prikaz postotka zaraženosti pojedinim virusima po lokacijama

Lokacija	Broj testiranih uzoraka	ArMV	GFLV	GLRaV-1	GLRaV-3	Bezvirusne biljke
PLASTOVO	23	0%	13,04%	4,35%	95,65%	0%
PROMINA	52	0%	0%	25%	71,15%	11,54%
SUHOVARE	10	0%	0%	0%	100%	0%
BADANJ	35	0%	11,42%	57,14%	91,43%	0%

5. Rasprava

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.), sa širokim arealom uzgoja u gotovo svim dijelovima Hrvatske vodeća je voćna kultura, ali samo se na manjem području uzgaja sorta Lasina. Zbog male rasprostranjenosti, ali i brojnosti, nema mnogo potencijalnih matičnih biljaka za širenje sorte, a vegetativno razmnožavanje biljaka i prijenos putem vektora predstavljaju glavne načine širenja virusa vinove loze (Meng, 2017). Jedan od glavnih izazova u detekciji ovih virusa je što se pojava i ozbiljnost simptoma mogu razlikovati ovisno o mnogim faktorima, uključujući starost biljke, vrste virusa, klimatskih uvjeta, tipa tla i mnogih drugih čimbenika (Fazinić i Ivić, 2011). Često se u vinogradima javlja problem latentne infekcije, gdje se virus ne manifestira jasno, a jedini način otkrivanja je putem laboratorijskih metoda kao što su serološke analize (ELISA), molekularne tehnike (RT-PCR) i biološki testovi (indeksiranje, mehanička inokulacija).

Fokus ovog istraživanja bio je analizirati rasprostranjenost četiri ekonomski značajna virusa na sorti Lasina u njenim glavnim uzgojnim područjima. S obzirom na to da se sorta Lasina uzgaja na relativno ograničenom geografskom području i da je razmnožavana putem ograničenog broja matičnih biljaka, za očekivati je bilo da će zdravstveno stanje u pogledu virusnih infekcija biti slično kao i kod drugih sorti koje se uzgajaju u našem priobalnom području. Od sveukupnih uzetih i testiranih uzoraka samo je šest uzoraka odnosno trsova bilo negativno na sva četiri testirana virusa. Svi ostali uzorci bili su zaraženi minimalno jednim virusom, a nekolicina ih je bilo inficirano mješovitom zarazom dva ili tri virusa. Iako u uzorcima nije potvrđena niti jedna zaraza ArMV-om, kod nekih uzoraka nije isključena mogućnost prisutnosti virusa u niskim koncentracijama, odnosno da se radi o nedavnoj infekciji. Visoka zastupljenost virusa u testiranim uzorcima može se povezati sa nedostatkom kvalitetnog sadnog materijala, ali i sa starošću samih vinograda. Iako bi se neki virusi značajno mogli usporiti uklanjanjem zaraženih biljaka u velikoj većini to nije slučaj iz razloga što vinogradari nisu skloni krčenju svoga vinograda. S druge strane upitna je i osviještenost i informiranost vinogradara o samoj problematici virusa vinove loze. Najpraktičnija je mjera podizanja nasada zdravim i certificiranim sadnim materijalom, ali to nije moguće ukoliko je vinograd zasađen prije 50 i više godina kada nije bilo Europske direktive, nije bilo seroloških metoda kao ni certificiranih loznih cijepova. Prema trenutno važećem hrvatskom zakonodavstvu za sadni materijal vinove loze, postoje zahtjevi za testiranjem rasadnika na prisutnost četiri različita virusa, a to su ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3. Dodatno, podloge (tj. podloga na kojoj se uzgaja vinova loza) moraju se testirati na prisutnost virusa pjegavosti

vinove loze (*grapevine fleck virus*, GFkV). Ovi zakonski zahtjevi usmjereni su na očuvanje zdravlja i kvalitete vinove loze, sprječavanje širenja virusnih infekcija i očuvanju vinogradarske proizvodnje u Hrvatskoj.

U nedavnom istraživanju kojeg su proveli Vončina i suradnici (2019), ispitivana je rasprostranjenost virusa kod 14 hrvatskih autohtonih sorti vinove loze na trsovima iz vinograda u regiji Dalmacije. Ukupno je testirano 1116 trsova primjenom metode ELISA na prisutnost devet različitih virusa. Rezultati su potvrdili prisutnost osam različitih virusa, a postotci zaraženosti virusima iznosili su: GLRaV-3 (79,6%), GLRaV-1 (40,8%), GFLV (19,6%) i ArMV (3,2%). Kod 8,3% trsova nije utvrđena prisutnost nijednog od testiranih virusa. Dobiveni rezultati i učestalost pojave pojedinih virusa u velikoj mjeri poklapaju se s rezultatima utvrđenima kod sorte Lasina, pogotovo u pogledu zaraze s GLRaV-3.

Četverogodišnje istraživanje na prisutnost četiri ekonomski značajna virusa vinove loze (ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3) dalo je rezultate visoke zastupljenosti zaraze. Korištenjem metode DAS-ELISA, analizirano je ukupno 781 uzoraka 18 autohtonih sorti vinove loze prikupljenih diljem istarskog poluotoka. Rezultati istraživanja pokazali su da su virusi GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3 prisutni na gotovo svim ispitanim lokacijama, a većina sorata bila je zaražena. Ukupno je utvrđeno da je 82,2% vinove loze bilo zaraženo virusima, pri čemu je 69,0% trsova bilo zaraženo jednim virusom, dok je 31,0% bilo zaraženo s više različitih virusa. Najzastupljeniji virus bio je GLRaV-3, prisutan u 69,1% slučajeva, dok su GFLV (23,9%) i GLRaV-1 (17,2%) također bili prisutni. Virus ArMV nije bio detektiran tijekom istraživanja (Poljuha i sur., 2010). Rezultati dobiveni provedenim istraživanjem na sorti Lasina podudaraju se u kontekstu najučestalijeg virusa, ali također i u kontekstu odsutnosti ArMV te značajnog postotka mješovitih infekcija.

U istraživanju Karoglan Kontić i suradnika (2009.), također se koristila imuno-enzimska metoda ELISA kako bi se analiziralo zdravstveno stanje autohtonih sorata vinove loze. Prikupljeno je i testirano 1352 uzoraka. U Dalmaciji je najrasprostranjeniji virus bio GLRaV-3, s prisutnošću od oko 80% zaraženih trsova. Na sjevernim područjima, posebno u kontinentalnoj Hrvatskoj, gotovo polovica analiziranih biljaka bila je negativna u testiranju, dok je najzastupljeniji virus bio GLRaV-1. Prisutnost oba nepovirusa, GFLV i ArMV, bila je relativno niska, s posebno niskom pojavnošću ArMV. Također, uočene su mješovite infekcije s dva ili više virusa, pri čemu je najčešća kombinacija bila infekcija s GLRaV-1 i GLRaV-3, što se pokazalo prisutnim u 25% svih ispitanih trsova, te u više od 50% trsova Dalmacije. Različite regije Hrvatske pokazuju značajne razlike u pojavnosti virusa na vinovoj lozi. U

kontinentalnim regijama Hrvatske, kao što je prikazano u istraživanju, virus GLRaV-3 ima znatno manju prisutnost, manje od 10% testiranih trsova. S druge strane, u tim kontinentalnim regijama, zabilježena je najviša pojavnost GLRaV-1. Ove razlike u zastupljenosti virusa u različitim regijama mogu biti posljedica različitih klimatskih uvjeta, vrsta tla, sorti vinove loze koje se uzgajaju, ali i drugih čimbenika kao što su različite vektorske vrste. Uspoređujući rezultate utvrđene kod sorte Lasina sa ranije spomenutim rezultatima i ovdje se u priličnoj mjeri podudara pojavnost GLRaV-3 te također značajan udio mješovitih infekcija, kao i relativno mala pojavnost/odsutnost virusa iz skupine infektivne degeneracije (GFLV i ArMV).

Vinogradarska proizvodnja u Hrvatskoj predstavlja zahtjevan proces i poznavanje brojnih čimbenika i specifičnosti tipičnih za pojedina uzgojna područja. Razumijevanje tih razlika pomaže vinogradarima i stručnjacima za vinogradarstvo prilagoditi strategije zaštite vinove loze i suzbijanje virusa prema specifičnim uvjetima svake regije kako bi se očuvalo zdravlje vinove loze i kvaliteta grožđa. Iako se uvijek naglašava kako je osnova borbe protiv virusnih infekcija korištenje zdravog sadnog materijala, nikako se ne smije izostaviti utjecaj vektora u širenju virusa. Osim što vektori prenose virus sa loze na lozu, mogu ga prenijeti i na neke vrste korova (Poljuha i sur., 2010; Vončina i sur. 2023). U tom slučaju postoji mogućnost zaraze novo zasađenog vinograda zdravim certificiranim sadnim materijalom. Kako je suzbijanje štetnika svake godine teže zbog ukidanja registracija aktivnih tvari, vektori mogu postati sve veći problem u zaštiti vinove loze. Opća pretpostavka da se virusno opterećenje povećava kako biljna tkiva postaju starija je često točna. U mnogim slučajevima, virusi se mogu akumulirati tijekom vremena u biljkama što može biti razlog „polu-pozitivne“ odnosno „slabo-pozitivne“ reakcije na viruse kod nekih uzoraka. Ovaj fenomen može uzrokovati da se simptomi virusnih infekcija često počinju manifestirati ranije u starijim biljnim organima ili lišću. Ova pretpostavka također ima važne implikacije za postupke uzorkovanja za testiranje virusa. Kada se uzorkuju biljke za testiranje, obično se preferiraju stariji dijelovi biljke ili dijelovi koji su više izloženi mogućem širenju virusa. To omogućuje bolje šanse za otkrivanje prisutnosti virusa, budući da se u starije dijelove biljke često akumulira veći broj i količina virusa (Naidu, 2017). Osim toga, razumijevanje ovog principa također može pomoći u praćenju i upravljanju virusnim infekcijama u vinogradima i poljoprivrednim usjevima. Pravovremeno uzorkovanje i testiranje može pomoći u identifikaciji inficiranih biljaka i poduzimanju mjera za kontrolu i sprečavanje daljnjeg širenja virusa.

6. Zaključci

Nakon provedenog istraživanja pojavnosti ekonomski značajnih virusa (ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3) kod sorte Lasina može se zaključiti sljedeće:

1. Ukupna zaraženost ispitanih uzoraka vinove loze barem jednim virusom iznosila je 95%
2. Kao najzastupljeniji virus utvrđen je GLRaV-3 (84,17%), nešto manje GLRaV-1 (28,33%) i GFLV (5,83%), a zaraza s ArMV nije utvrđena
3. Najčešća mješovita zaraza virusima bila je kombinacija GLRaV-3 i GLRaV-1 (22,5%), kombinacija GFLV i GLRaV-3 utvrđena je u 5 uzoraka (4,16%), a zaraza s GFLV, GLRaV-3 i GLRaV-1 pronađena je kod dva uzoraka (1,67%)
4. Zaraza po lokacijama se razlikuje u broju zaraženih trsova, ali na svim lokacijama je bilo najviše trsova zaraženih s GLRaV-3. Područje Suhovara se blago razlikuje iz razloga što nije utvrđena zaraza s GFLV i GLRaV-1, dok je na ostalim lokacijama potvrđena infekcija ovim virusima. Na svim lokacijama, osim Promine, svaki je trs bio zaražen barem s jednim virusom
5. Šest detektiranih bezvirusnih trsova potjecali su s lokacije Promina (dva s položaja Oklaj, a ostala četiri s položaja Mratovo). Dakle, od svih 120 testiranih uzoraka samo kod njih šest (5%) nije potvrđena prisutnost istraživanih virusa, čime je potvrđeno relativno loše zdravstveno stanje sorte Lasina u Republici Hrvatskoj. Međutim, ovih šest trsova su razmnoženi i posađeni kao klonski kandidati, s ciljem izdvajanja i registriranja klona ili klonova s najboljim gospodarskim karakteristikama.

7. Popis literature

1. Agencija za plaćanja u poljoprivredi, ribarstvu i ruralnom razvoju (2023). Vinogradarski registar (20.8.2023.).
2. Aghbali, A., Hosseini, S. V., Delazar, A., Gharavi, N. K., Shahneh, F. Z., Orangi, M., Bandehagh, A., Baradaran, B. (2013). Induction of apoptosis by grape seed extract (*Vitis vinifera*) in oral squamous cell carcinoma. *Bosn J Basic Med Sci*, 13 (3): 186-91.
3. Andabaka, Ž. (2015). Ampelografska evaluacija autohtonih dalmatinskih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.) Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
4. Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., 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.
5. Bučar, M. (2008). Medonosne biljke kontinentalne Hrvatske: staništa, vrijeme cvjetanja, medonosna svojstva. *Petrinja: Matica hrvatska*.
6. Burger, J.T., Maree, H.J., Gouveia, P., Naidu, R.A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 3 . In: Meng B., Martelli G., Golino D., Fuchs M. (eds) *Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management*. Springer.
7. Crnogorac, A., Panno, S., Mandić, A., Gašpar, M., Caruso, A.G., Noris, E., Davino, S., Matić, S. (2021) Survey of five major grapevine viruses infecting Blatina and Žilavka cultivars in Bosnia and Herzegovina. *PLoS ONE* 16 (1): 1-15.
8. Đurišić, S., Lazić, S., Petrović, T., Jevđerić, S., S., Lepulović, D. (2003). Imunoenzimska – ELISA dijagnostika u veterinarskoj medicini. *Veterinarski glasnik*, 57 (1-2), 63-72.
9. Fernandes, F., Ramalhosa, E., Pires, P., Verdial, J., Valentao, P., Andrade, P., Bento, A., Pereira, J. A. (2013). *Vitis vinifera* leaves towards bioactivity. *Industrial Crops and Products*. 43: 434-440.
10. Gomez Talquenca, S., Alonso, R., Luna, F., Lanza Volpe, M., Buscema, F. (2023). Occurrence of Nine Grapevine Viruses in Commercial Vineyards of Mendoza, Argentina. *Viruses* 15, 177.
11. Hewitt, W. B. (1985). From virus-like to virus diseases of grapevines: some unresolved problems including immunity and ideas for researching them. *Phytopathologia Mediterranea* 24, 1-7.
12. Ivić, D., Fazinić, T. (2011). Gospodarski značajni virusi vinove loze, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo. *Zavod za zaštitu bilja, Zagreb*, 6-34.

13. Karačić, A. (2015). Pojavnost viroza u autohtonim kultivarima vinove loze u hercegovačkomu vinogorju. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
14. Karoglan Kontić, J., Preiner, D., Šimon, S., Zdunić, G., Poljuha, D., Maletić, E. (2009). Sanitary status of Croatian Native Grapevine varieties. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 74: 99-103.
15. Komorowska, B., Hasiow-Jaroszewska, B., Budzynska, D. (2021). Genetic variability and molecular evolution of arabis mosaic virus based on the coat protein gene sequence. The National Institute of Horticultural Research, Department of Plant Protection, Poland, 1-6.
16. Križanac, I. (2021). Bakterijski rak vinove loze (*Agrobacterium vitis*). *Glasilo biljne zaštite*. 21 (3): 364-366.
17. Lesinger, I. (2006). Liječenje voćem. Rijeka: Adamić. 315-329
18. Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Šimon, S., Žulj Mihaljević, M., Ilijaš, I., Marković, D. (2015). Zelena knjiga: Hrvatske izvorne sorte vinove loze. Hrvatska agencija za okoliš i prirodu, Zagreb, 24-80; 284-286.
19. Maletić, E., Preiner, D., Karoglan Kontić, J., Šimon, S., Pejić, I. (2016). Istraživanja unutar-sortne varijabilnosti vinove loze u Hrvatskoj i klonska selekcija. *Radovi Zavoda za znanstveni i umjetnički rad u Požegi*, (5): 1-11.
20. Martelli, G.P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, 96 (1S): 1-136.
21. Martelli, G.P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., Agronovsky, A.A., Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Dovas, C.I., Fuchs, M., Gugerli, P., Hu, J.S., Jelkmann, W., Katis, N.I., Maliogka, V.I., Melzer, M.J., Menzel, W., Minafra, A., Rott, M.E., Rowhani, A., Sabanadzovic, S., Saldarelli, P. (2012). Taxonomic revision of the family closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology* 94: 7-19.
22. Meng, B., Martelli, P. G., Golino, D., Fusch, M. (2017). Grapevine viruses: Molecular biology, Diagnostics and Management. Springer, 978: 409-431.
23. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja. (2020). Pravilnik o Nacionalnoj listi priznatih kultivara vinove loze. NN 25/2020: 616 (75).
24. Mirošević, N. (1996). Vinogradarstvo – drugo prošireno izdanje. Hrvatsko obiteljsko gospodarstvo, Priručnici. 6-36

25. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H. (2013). Molecular Virology, article from the book: Viruses: Definition, Structure, Classification, Springer-Verlag, Berlin, 17-30.
26. Naidu, R.A. (2017). Grapevine leafroll-associated virus 1. U: Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management, Springer, 127-139.
27. Naidu, R., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D., Martelli, G.P. (2014). Grapevine Leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. Plant Disease 98: 1172-1185.
28. Parihar, S., Sharma, D. (2021). A Brief Overview on *Vitis vinifera*. Scholaris Academic Journal of Pharmacy, 10 (12): 231-239 .
29. Pejić, I., Maletić, E., Preiner, D., Vončina, D., Šimon, S., Petric, I.V., Marković, Z., Mesarić, B., Miklaužić, L. (2023). Škrlet: hrvatski vinski biser. Autorska knjiga, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, 77-105.
30. Poljuha, D., Sladonja, B., Bubola, M. (2010). Incidence of viruses infecting grapevine varieties in Istria (Croatia). Journal of food, agriculture & environment. (8): 166-169.
31. Regner, F., Stadlbauer, A., Eisenheld, C., Kaserer, H. (2000). Genetic Relationship Among Pinots and Related Cultivars. American Journal of Enology and Viticulture 51 (1): 7-14.
32. Rotim, N. (2018). Filoksera ili trsov ušenac (*Viteus vitifoliae* Fitch). Pregledni stručni rad, Glasnik zaštite bilja br.6, 77-82.
33. Soltani, N., Stevens, K. A., Klaassen, V., Hwang, M-S., Golino, D. A., Rwahnih, M. (2021). Quality Assessment and Validation of High-Throughput Sequencing for Grapevine Virus Diagnostics. Viruses 13, 1130.
34. Uyemoto, J.K., Martelli, G.P., Rowhani, A. (2009). Grapevine Viruses, Viruslike Diseases and Other Disorders. Virus Diseases of Plants: Grape, Potato, and Wheat Image Collection and Teaching Resourc. APS Press, St. Paul, MN 55121.
35. Vračar, N. (2011). Antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin v kožicah grozdnih jagodin listih vinske trte. Diplomski rad, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta.
36. Vončina, D., Preiner, D., Šimon, S., Cvjetković, B., Maletić, E., Pejić, I., Karoglan Kontić, J. (2019). Distribution of nine viruses in Croatian autochthonous grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars from Dalmatian region included in clonal selection. Original scientific paper, Journal of Central European Agriculture. 20 (1): 262-273.
37. 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.

38. Vončina, D., Jagunić, M., De Stradis, A., Diaz-Lara, A., Al Rwahnih, M., Šćepanović, M., Almeida R. (2023). New Host Plant Species of Grapevine virus A Identified with Vector-Mediated Infections. *Plant Disease*, doi: 10.1094/PDIS-03-23-0607-RE.

7.1. Popis mrežnih stranica

1. Metadata Standards Leader (MSL)." ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*. <https://ictv.global/msl> (pristupljeno 9.9.2023.)

8. Životopis

Eni Šimetić, hrvatske nacionalnosti, tijekom svoje karijere radila je kao učiteljica razredne nastave u Osnovnoj školi Vladimira Nazora u Pazinu od 2. svibnja 2023. godine do 21. lipnja 2023. godine. Ovo iskustvo stekla je u mjestu Sveti Petar u Šumi. Također je prošla kroz praksu za profesora u Srednjoj školi Mate Balota u Poreču. Tijekom svog školovanja, stekla je značajno radno iskustvo. Sudjelovala je u praksi tijekom studija u Institutu za poljoprivredu i turizam u Poreču od 14. lipnja 2021. do 28. lipnja 2021. godine. Tijekom ovog razdoblja, stekla je praktična iskustva vezana za svoje područje studija. Imala je praksu tijekom školovanja u Istarskom vodovodu d.o.o. u Buzetu, gdje je radila u laboratoriju i provodila analizu vode.

Što se tiče obrazovanja, Eni je upisala 8. listopada 2021. magistarski studij na Sveučilištu u Zagrebu, Agronomski fakultet, gdje trenutno studira. Tijekom svog obrazovanja od 3. rujna 2022. do 20. ožujka 2023., stekla je pedagoške kompetencije na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Prethodno je pohađala preddiplomski studij od 1. listopada 2018. do 20. rujna 2021. te je stekla titulu sveučilišne prvostupnice inženjerke Primijenjene ekologije u poljoprivredi na Sveučilištu u Zadru, Odjelu za ekologiju, agronomiju i akvakulturu. Njen početak obrazovanja započeo je u Prirodoslovnoj i grafičkoj školi Rijeka, gdje je stekla zvanje ekološkog tehničara.