

Ekonomski značajni virusi vinove loze u kolekciji autohtonih sorata vinogradarsko-vinarskog pokušališta Jazbina

Zrnić, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:204:204098>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U
KOLEKCIJI AUTOHTONIH SORATA
VINOGRADSKO-VINARSKOG POKUŠALIŠTA
JAZBINA**

DIPLOMSKI RAD

Elena Zrnić

Zagreb, rujan 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Fitomedicina

**EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U
KOLEKCIJI AUTOHTONIH SORATA
VINOGRADSKO- VINARSKOG POKUŠALIŠTA
JAZBINA**

DIPLOMSKI RAD

Elena Zrnić

Mentor: izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, rujan 2021.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Elena Zrnić**, JMBAG 0016104354, rođena 01.01.1995. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U KOLEKCIJI AUTOHTONIH
SORATA VINOGRADSKO-VINARSKOG POKUŠALIŠTA JAZBINA**

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE
O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Elene Zrnić**, JMBAG 0016104354, naslova

**EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U KOLEKCIJI AUTOHTONIH
SORATA VINOGRADSKO-VINARSKOG POKUŠALIŠTA JAZBINA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:

potpisi:

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

2. prof. dr. sc. Edyta Đermić član

3. izv. prof. dr. Darko Preiner član

Neposredni voditelj: Martin Jagunić, mag. ing. agr.

ZAHVALA

Neizmjerne sam zahvalna svome mentoru, zbog kojeg sam postala mali dio ovog velikog projekta, te bi se htjela zahvaliti neposrednom voditelju Martinu Jaguniću koji je bio uvijek tu kada je trebalo, te je nesebično dijelio svoje znanje. Također bi se htjela zahvaliti našem tehničaru, Mladenu Polettiju Kopešiću koji je dane provedene na zavodu činio zanimljivijim i zabavnijim, te koji mi je pomogao u ključnom trenutku pisanja ovog rada.

Također bi se htjela zahvaliti svojoj predivnoj obitelji koji su vjerovali u mene i kada sama nisam, koji su me gurali naprijed i ohrabivali me. Posebno hvala mojoj majci bez čije vjere, ljubavi i podrške ništa od ovoga nebi bilo ostvarivo.

Hvala Vam!

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj istraživanja	1
2. Pregled literature.....	2
2.1. Ekonomski značajni virusi vinove loze	2
2.1.1. Virus lepezastog lista vinove loze (GFLV)	2
2.1.2. Virus mozaika gušarke (ArMV)	3
2.1.3. Virusi uvijenosti lista vinove loze (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3)	4
2.1.4. Virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV)	5
2.1.5. A- i B-virus vinove loze (GVA i GVB).....	6
2.2. Pregled dosadašnjih istraživanja u Hrvatskoj	7
2.3. Pokušalište „Jazbina“	9
2.3.1. Debit.....	10
2.3.2. Maraština.....	10
2.3.3. Plavac mali.....	10
2.3.4. Plavina	10
2.3.5. Pošip bijeli.....	11
2.4. Imunoenzimska metoda - ELISA	12
2.4.1. Protutijela	12
2.4.2. Četiri osnovne izvedbe metode ELISA.....	13
3. Materijali i metode	17
3.1. Materijali	17
3.2. Provedba metode ELISA	18
3.2.1. Priprema pufera, protutijela i kontrola	18
3.2.2. ELISA - prvi dan.....	20
3.2.3. ELISA - drugi dan.....	22
3.3. Simptomi virusnih infekcija.....	22

4. Rezultati	24
5. Rasprava	28
6. Zaključci	30
7. Literatura	31
8. Životopis	35

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Elene Zrnić**, naslova

EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U KOLEKCIJI AUTOHTONIH SORATA VINOGRADSKO-VINARSKOG POKUŠALIŠTA JAZBINA

Vinova loza bez sumnje predstavlja jednu od gospodarski najvažnijih kultura koja se uzgaja širom svijeta. Na profitabilnosti proizvodnje te kvalitetu uroda, između ostalih skupina patogena, utječu i virusi kojih je do danas kod loze opisano 86 iz 18 porodica i 35 rodova. U ovome radu testirani su metodom ELISA uzorci rozgve pet autohtonih hrvatskih sorata vinove loze iz pokušališta „Jazbina“ na osam gospodarski značajnih virusa: virus mozaika gušarke (ArMV), virus lepezastog lista vinove loze (GFLV), uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1), uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (GLRaV-2), uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3), A-virus vinove loze, B-virus vinove loze te virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV). Testiranjem je obuhvaćeno ukupno 472 uzorka slijedećih sorata: Debit (23 uzorka), Maraština (47 uzoraka), Plavina (79 uzoraka), Plavac mali (153 uzorka) te Pošip (170 uzoraka). Dokazana je prisutnost šest od osam virusa, odnosno ArMV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, dok prisutnost GFLV i GVB nije potvrđena. Najveći postotak kolekcijskog nasada bio je zaražen s GFkV (28%), slijedili su ga GVA (8%), zatim GLRaV-2 i GLRaV-3 (2%), dok je najmanja zaraza utvrđena sa ArMV (manje od 1 %). Najlošije zdrastveno stanje pokazala je sorta Debit gdje je od 23 trsova, broj biljaka slobodnih od virusa iznosio četiri (17%), dok je najbolje zdravstveno stanje u pogledu zaraze virusima utvrđeno kod sorte Plavina sa 79 (100%) trsova slobodnih od testiranih virusa. Od 472 testirana uzorka, na više od 30% nije identificiran niti jedan virus što ukazuje na kvalitetu sadnog materijala, dobru vinogradsku praksu i pridržavanje preventivnih mjera.

Ključne riječi: ELISA, autohtone sorte, virusi vinove loze

Summary

Of the master's thesis – student **Elena Zrnić**, entitled

ECONOMICALLY IMPORTANT GRAPEVINE VIRUSES IN THE COLLECTION OF AUTOCHTHONOUS GRAPEVINE VARIETIES IN WINE AND VITICULTURE EXPERIMENTAL STATION "JAZBINA"

The vine is without a doubt one of the most economically important crops grown around the world. The profitability of production and the quality of the crop, among other groups of pathogens, are also influenced by viruses, of which 86 from 18 families and 35 genera have been described in the vine to date. In this work, ELISA samples of five autohtonus grapevine cultivars from the Jazbina experimental site were tested for eight economically significant viruses: arabis mosaic virus (ArMV), grapevine fanleaf virus (GFLV), grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2), l grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), grapevine virus A, grapevine virus B and grapevine fleck virus (GFkV). The testing included a total of 472 samples of the following varieties: Debit (23 samples), Maraština (47 samples), Plavina (79 samples), Plavac mali (153 samples), and Pošip (170 samples). The presence of six of eight viruses, ArMV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, was proven, while the presence of GFLV and GVB was not confirmed. The highest percentage of collection plantations was infected with GFkV (28%), followed by GVA (8%), GLRaV-2 and GLRaV-3 (2%), while the lowest infection was found with ArMV (less than 1%). The worst health condition was shown by the variety Debit, where out of 23 samples, the number of plants free of viruses was four (17%) while the best health condition was shown by variety Plavina with 100% of vines free of viruses. Of the 472 samples tested, no virus was identified in more than 30%, indicating the quality of planting material, good agricultural practice and adherence to preventive measures.

Keywords: ELISA, autochthonous cultivars, grapevine viruses, experimental site Jazbina

1. Uvod

Vinova loza jedna je od gospodarski najznačajnijih kultura uzgajanih širom svijeta. Dodatno bogatstvo i specifičnost svake vinogradske zemlje predstavljaju njene autohtone sorte za čiju su održivost i uvođenje potrebni kolekcijski nasadi i matičnjaci koji proizvođačima omogućuju kvalitetan sadni materijal. Uz patogene, na kvalitetu uroda utječu i mnogi virusi, kojih je danas opisano 86 vrsta iz 18 porodica i 35 rodova (Meng i sur., 2017). Na sreću, samo njihov manji broj smatra se ekonomski značajnim. U ovome radu biti će opisano osam najznačajnijih virusa. Iz skupine infektivne degenracije biti će spomenuti virus lepezastog lista vinove loze (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV), te virus mozaika gušarke (*Arabis mosaic virus*, ArMV), iz skupine uvijenosti lista (*Grapevine leafroll complex*), bit će opisani uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1, 2 i 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 1, 2, 3*; GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3), a skupine naboranosti drveta (*Rugose wood complex*) A- i B- virus vinove loze (*Grapevine virus A*, GVA; *Grapevine virus B*, GVB), te virus pjegavosti lista vinove loze (*Grapevine fleck virus*, GFkV). Svi ti virusi značajno utječu na kvalitetu biljke, smanjuju sadržaj šećera, kiselina i suhe tvari u grozdu, negativno utječu na fotosintezu te vigor biljke, te smanjuju kvalitetu i ubrzavaju proces odumiranja (Ivić, Fazinić, 2011).

Kako navode Maletić i sur. (2015) vinova loza pojavila se na području Hrvatske puno prije stanovništva, što dokazuju i okamine lista izumrlag roda *Cissetes* stari oko 60 milijuna godina. Prema vinogradskom registru (APPRRR, 2013.) danas vinogradi vinove loze zauzimaju oko 21.184,45 hektara, a najčešće zastupljene sorte su Graševina, Malvazija istarska, te Plavac mali. Osim što predstavljaju prirodno bogatstvo, posebnu važnost sorata dokazuju i mnoge turističke manifestacije i događanja vinogradsko-vinarskog sadržaja.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj rada je utvrditi prisutnost i učestalost pojave ekonomski najznačajnijih virusa u kolekcijskom nasadu autohtonih sorata vinove loze koji se nalazi u sklopu vinogradarsko-vinarskog pokušališta „Jazbina“.

2. Pregled literature

2.1. Ekonomski značajni virusi vinove loze

Ekonomski najznačajnije viruse vinove loze možemo, prema simptomima razvrstati u 4 skupine. Prvoj skupini pripada virus lepezastog lista vinove loze (GFLV), te virus mozaika gušarke (ArMV). Prema simptomima uzrokuju infektivnu degeneraciju. Drugoj skupini pripadaju virusi koji uzorkuju uvijenost lista vinove loze, a to su uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1), uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (GLRaV-2), te uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3). Simptomi treće skupine virusa također su vidljivi na listu u vidu pjega, a uzrokuje ih virus pjagavosti lista vinove loze (GFkV). Četvrta skupina virusa radi najveće štete na drvu, te tu pripadaju A-virus vinove loze (GVA), te B-virus vinove loze (GVB) (Ivić, Fazinić, 2011).

2.1.1. Virus lepezastog lista vinove loze (GFLV)

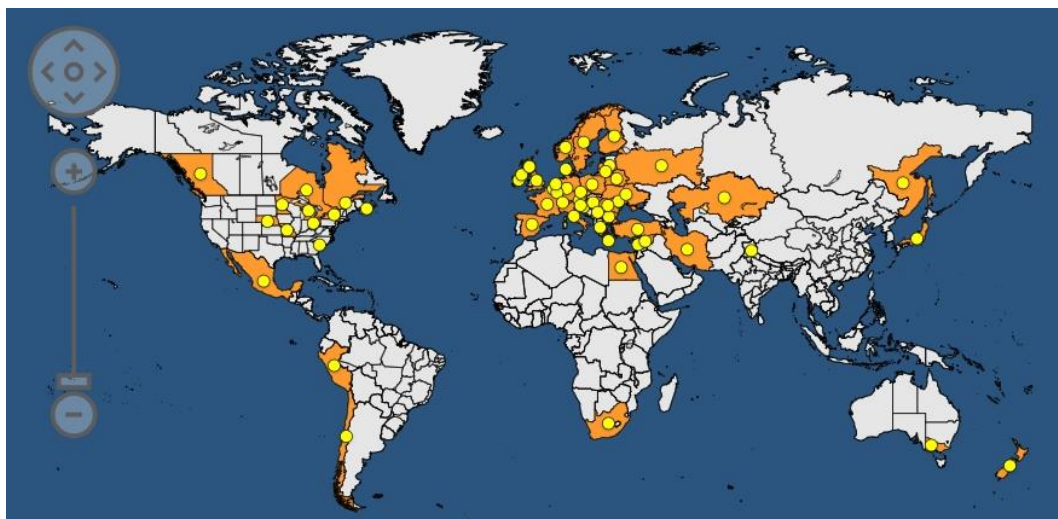
Virus pripada porodici *Secoviridae*, rodu *Nepovirus*, te se prenosi američkom kopljastom nematodom (*Xiphinema index*, Micoletzky). Smatra se jednim od najštetnijih virusa upravo zbog nematode koja se hrani na korijenu te nakon ishrane ostaje infektivna i do 12 tjedana (Vončina, 2019). Andret-Link i sur., (2004.) navode kako je virus lepezastog lista vinove loze prvi poznati virus, a nađen je prije 160 godina. Uzrokuje infektivnu degeneraciju, odnosno smanjen prinos, kvalitetu grozda te sadržaj šećera u bobicama, te može uzrokovati kraći životni vijek biljke. Može se prepoznati po karakterističnim simptomima kao što su klorotična išaranost, te deformacija lista u oblik lepeze (slika 2.1.1.1). Jačina simptoma ovisi o osjetljivosti kultivara, okolišu te soju virusa. Simptomi se također mogu pojaviti na drvenim dijelovima biljke u vidu abnormalnog grananja rozgve i asimetričnog rasta (Andret-Link i sur., 2004).



Slika 2.1.1.1. Klorotična išaranost lista uzrokovana virusom lepezastog lista vinove loze (GFLV) (izvor: <https://www.nexles.com/articles/grapevine-fanleaf-grapevine-fanleaf-virus/>)

2.1.2. Virus mozaika gušarke (ArMV)

Uz prethodno navedeni virus, bitno je spomenuti i virus mozaika gušarke koji pripada istoj skupini virusa, te se prenosi na isti način, ali pomoću europske kopljaste nematode, *Xiphinema diversicaudatum* (Poturiček, 2019). Simptomi zaraze ovim virusom slični su simptomima prethodnog. Prepoznatljiv je po mozaično išaranom listu žutom bojom koja može varirati ovisno o osjetljivosti i intezitetu zaraze. Također se na biljkama zaraženim ovim virusom mogu primjetiti dvostruki nodiji, skraćeni internodiji, rehljavost grozda te smanjena nazubljenost listova (Vončina, 2019). Do štete može doći i u rasadnicima gdje je kao posljedica zaraze smanjena sposobnost srašćivanja podloge i plemke (Ivić i Fazinić, 2011). Rasprostranjen je u svim vinogradskim regijama svijeta, no najveću štetu radi na području Europe (slika 2.1.2.1.).



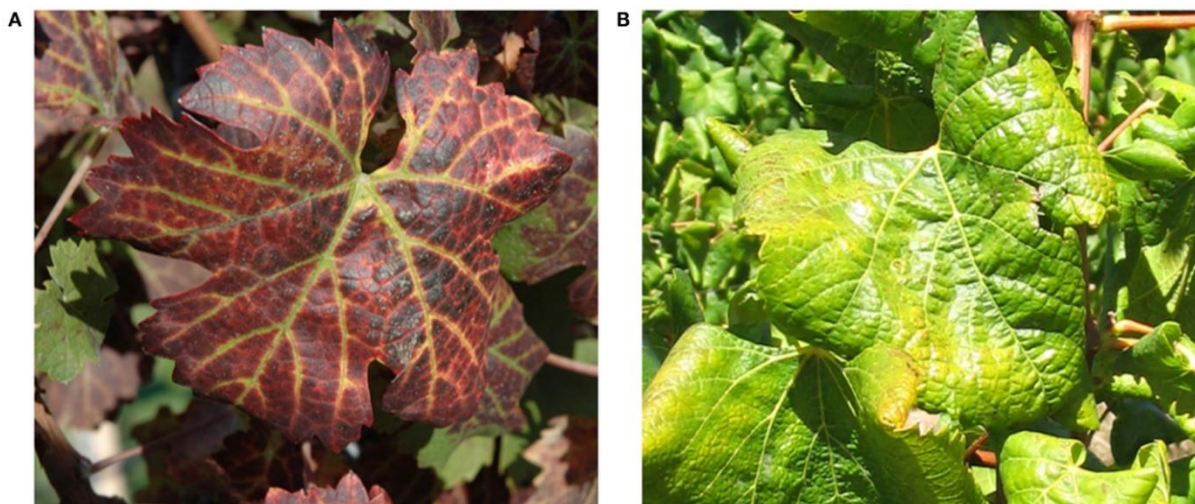
Slika 2.1.2.1. Rasprostranjenost virusa mozaika gušarke
(izvor: <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00/distribution>)

2.1.3. Virusi uvijenosti lista vinove loze (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3)

Viruse iz ove skupine prvi puta je opisao Fibre 1853. godine koji je primjetio odsutnost zelene boje na crvenim kultivarima, dok je na području Jugoslavije, bolest prvi put opisao Dimitrijević 1970. godine (Meng, 2017). Virusi uvijenosti lista vinove loze pripadaju porodici *Clsteroviridae*, koja sadrži 4 roda. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1 i 3 (GLRaV-1; GLRaV-3) pripadaju rodu *Ampelovirus*, dok uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (GLRaV-2) pripada rodu *Clsterovirus*. Najčešći prenosioci ovih virusa su vunaste štitaste uši (*Pseudicicudae*) koje ubadanjem rila unose virus do floema biljke (Pavletić, 2019). GLRaV-2 jedini je virus iz ove skupine čiji vektor nije poznat (Sharma i sur., 2015).

Virusi uvijenosti lista vinove loze uzročnici su do 62% svjetskih gubitaka u proizvodnji grožđa (Little i sur., 2001). Pripadaju gospodarski najznačajnijim virusima, te rade ekonomske štete u svim regijama svijeta. Na vinovoj lozi mogu se pronaći pojedinačno ili u kombinaciji s drugim virusima (Meng i sur., 2017).

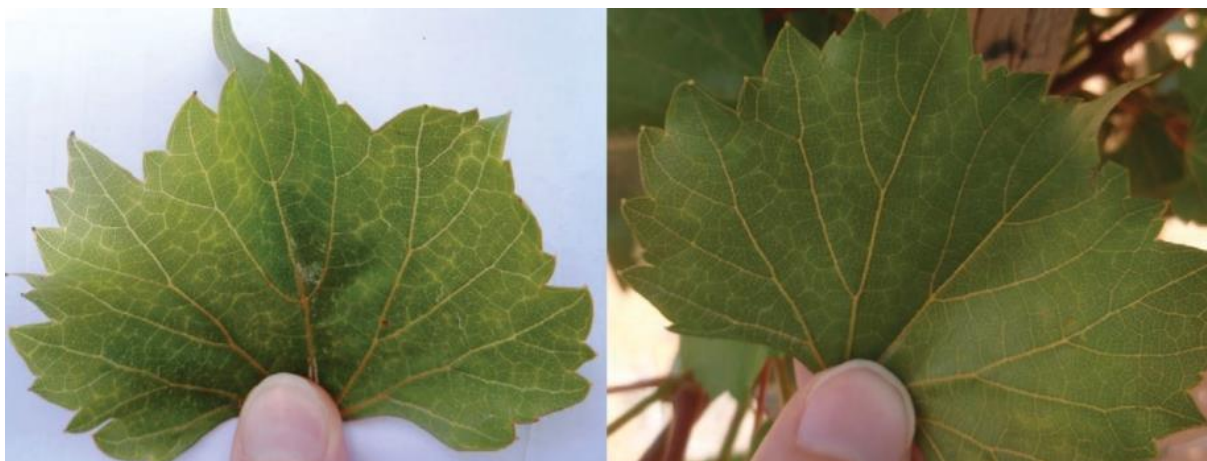
Kod crvenih kultivara list poprima crvenkastu boju, dok nervatura lista ostaje zelena. Suprotno tome, kod bijelih sorti uočava se blaga kloroza lista (slika 2.1.3.1.) koja se često u vinogradima ne primjeti na vrijeme. Listovi se uvijaju prema naličju (Meng i sur., 2017).



Slika 2.1.3.1. Simptomi na crvenim kultivarima (A) simptomi na bijelim kultivarima (B)
(izvor: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00082/full>)

2.1.4. Virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV)

Virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV) član je porodice *Tymoviridae*, roda *Maculavirus*. Virus se nalazi u floemu biljke, a prenosi se putem razmnožavanja i cijepljenja. Alternativni domaćini, kao i vektor ovog virusa, nisu poznati (Constable i Radoni, 2011). Virus pjegavosti lista vinove loze naziv je dobio prema karakterističnom simptomu vidljivom na naličju lista sorte *Vitis rupestris* (slika 2.1.4.1.). Nervatura mlađeg lišća poprima svjetliju nijansu, dok stariji listovi poprimaju mozaični uzorak. Stariji listovi se također mogu iskriviti, odnosno uviti prema licu lista. Simptomi su vidljivi u proljeće za vrijeme blagih temperatura, dok s rastom temperatura nestaju (Constable i Radoni, 2011). Najštetniji je na vrsti *Vitis rupestris* koja se koristi i kao indikator njegove prisutnosti i reagira sa ranije opisanim simptomima (Bagi i sur., 2016). GFkV u kombinaciji s drugim virusima može uzrokovati smanjenje rasta trsa.



Slika 2.1.4.1. List zaražen s virusom pjegavosti lista vinove loze (GFkV)
(izvor: <https://www.wineaustralia.com/getmedia/b1e5038d-cc30-48d8-b3c2-25844af8e795/201107-Grapevine-fleck-and-associated-viruses?ext=.pdf>)

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

Virusi iz skupine naboranosti drveta predstavnici su porodice *Flexiviridae*, roda *Vitivirus* (Vončina, 2011). A-virus vinove loze (GVA) prenosi se pomoću štitastih uši na poluperzistentan način (Rosciglione i Castellano, 1985), ali kao glavni način širenja Bagi i sur. (2016.) navode cijepljenje. Prema Bagi i sur. (2016.) simptomi zaraze ovim virusom opisani su kao naboranost drveta vinove loze (*rugose wood complex*), po čemu je i cijela skupina dobila ime. Uzrokuju bradzanje, jamičavost i naboranost kore drveta vinove loze (slika 2.1.5.1.).

B-virus vinove loze (GVB) prema simptomima pripada istoj skupini virusa odnosno uzrokuje plutavost kore vinove loze (*corky bark*), udubine i brazde koje su vidljive na površini kore. Također, virus se može prepoznati po „internodijalnom zadebljanju mladica“ (Vončina, 2011).



Slika 2.1.5.1. Simptomi zaraze virusima iz kompleksa naboranosti drveta.
(izvor: <https://glossary.wein.plus/rugose-wood-complex>)

2.2. Pregled dosadašnjih istraživanja u Hrvatskoj

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) jedna je od najznačajnijih kultura na području Republike Hrvatske, te su na njoj provedena brojna istraživanja u svrhu detekcije rasprostranjenosti gospodarski najvažnijih virusa. Iz skupine simptoma infektivne degeneracije prvi puta otkriveni su na području Istre 1959. godine (Šarić i Corte, 1959.), dok je 1960. godine otkriven i na području kontinentalne Hrvatske (Šarić i Hranueli, 1977).

U istraživanju provedenom 2007. (Vončina i sur., 2011.) godine analiziralo se po 95 uzoraka iz Nacionalne zbirke autohtonih sorata u pokušalištu „Jazbina“, te 95 uzoraka iz zbirke „Risika“ smještene na Krku. Uzorci su testirani na osam najznačajnijih virusa (ArMV, GFLV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA i GVB) metodom ELISA. Rezultati su pokazali dominantnost zaraze s uvijenosti lista vinove loze pridruženim virusom 3 (GLRaV-3) na oba lokaliteta. Na lokalitetu Jazbina, 75 uzoraka (78,9%) bilo je zaraženo s GLRaV-3, dok je na lokalitetu Risika bilo zaraženo 73 uzorka (76,8%). S GVA na lokalitetu Jazbina bilo je zaraženo 57 uzoraka (60%), a u Risici 35 (36,8%). Na GFkV u Jazbini pozitivne vrijednosti pokazalo je 23 uzoraka (24,2%), a na lokalitetu Risika 35 uzoraka (36,8%). GFLV i GVB pokazali su slične vrijednosti na oba lokaliteta, u Jazbini samo dva uzorka (2,1%), a u Risici jedan uzorak (1,1%). Deset uzoraka u Nacionalnoj zbirci u Jazbini bilo je slobodno od virusa (10,5%), dok je na lokalitetu Risika negativne vrijednosti pokazalo njih 7 (7,4%).

2009. godine provedeno je istraživanje u kojem je testirana 21 hrvatska autohtona sorta na virus lepezastog lista vinove loze (GFLV), virus mozaika gušarke (ArMV), te dva virusa iz skupine klosterovirusa (uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, GLRaV-1; uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3, GLRaV-3). Provodilo se na 1351 uzoraka iz kontinentalne Hrvatske, Istre i Dalmacije. Najveći problem predstavljala je Dalmacija gdje je samo 11% uzoraka bilo nekontaminirano, u Istri 30%, dok je najbolje rezultate pokazao kontinentalni dio Hrvatske sa 50% uzoraka slobodnih od virusa. GLRaV-1 češće je nađen u sjevernoj Hrvatskoj, dok je 86% uzoraka s područja Dalmacije bilo kontaminirano s GLRaV-3. S ArMV bilo je zaraženo samo 23 uzorka, od toga dva s kontinentalnog dijela. GFLV je dijagnosticiran na 16% uzoraka s područja Dalmacije, dok je u središnjem dijelu Hrvatske pronađen na samo dva uzorka. Od 21 sorte, najgore zdravstveno stanje je pokazala sorta Plavac mali, najrasprostranjenija sorta Dalmacije, na kojoj je od 122 uzorka, samo sedam bilo slobodno od virusa (Karoglan Kontić i sur., 2009).

Slične rezultate pokazalo je i nedavno istraživanje Vončine i sur. (2019.) provedeno na 14 autohtonih sorata u vinogradima na području Dalmacije. Testirano je ukupno 1116 trsova sorata Babica, Babić, Dobričić, Glvinuša, Grk, Ljutun, Maraština, Mladenka, Ninčuša, Plavina, Plavac mali, Pošip, Vlačka i Vugava na osam prethodno spomenutih virusa (ArMV, GFLV, GFkV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, GVA, GVB). Od njih 1116, samo 8,3 % nije bilo zaraženo niti jednim virusom. Na osam sorata od 14 (Babica, Babić, Dobričić, Glvinuša, Ljutun, Mladenka, Ninčuša i Vlačka) detekirano je svih osam virusa. 888 (79,6 %) od 1116 trsova bilo je zaraženo s GLRaV-3, 685 (61,4 %) s GVA, 455 (40,8 %) s GLRaV-1, 223 (19,9 %) s GFkV, 219 (19,6 %) s GFLV, 46 (4,1 %) s GLRaV-2, 36 (3,2 %) s ArMV te 35 (3,1 %) s GVB. Najbolje zdravstveno stanje pokazala je sorta Grk kod koje je na 70 testiranih uzoraka, 37 (52,9 %) bilo slobodno od virusa. Može se zaključiti da su na području Hrvatske najviše su prisutni virusi uvijenosti lista vinove loze i to GLRaV-1 i GLRaV-3. GLRaV-3 najzastupljeniji je na području Istre i Dalmacije (do 100%) dok je GLRaV-1 više prisutan na kontinentalnom dijelu Hrvatske (oko 45%) (Vončina, 2021).

U 18 godina starom nasadu kultivara Refoš, na lokaciji Komen (Slovenija) provedeno je istraživanje utjecaja GVA na vinovu lozu. Analiza je pokazala da trsovi zaraženi ovim virusom imaju manju težinu i broj bobica u grozdu. 18% trsova na kojima je bio vidljiv simptom karakterističan za ovaj virus (naboranost kore drveta) umrlo je osam godina nakon sadnje što također predstavlja prvo izvješće o utjecaju GVA na vinovu lozu (Tomažič i sur., 2005). Od tada pa to danas navedeni virusi značajno su se proširili te predstavljaju prijetnju u

cijeloj Hrvatskoj. Prema Vončini (2021.) A- i B- virus vinove loze značajno su zastupljeni na priobalnom području Hrvatske (GVA do 100% na pojedinim lokacijama), dok na kontinentalnim dijelovima njegova prisutnost iznosi oko 48%.

2.3. Pokušalište „Jazbina“

Vinogradsko–vinarsko pokušalište „Jazbina“ služi kao znanstveno–nastavno pokušalište Sveučilišta u Zagrebu Agronomskog fakulteta. Datira još od 1939. godine, a danas zauzima čak 8.5 hektara površine, od kojih šest hektara čine vinogradi (www.agr.unizg.hr) Pokušalište je smješteno u neposrednoj blizini fakulteta, te šume Dotršćina, na obroncima zagrebačkih gora (www.agr.unizg.hr). Koordinate pokušališta su 45°51'27" N, 16°00'16" E (slika 2.3.11). Pokušalište „Jazbina“ također je najveća kolekcija autohtonih sorata vinove loze u Hrvatskoj, a sorte obuhvaćene ovim istraživanjem bit će opisane u nastavku.



Slika 2.3.1. Satelitski prikaz pokušališta „Jazbina“ uz položaj kolekcije autohtonih sorata

(izvor:

<https://earth.google.com/web/search/poku%20a1ali%20te+jazbina/@45.85645215,16.003698,233.10483806a,632.10838994d,35y,29.44084402h,58.92767971t,360r/data=CoABGlYSUAolMHg0NzY1ZDlkMTYwNzIwZGE5OjB4ODliYTRkZmMyNjA3NzlkYhmr56T3je1GQCGy9tJvugAwQCoVcG9rdcWhYWxpxaF0ZSBqYXpiaW5hGAEGASImCiQJ66MarSbwRkAR3bz4TOfsRkAZxM4ss-8HMEAhtk5yUcD7L0A>)

2.3.1. Debit

Sorta Debit, sinonima Puljižanac, prema Maletiću i sur. (2015.) pripada rijetko ugroženim sortama čije je podrijetlo nepoznato, no smatra se da dolazi iz talijanske pokrajine Apulija. Najrasprostranjenija je na području Dalmacije, te pripada jednoj od najvažnijih bijelih sorata toga područja (Maletić i sur, 2015). Danas je zastupljen na 415,93 ha i pripada desetom mjestu po zastupljenosti u Republici Hrvatskoj (Andabaka, 2015).

2.3.2. Maraština

Mnogi ju smatraju autohtonom sortom Hrvatske iako je po karakteristikama identična talijanskom kultivaru Malvasia Lunga (Ivandija, 2008). Najvećim dijelom zastupljena je na području srednje i južne Dalmacije (Andabaka, 2015). Većinom nije glavni kultivar u vinogradima, već dolazi u kombinaciji s drugim bijelim sortama. Uzgaja se isključivo radi dobivanja vina, te se u prošlosti prošek ovog kultivara prodavao u ljekarnama (Maletić i sur, 2015). Pripada dvanaestom mjestu po zastupljenosti u Hrvatskoj, odnosno zastupljena je na 319,73 hektara (Andabaka, 2015).

2.3.3. Plavac mali

Plavac mali crni autohtona je Hrvatska sorta što je i potvrđeno pomoću SSR markera (Maletić i sur., 2015). Pripada vodećim sortama srednje i južne Dalmacije, no vinogradi ovog kultivara zastupljeni su i na otoku Krku, te u Dalmatinskoj Zagori. Zastupljen je na 1715,84 hektara vinograda, te pripada trećem mjestu po zastupljenosti u Hrvatskoj (Andabaka, 2015). Dobre je rodnosti, te minimalnih uzgojnih zahtjeva kao i osjetljivosti. Vino ovog kultivara prvo je vino zaštićenog zemljopisnog podrijetla u Republici Hrvatskoj (Maletić i sur., 2015).

2.3.4. Plavina

Porijeklo ove sorte nemoguće je sa sigurnošću utvrditi. Prema istraživanjama temeljenim na genetičkoj analizi utvrđeno je potomstvo sorte Primitivo. Od uvijek se smatrala autohtonom sortom Dalmacije iako je najrasprostranjenija na području Primorske Hrvatske. Uz sortu Plavac mali predstavlja vodeću crnu sortu vinogorja. Prema APPRRR (2013.) uzgaja

se na 701,91 ha. Rijeđe se proizvodi kao čisto sortno vino, već u kombinacijama s robusnijim vinima juga (Maletić i sur., 2015).

2.3.5. Pošip bijeli

Prema Maletić i sur (2015.) postojale su dvije hipoteze o podrijetlu ovo sorte od kojih je u jednoj utvrđeno da je Pošip bijeli autohtona Hrvatska sorta podrijetlom iz Korčule, a druga je glasila da je ovaj kultivar „donesen morem“. Točnost prve hipoteze dokazana je 2002. (Piljac i sur. godina) pomoću molekularnih markera. Koo što je prethodno navedeno, vinogradi Pošipa najviše su zastupljeni na otoku Korčuli, ali i po susjednim otocima, te području Dalmacije (Maletić i sur.,2015).



Slika 2.3.5.1. Kolekcijski nasad autohtonih sorata na pokušalištu „Jazbina“

2.4. Imunoenzimska metoda ELISA

Imunoenzimska ELISA metoda (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) je laboratorijsko – dijagnostički postupak koji koristi protutijela određenog virusa kako bi otkrio čestice kao što su peptidi, proteini, protutijela te hormoni (Meng i sur., 2017).

Prema Đurišić i sur. (2003.) analiza se sastoji od dvije osnovne reakcije, a to su imunološka i kemijska. Imunološku reakciju predstavlja reakcija epitopa (specifična antigena odrednica koja se pojavljuje u antigenu) i paratopa (mjesto vezanja antigena na protutijelo), dok kemijsku predstavlja reakcija enzima i supstrata koja se očitava u promjeni obojenja supstrata. Prvi puta su ju opisali Engwall i Perlmann (1971.) te je njihovo ispitivanje pratilo radioimunološko načelo nastalo 60-tih godina 20. stoljeća (Yalow i Berson, 1960). Umjesto mjerenja antigen (epitop) - protutijelo (paratop) reakcije korištenjem radioaktivnosti, ELISA se koristila enzimom (najčešće alkalna fosfataza). Prestankom korištenja radioaktivnih čestica, imunološki test počeo se koristiti u svrhe različitih laboratorijskih istraživanja. Uz to, uvođenjem plastike koja se presvlačila antigenom ili protutijelom, značajno su se pojednostavila testiranja. 1974. godine plastika je zamijenjena mikrotitarskim pločicama u svrhu dijagnosticiranja malarije (Voller i sur., 1974.), te se nakon toga metoda analize nije mnogo mijenjala. Prema Clark i Adams (1977.), metoda je korištena za detekciju biljnih virusa, među kojima je bio i virus mozaika gušarke (ArMV) što je doprinjelo naglom porastu korištenja ove metode u različite svrhe. ELISA je danas najčešće korištena serološka metoda za utvrđivanje prisutnosti ljudskih, animalnih, te biljnih virusa (Meng, 2017).

2.4.1. Protutijela

Pouzdanost rezultata izvedbe ELISA metode značajno ovisi o kvaliteti protutijela koja se koriste. Postoje dvije vrste protutijela, poliklonska i monoklonska (Meng, 2017.), a njihove razlike navedene su u tablici 2.4.1.1. Poliklonska protutijela (PAbs) proizvedena su u životinjama kao što su zečevi, ovce i koze. Ove životinje korištene su radi jednostavnosti smještaja i količine dobivenih protutijela. Proizvode se pri injektiranu pročišćenog virusa u životinju. Monoklonska protutijela (MAbs) proizvedena su najčešće jednim klonom limfocita B koji su ekstrahirani iz miša i hibridizirani sa stanicom mijeloma (Meng, 2017).

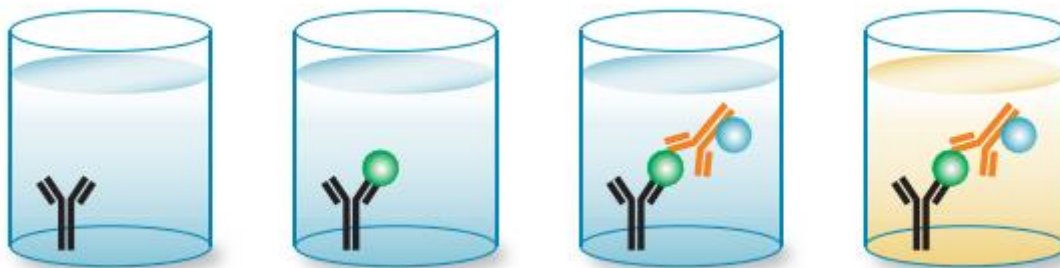
Tablica 2.4.1.1. Razlika između poliklonalnih i monoklonalnih protutijela koja se koriste u metodi ELISA (izvor: <https://hr.strephonsays.com/difference-between-monoclonal-and-polyclonal-antibodies>)

	POLIKLONSKA	MONOKLONSKA
RAZLIKA	Odnose se na mješavinu molekula imunoglobulina koje se izlučuju protiv određenog antigena	Odnose se na homogenu populaciju antitijela koja je proizvedena jednim klonom B stanica plazme
POPULACIJA ANTITIJELA	Heterogena	Homogena
INTERAKCIJA	Djeluju s različitim epitopima na istom antigenu	Djeluju s određenim epitopom na antigenu
VJEŠTINA	Manje zahtjevna	Zahtjevna
VRIJEME POTREBNO ZA PROIZVODNJU	Kraće	Duže
PREDNOSTI	→ Visoki afinitet → Tolerancija na manje promjene → Snažnija detekcija	→ Visoka specifičnost → Visoka reproduktivnost
CIJENA	Jeftinija	Skuplja

2.4.2. Četiri osnovne izvedbe metode ELISA

Metoda ELISA izvodi se najčešće na mikrotitarskim pločicama sa 96 jažica/bazenčića. Obično sama izvedba testa traje 2 dana, a ovo su četiri osnovne izvedbe:

1. DAS ELISA (*Double antibody sandwich ELISA*) – metoda koja se koristi sistemom „sendviča“, odnosno uzorak (antigen) se nalazi u sendviču između dva protutijela: primarnog i sekundarnog (slika 2.4.2.1). Za primarno protutijelo veže se antigen iz sirovog ekstrakta čije prisustvo se ispituje. Nakon ispiranja dodaju se konjugirana protutijela koja se vežu na antigen. U zadnjem koraku dodaje se enzim alkalna fosfataza koji stupa u reakciju sa supstratom te se očitavaju rezultati na osnovi promjeni boje koja označava prisutnost antigena (Đurišić i sur. 2003).



Slika 2.4.2.1. Shematski prikaz metode DAS- ELISA

(izvor: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>)

2. DASI ELISA (*Double antibody sandwich indirect ELISA*) - razlika između DAS i DASI ELISA-e je dodavanje tercijarnih protutijela konjugiranih enzimom koja se vežu na sekundarna protutijela, što je prikazano na slici 2.4.2.2. Glavna prednost ove vrste ELISA-e proizlazi iz visoke osjetljivosti na razlike u sastavu složenih smjesa antigena, čak i kada je specifično protutijelo za otkrivanje prisutno u relativno malim količinama (Meng, 2017).

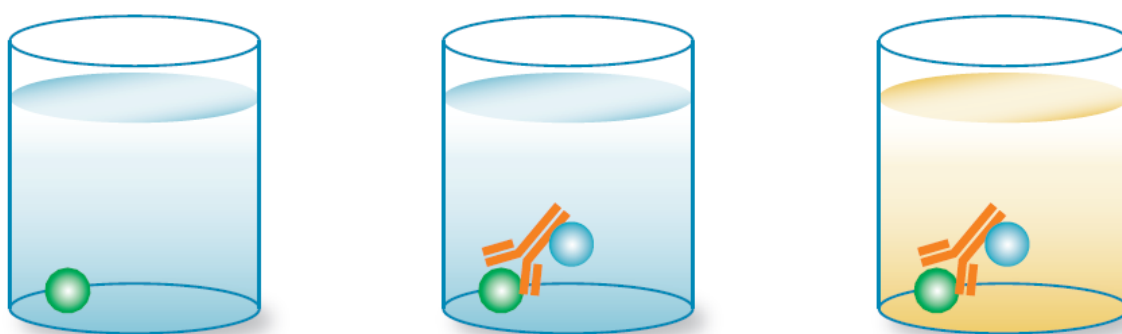


Slika 2.4.2.2. Shematski prikaz DASI ELISA testa

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

3. IZRAVNA (DIREKTNA) ELISA - antigen je imobiliziran u jažici mikrotitrarske pločice, te se zatim detektira protutijelom izravno konjugiranim na enzim (slika 2.4.2.3). Otkrivanje ovom metodom puno je brže od ostalih ELISA tehnika jer je potrebno manje koraka. Analiza je također manje sklona pogreškama jer je potrebno

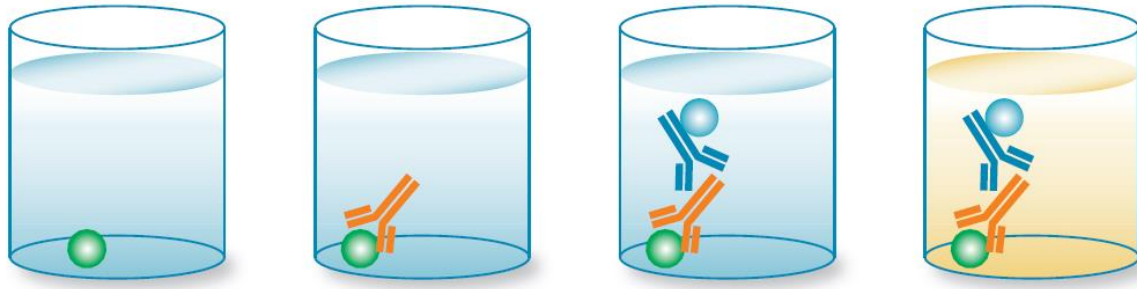
manje reagensa odnosno nije potrebno sekundarno protutijelo s potencijalnom unakrsnom reakcijom. Međutim, postoje nedostaci ove metode. Kako imobilizacija antigena nije specifična, može se primijetiti veći pozadinski efekt u usporedbi s neizravnim ELISA testom. To je prije svega zato što će se svi proteini u uzorku, uključujući i ciljani protein, vezati za ploču. Ova metoda je također manje fleksibilna jer je za svaki ciljani protein potrebno konjugirano primarno antitijelo. Kako se ne koristi sekundarno antitijelo, nema pojačanja signala, što smanjuje osjetljivost ispitivanja (Meng, 2017).



Slika 2.4.2.3. Shematski prikaz metode direktne ELISA-e

(izvor: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>)

4. NEIZRAVNA (INDIREKTNA) ELISA - Ova metoda osjetljivija je od izravne ELISA metode jer se više od jednog obilježenog sekundarnog antitijela može vezati na primarno protutijelo. Također je ekonomičnija od izravne ELISA-e, jer je potrebno manje obilježenih protutijela. Neizravna ELISA daje veću fleksibilnost jer se različita primarna protutijela mogu koristiti s jednim označenim sekundarnim antitijelom. Među nedostacima je mogućnost unakrsne reaktivnosti sekundarnog antitijela na adsorbirani antigen, što može povećati pozadinski efekt. Također, neizravnim ELISA testovima treba više vremena nego izravnim, jer je potreban dodatni korak inkubacije sekundarnog antitijela. Ova metoda najprikladnija je za određivanje ukupne koncentracije protutijela u uzorcima (Meng, 2017).



Slika 2.4.2.4. Shematski prikaz indirektne ELISA metode
(izvor: <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html>)

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

Laboratorijski dio istraživanja je proveden u sklopu Zavoda za fitopatologiju, Sveučilište u Zagrebu Agronomskog fakulteta, dok je terenski dio istraživanja proveden na vinogradarsko-vinarskom pokušalištu „Jazbina“. U razdoblju mirovanja vegetacije, 2020. i 2021. godine, skupljena je rozgva vinove loze iz kolekcijskog nasada autohtonih sorata. Sa svakog trsa uključenog u istraživanje uzeto je po tri dobro odrvenjele reznice iz bazalnog dijela trsa. Uzorci su označeni, stavljani u plastične vrećice u kojima su do testiranja čuvani u hladnjaku na temperaturi od 4 °C. Prilikom analiza korišteni su komercijalni ELISA-pribori tvrtke Agritest (Valenzano, Italija), a detaljan postupak analiza biti će prikazan u nastavku. Svaki od uzoraka testiran je na prisutnost osam virusa:

- Virus lepezastog lista vinove loze (GFLV) → DAS ELISA
- Virus mozaika gušarke (ArMV) → DAS ELISA
- Virus uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1) → DAS ELISA
- Virus uvijenost lista vinove loze pridruženi virus 2 (GLRaV-2) → DAS ELISA
- Virus uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3) → DAS ELISA
- A virus vinove loze (GVA) → DAS ELISA
- B virus vinove loze (GVB) → Indriketna ELISA
- Virus pjegavosti vinove loze (GFkV) → DAS ELISA

Sorte obuhvaćene istraživanjem bile su: Debit (jedan klon, 23 uzoraka), Maraština (dva klona, 47 uzoraka), Plavac mali (pet klonova, 153 uzoraka), Plavina (četiri klona, 79 uzoraka), te Pošip (četiri klona, 170 uzoraka).

3.2. Provedba metode ELISA

3.2.1. Priprema pufera, protutijela i kontrola

Za potrebu provedbe metode ELISA korišteni su puferi pripremljeni prema preporukama proizvođača (AgriTest, Valenzano, Italija). Koncentrati pufera razrjeđuju se u destiliranoj vodi u različitim omjerima nakon čega je pH pufera podešen na pH metru Z645060 RCT basic (IKA, Njemačka) korištenjem klorovodične kiseline (HCl) ili natrijeve lužine (NaOH). Preporuke proizvođača te nazivi pufera prikazani su u tablici 3.2.1.1, a puferi na slici 3.2.1.1.

Tablica 3.2.1.1. Priprema pufera prema preporukama proizvođača

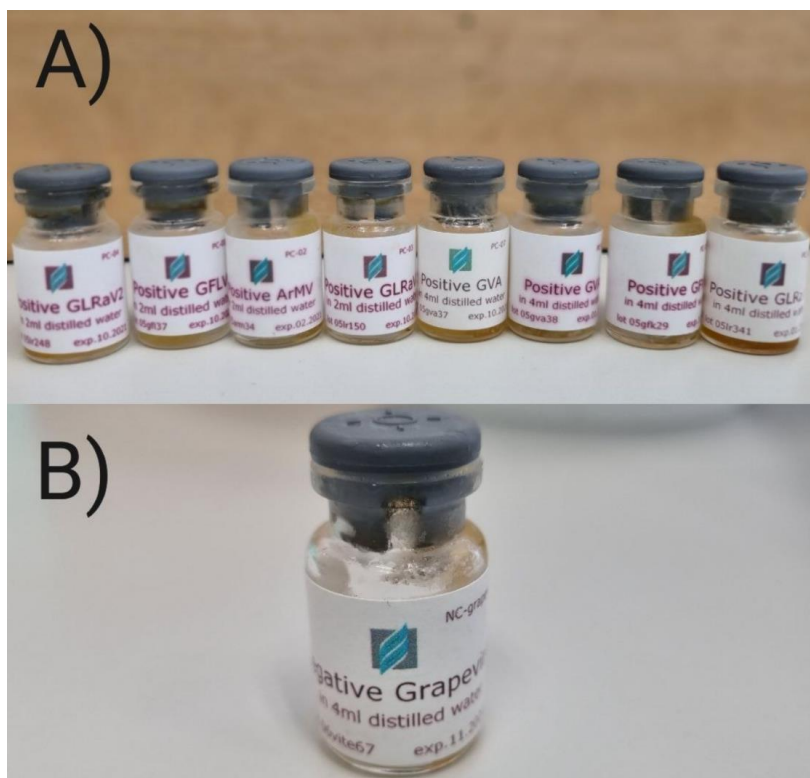
	OMJER	pH
PUFER ZA OBLAGANJE (Coating buffer)	1:4	9.6
EKSTRACIJSKI PUFER (Extraction grapevine)	1:3	8.2
KONJUGACIJSKI PUFER (Conjugate buffer)	1:4	7.4
SUPSTRATNI PUFER (Substrate buffer)	1:4	9.8 uz dodatak HCl
PUFER ZA ISPIRANJE (Washing buffer)	1:19	7.4



Slika 3.2.1.1. Razrijeđeni puferi za provedbu metode ELISA

Primarna protutijela pripremljena su prema preporukama proizvođača, te razrijeđena u puferu za oblaganje u omjeru 1:1000 za GFkV, GFLV, GLRaV-3, GVB, odnosno u omjeru 1:500 za GLRaV-1, GLRaV-2, ArMV, GVA. S druge strane, sekundarna protutijela pripremaju se u konjugiranom puferu, te su razrijeđena u omjerima 1:500 za GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3, ArMV, GFLV, GVA, GVB, odnosno 1:1000 za GFkV.

Za pozitivnu i negativnu kontrolu korištene su liofilizirane kontrole dobivene za priborom koje su prije korištenja razrijeđene s 2 odnosno 4 ml destilirane vode (slika 3.2.1.2.).



Slika 3.2.1.2. Pozitivne kontrole korištene u metodi ELISA (A) te uzorak negativne kontrole (B)

3.2.2. ELISA - prvi dan

Uzorci su primremljeni za analize na način da je od svakog uzorka odvagano 0,1 g floemskog biljnog tkiva dobivenog struganjem sa rozgve, te je pomoću tekućeg dušika u tarioniku smrvljen u tekuću homogenu smjesu na koju je dodano 1,5 ml ekstrakcijskog pufera. Tako pripremljen uzorak vinove loze premješten je u prethodno označenu tubicu (slika 3.2.2.1.).



Slika 3.2.2.1. Uzorak pripremljen za metodu ELISA

Nakon pripremljenih uzoraka, u jažicu se stavlja 100 ili 200 μ l pufera za oblaganje (ovisno o izvedbi) s otopljenim protutijelima. Tako pripremljene pločice, premještene su u termostat na inkubaciju u trajanju od 2 sata na 37°C (slika 3.2.2.2). Budući da se za detekciju GVB radila indirektna ELISA izvedba, na dno bazena se prvo stavljao antigen.



Slika 3.2.2.2. Inkubacija pločica s protutijelima u termostatu.

Nakon dva sata pločice su isprane tri puta puferom za ispiranje (200 µl po jažici). U isprane pločice s vezanim primarnim protutijelima puni se 100 ili 200 µl ekstrakta/uzorka po jažici, ovisno o izvedbi. U 92 jažice stavljeni su uzorci, dok su u 4 jažice stavljene kontrole (2 pozitivne, 2 negativne). Za GVA izvedbu, na antigen se odmah stavljaju sekundarna protutijela u količini 100 µl. Tako pripremljene jažice stavljaju se preko noći u hladnjak na 4°C. Zbog niskih temperatura antigen se sedimentira na dno i veže na primarno protutijelo.

3.2.3. ELISA - drugi dan

Pločice izvađene iz hladnjaka ponovno se ispiru istim postupkom kao prvi dan, te se pune sekundarnim, konjugiranim protutijelima, 100 ili 200 µl ovisno o izvedbi te se zatim stavljaju na inkubaciju (termostat 37 °C, 2h). Nakon ponovnog ispiranja jažice se pune supstratnim puferom, 100 µl po jažici za GVA, odnosno 200 µl po jažici za ostale, u kojem su prethodno otopljene tablete supstrata (p-nitrofenil fosfat) u omjeru 1 mg : 1ml. Pločice se prekrivaju folijom, te se inkubiraju na sobnoj temperaturi 2 sata. Rezultati, vidljivi u pojavi žute boje, su očitani vizualno, odnosno na spektrofotometru ELX 800 (Biotek, SAD), pri valnoj duljini od 405 nm. Pozitivnima na antigen su smatrani spektrofotometrijska očitavanja koja su iznosila 3x više od prosjeka očitavanja negativnih kontrola.

3.3. Simptomi virusnih infekcija

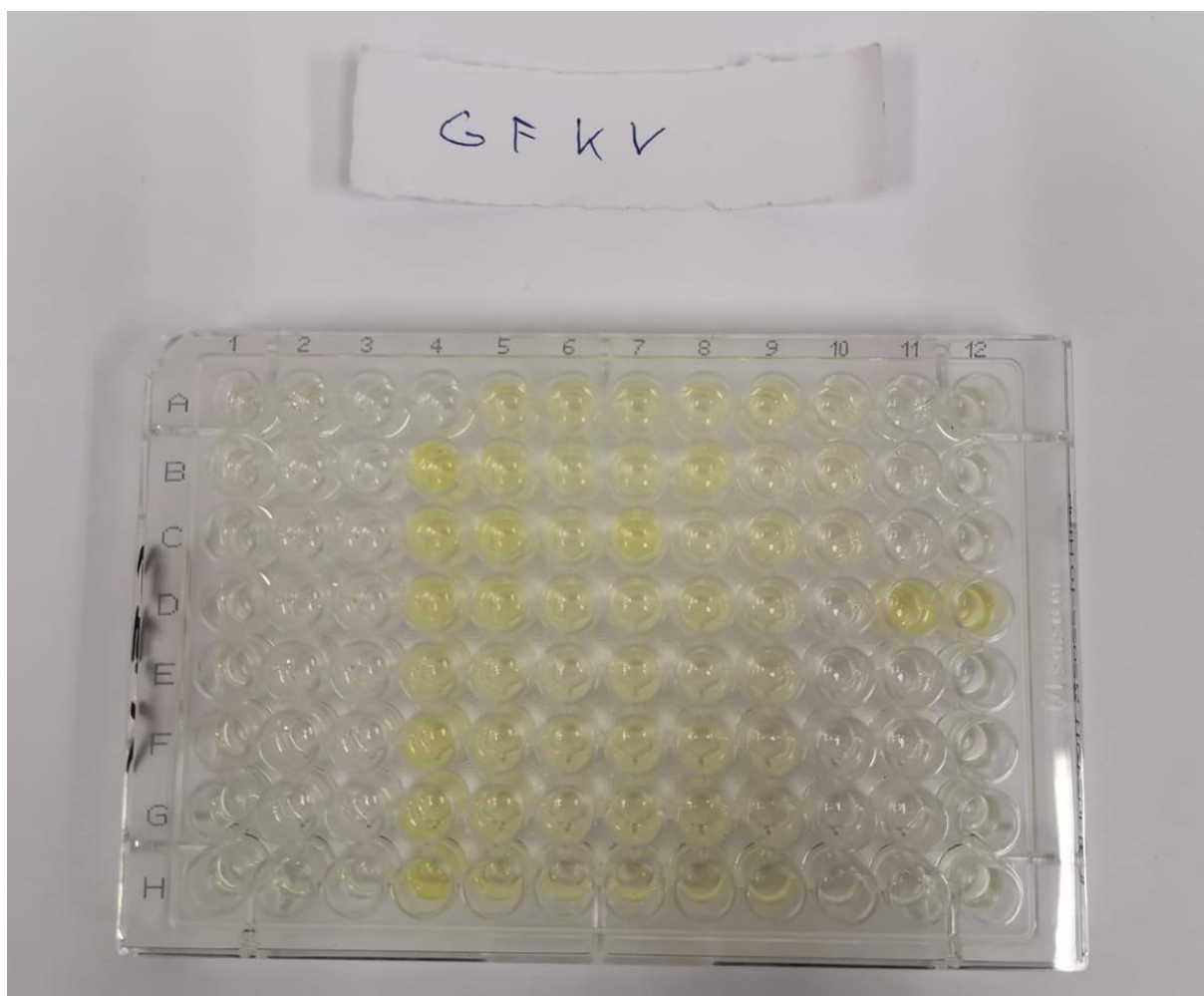
Vizualni pregled nasada obavljen je u srpnju 2021. godine, odnosno nakon što su rezultati laboratorijskih pokazali zarazu pojedinih trsova. Od vidljivih simptoma utvrđeni su jedino simptomi koji se mogu dovesti u vezu s virusima iz skupine naboranosti drva, odnosno A-virusom vinove loze, na sorti Plavac mali, klonu PMC-119. Na slici 3.3.1. vidljiv je karakterističan simptom zaraze s GVA u vidu zadebljanja na mjestu srašćivanja podloge i plemke. Budući da se vizualni pregled na zarazu izvršio nakon dobivenih rezultata, pojedini trsovi su bili iskrčeni. Simptomi karakteristični za ostale viruse potvrđene istraživanjem nisu primijećeni tijekom vizualanog pregleda.



Slika 3.3.1. Simptom naboranosti drva na sorti Plavac mali

4. Rezultati

Nakon provedenog ELISA testa, prvi rezultati mogu se primjetiti vizualno, a u vidu promjene boje pozitivnih uzoraka na antigen (slika 4.1.). Dva sata nakon dodavanja supstrata rezultati su očitani i na spektrofotometru, a detaljan prikaz rezultata dobiven za različite sorte, odnosno njihove klonove prikazan je u tablici 4.1.



Slika 4.1. Vizualno očitavanje rezultata. Žuto obojenje indicira uzorke u kojima je prisutan testirani virus (virus pjegavosti lista vinove loze – GFkV)

Tablica 4.1. Detaljan prikaz rezultata virusnih infekcija utvrđen metodom ELISA kod različitih sorata, odnosno njihovih klonova. Kratice – ArMV – virus mozaika gušarke, GFLV - virus lepezastog lista vinove loze, GLRaV-1 - uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, GLRaV-3 – uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3, GVA – A-virus vinove loze, GFkV – virus pjegavosti lista vinove loze, GVB – B-virus vinove loze, GLRaV-2 – uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2.

Sorta i oznaka klon	Broj testiranih uzoraka	Zaraženi uzorci	Broj uzoraka / trsova zaraženih s pojedinim virusom (%)							
			ArMV	GFLV	GLRaV - 1	GLRaV- 3	GVA	GFkV	GVB	GLRaV- 2
POŠ - 124	24	12 50	0	0	0	0	0	12 50	0	0
POŠ - 089	48	2 4,16	0	0	0	0	0	0	0	2 4,16
POŠ - 068	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
POŠ - 022	75	36 48	0	0	0	0	0	36 48	0	0
POŠIP	170	50 29,41	0	0	0	0	0	48 28,23	0	2 1,66
DEB - 265	23	19 82,60	0	0	0	0	0	18 78,26	0	1 4,34
DEBIT	23	19 82,60	0	0	0	0	0	18 78,26	0	1 4,34
PLA-292	23	0 0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLA-264	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLA-224	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLA-019	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PLAVINA	79	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PMC-119	24	19 79,16	0	0	0	0	19 79,16	0	0	0
PMC-116	23	2 8,69	0	0	1 4,34	1 4,34	0	0	0	0
PMC-099	25	2 8	1 4	0	1 4	0	0	0	0	0
PMC-095	25	2 8	0	0	0	0	0	0	0	2 8
PMC-025	56	4 7,14	0	0	0	0	0	4 7,14	0	0

PLAVAC MALI	153	29 18,95	1 0,65	0	2 1,30	1 0,65	19 12,41	4 2,61	0	2 1,30
MAR-045	31	10 32,25	0	0	1 3,22	1 3,22	0	8 25,80	0	0
MAR-027	16	1 6,25	0	0	0	0	0	1 6,25	0	0
MARAŠTINA	47	11 23,40	0	0	1 2,12	1 2,12	0	9 19,14	0	0
UKUPNO	472	109 23,09	1 0,02	0	3 0,63	2 0,42	19 4,02	79 16,73	0	5 1,05

Kao što je vidljivo u tablici broj 4.1. na sorti Pošip, od testiranih 170 uzoraka, 48 njih pokazalo pozitivne rezultate na GFkV, odnosno 28,23% od ukupnog broja testiranih uzoraka. Dva uzorka odnosno 1,66% zaraženo je virusom GLRaV-2. Na 23 analizirana uzorka sorte Debit, 18 uzoraka (78,26%) bilo je pozitivno na GFkV, a jedan uzorak (4,34%) na GLRaV-2. Sorta Plavina imala je ukupno 79 testiranih uzoraka i nije bila pozitivna niti na jedan virus. Od 153 uzorka sorte Plavac mali jedan uzorak (0,65%) bio je pozitivan na ArMV, dva uzorka (1,30%) na GLRaV-1, jedan uzorak (0,65%) bio je pozitivan na GLRaV-3, 19 uzoraka (12,41%) na GVA, četiri uzorka (2,61%) na GFkV te je dva uzorka (1,30%) pokazalo pozitivne vrijednosti GLRaV-2. Od 47 analiziranih uzoraka sorte Maraština, jedan (2,12%) je bio pozitivan na GLRaV-1, jedan (2,12%) uzorak pokazao je pozitivne vrijednosti na GLRaV-3, dok je devet uzoraka (19,14%) bilo je pozitivno na GFkV.

Osim pojedinačnih infekcija kod različitih sorata utvrđene su i istovremene zaraze, odnosno mješovite infekcije, sa dva, tri ili čak šest virusa. Detaljan prikaz pojedinačnih, mješovitih i bezvirusnih trsova prikazan je u tablici 4.

Tablica 4.2. Broj testiranih uzoraka, onih bez virusa te sa pojedinačnim i mješovitim infekcijama utvrđen kod sorata Pošip, Debit, Plavina, Plavac mali te Maraština korištenjem metode ELISA.

Sorta i oznaka klona	Broj testiranih uzoraka	Broj uzoraka bez virusa %	Broj uzoraka/trsova zaraženih s različitim brojem virusa (1-6) %					
			1	2	3	4	5	6
Pošip	170	120 70,58	0	50 29,41	0	0	0	0

Debit	23	4 17,23	0	19 82,62	0	0	0	0
Plavina	79	79 100	0	0	0	0	0	0
Plavac mali	153	124 81,04	0	0	0	0	0	29 18,95
Maraština	47	36 76,59	0	0	11 23,40	0	0	0
Ukupno	472	363	0	69	11	0	0	29
%		76,90	0	14,61	2,33	0	0	6,14

U tablici broj 4.2. vidljivo je da najveći broj uzoraka u isto vrijeme zaraženo s dva virusa, to jest 14,61% uzoraka. S tri virusa zaraženo je 11 uzoraka (2,33%), dok je s najvišim brojem virusa (šest) zaraženo 6,14%, odnosno 29 uzoraka/trsova sorte Plavac mali.

U tablici broj 4.1. detaljnije su navedeni uzorci po pojedinim virusima. U kombinaciji s tablicom broj 3.2. može se izvesti zaključak s točnom kombinacijom virusa na pojedinoj sorti tako da kombinacija dva virusa GFkV i GLRaV-2 nalazi se na sortama Pošip i Debit, a ukupan broj uzoraka je 69, što čini 14,61% od ukupnog broja testiranih uzoraka. Kombinacija tri virusa, GLRaV-1, GLRaV-3, te GFkV nalazi se na sorti Maraština i ukupan broj uzoraka je 11, odnosno 2,33%. Kombinaciju šest virusa čini ArMV, GLRaV-1, GLRaV-3, GVA, GFkV, te GLRaV-2 na 29 uzoraka (6,14%) sorte Plavac mali.

5. Rasprava

Vegetativno razmnožavanje biljaka, kao i prijenos vektorima glavni su načini širenja virusa na vinovoj lozi (Meng, 2017). Jedan od glavnih problema detekcije je što pojava i jačina simptoma ovisi o mnogo faktora, kao što su starost biljke, soj virusa, klimatski uvjeti, podloga i mnogi drugi (Fazinić i Ivić, 2011). Vrlo često problem je njihova “nevidljiva”, odnosno latentna zaraza te je jedini način detekcije moguć laboratorijskim metodama kao što su serološke (ELISA), molekularne (RT-PCR), te biološki testovi (indeksiranje, mehanička inokulacija).

Uzorci testirani u ovome radu rezultat su sanitarne i klonske selekcije provedene 2007/2008. godine (Vončina i sur., 2011.) u kolekcijskom nasadu Nacionalne zbirke autohtonih sorata u Jazbini (Zagreb), te na lokalitetu Risika na Krku. Pupovi njihovih matičnih biljaka posađeni su na lokalitetu Baštica (kod Zadra), te su u tom postupku biljke testirane na virus mozaika gušarke (ArMV), virus lepezastog lista vinove loze (GFLV), uvijenosti lista pridruženi virus 1 (GLRaV-1), uvijenosti lista pridruženi virus 2 (GLRaV-2), uvijenosti lista pridruženi virus 3 (GLRaV-3), te A-virus vinove loze (GVA), ali nisu bile testirane na virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV) koji se širi vegetativnim razmnožavanjem te cijepljenjem (Constable i sur., 2011). To je rezultiralo visokom zarazom GFkV u kolekcijskom nasadu Jazbina. Trenutno važeće hrvatsko zakonodavstvo za sadni materijal vinove loze zahtjeva testiranje rasadnika na četiri virusa (ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2) dok se podloge dodatno moraju testirati na prisutnost GFkV (Vončina i sur., 2011.). Iako su dosadašnja istraživanja pokazala dominantnost zaraze uvijenosti lista pridruženim virusom 3 (GLRaV-3), najviše na području Istre i Dalmacije, u ovome radu rezultat analize na 472 uzorka pokazali su zarazu na samo dva, odnosno na sorti Plavac mali te Maraština (ukupno 2,12%). Pozitivne vrijednosti na uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (GLRaV-2) i A- virus vinove loze (GVA) mogu se povezati s pojavom lisnih uši u vrlo velikoj populaciji 2015. godine na lokalitetu Baštica kod Zadra koje su viruse vjerojatno donjele iz okolnih komercijalnih vinograda. Najmanji broj uzoraka bio je zaražen s virusom mozaika gušarke (ArMV) odnosno samo jedan uzorak (0,02%) na sorti Plavac mali. Kako navodi Poljuha i sur (2010.) i ostala istraživanja na području Hrvatske, ArMV vrlo je rijedak, stoga su ovakvi rezultati bili očekivani. Podsjetimo se da je u istraživanju Karoglan Kontić i sur. (2009.) na testiranih 1352 uzorka, dijagnosticirano samo na 23 uzorka od čega dva na kontinentalnom dijelu Hrvatske. Svi testirani uzorci/trsovi bili su slobodni od virusa iz skupine infektivne degeneracije, odnosno

virusa lepezastog lista vinove loze (GFLV) koji se prenosi kopljastom nematodom (*Xiphinema index*), stoga se može reći da u blizini nasada nije bilo izvora virusa. Također, svi su uzorci bili slobodni od B-virusa vinove loze (GVB). U istraživanju Vončine i sur. (2011.) testirano je po 95 uzoraka iz dva kolekcijska nasada: Jazbina i Risika. Rezultati analize pokazali su minimalnu zarazu ovim virusom, odnosno samo dva uzorka na lokalitetu Jazbina (2,1%), te jedan uzorak (1,1%) na lokalitetu Risika, stoga možemo reći da i ovaj virus pripada kategoriji 'rijetkih' na području Hrvatske.

6. Zaključci

Provedenim istraživanjem na 5 hrvatskih autohtonih sorata (Pošip, Debit, Plavina, Plavac mali te Maraština) može se zaključiti:

1. Od 472 uzorka, na 79 (16,73%) uzoraka potvrđena je zaraza virusom pjegavosti lista vinove loze (GFkV), 19 uzoraka (4,02%) pokazalo je pozitivne vrijednosti na A-virus vinove loze (GVA), pet uzoraka (1,05%) su bila pozitivna na uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (GLRaV-2), tri uzorka (0,63%) bilo je pozitivno na uvijenosti lista pridruženi virus 1 (GLRaV-1), dva uzorka (0,42%) bilo je pozitivno na uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3), jedan uzorak (0,42%) bio je pozitivan na virus mozaika gušarke (ArMV), dok virus lepezastog lista vinove loze (GFLV) i B-virus vinove loze (GVB) nisu dijagnosticirani.
2. Od 472 uzorka, 363 uzorka (79,60%) bilo je slobodno od virusa.
2. Od 170 uzoraka sorte Pošip, 48 uzoraka (28,23%) bilo je pozitivno na virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV), te dva uzorka (1,66 %) na GLRaV-2.
3. Kod sorte Plavac mali dijagnosticirana je kombinacija zaraze sa šest virusa. Od 153 testirana uzorka, njih 19 (12,41%) pokazalo pozitivne vrijednosti na A-virus vinove loze (GVA), četiri uzorka (2,61 %) na virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV), po dva uzorka (1,30 %) na uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1) i uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (GLRaV-2) te po jedan uzorak (0,65%) na virus mozaika gušarke (ArMV) i uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3).
4. Od 47 testiranih uzoraka sorte Maraština, njih 9 (19,14%) bilo je pozitivno na virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV), te po jedan uzorak (2,12%) na uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 (GLRaV-1) i uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3).
5. Najbolje zdravstveno stanje utvrđeno je kod sorte Plavina gdje na 79 testiranih uzoraka nije utvrđena prisutnost niti jednog od virusa obuhvaćenih istraživanjem.

7. Literatura

1. Andabaka, Ž. (2015). Ampelografska evaluacija autohtonih dalmatinskih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Doktorski rad. Agronomski fakultet.
2. Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, L., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., Fuchs, M. (2004). Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*. Springer, Pisa. 86 (3), 183 – 195.
3. Bagi, F., Jasni, S., Budakov, D. (2016). Viroze vinove loze. Poljoprivredni fakultet. Novi Sad.
4. Constable, F., Radoni, B. (2011). Grapevine fleck associated viruses. *Wine australia*. < www.wineaustralia.com > - Pristupljeno 19.7. 2021.
5. 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.
6. Ivandija, T. (2008). Autohtone vinske sorte. Stručni rad. *Glasnik zaštite bilje* 6/2008.
7. Ivić, D., Fazinić, T., (2011). Gospodarski značajni virusi vinove loze. Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo. Zavod za zaštitu bilja, Zagreb.
8. 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 (2): 1-5.
9. Little, A., Fazeli, F., C., Rezaninan, M., A. (2001). Hypervariable genes in grapevine leafroll associated virus 1. Short communication. *Csiro Plant Industry and cooperative centre for viticulture*. Australia. 1009 – 116
10. Maletić, E., Kontić, J., J., Pejić, I., Preiner, D., Zdunić, G., Bubola, M., Stupić, D., Andabaka, Ž., Marković, Z., Šimon, S., Mihaljević, Ž., M., Ilijaš, I., Marković, D. (2015). Zelena knjiga vinove loze. Državni zavod za zaštitu prirode. Zagreb.
11. Meng, B., Martelli, P. G., Golino, D., Fusch, M., (2017). Grapevine viruses: Molecular biology, Diagnostics and Management. Springer. 978: 409 - 431.

12. Pavletić, B. (2019). Detekcija virusa u hrvatskim autohtonim kultivarima vinove loze metodom RT-PCR prije i nakon ozdravljivanja. *Rektorski rad. Prirodoslovno matematički fakultet,* Zagreb.

13. Pokušalište Jazbina <
<https://www.agr.unizg.hr/hr/group/209/Poku%C5%A1ali%C5%A1te+Jazbina>> - Pristupljeno 19.7.2021.

14. Poljuha, D., Sladonja, b., Bubola, M. (2010). Incidence of viruses infecting grapevine varieties in Istria (Croatia). *Journal of food, agriculture & environment.* (8): 166 – 169.

15. Poturiček, L. (2019). Monitoring pojave vrsta nematoda prenosioca virusa iz roda *Xiphinema* u vinogradima Vukovarsko-srijemske, Osječko baranjske i Istarske županije, 2018. godine. *Diplomski rad.* Sveučilište Osijek.

16. Tomažič, I., Petrovič, N., Korošec-Koruza, Z., (2005). Effects of rugose wood and GLRaV-1 on yield of cv. Refošk grapevines. *Acta Agriculturae Slovenica.* 91-96.

17. Vončina D. (2011). Utvrđivanje virusa na autohtonim sortama vinove loze (*Vitis vinifera* L.) u Dalmaciji serološkim, molekularnim i biološkim metodama. *Doktorska disertacija.* Agronomski fakultet. Zagreb.

18. Vončina D. (2021). Rasprostranjenost ekonomski važnih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj i njihov utjecaj na vinogradsku proizvodnju. *Glasilo biljne zaštite* 3/2021. Agronomski fakultet Zagreb.

19. Vončina, D., Badurina. D., Preiner, D., Cvjetković, B., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., (2011). Incidence of virus infections in grapevines from Croatia collection plantations. *Phytopathol. Mediterr.* 316-326.

20. 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 clonal selection. *Journal of Central European Agriculture.* 20 (1). 262 – 273.

7.1. Slike

1. Slika 2.1.1.1. < <https://www.nexles.com/articles/grapevine-fanleaf-grapevine-fanleaf-virus/> > Pristupljeno 18. srpnja 2021.
2. Slika 2.1.2.1. < <https://gd.eppo.int/taxon/ARMV00/distribution> > Pristupljeno 18. srpnja 2021.
3. Slika 2.1.3.1. < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00082/full> > Pristupljeno 19. srpnja 2021.
4. Slika 2.1.4.1. < <https://www.wineaustralia.com/getmedia/b1e5038d-cc30-48d8-b3c2-25844af8e795/201107-Grapevine-fleck-and-associated-viruses?ext=.pdf> > Pristupljeno 19. srpnja 2021.
5. Slika 2.1.5.1. < <https://glossary.wein.plus/rugose-wood-complex> > Pristupljeno 19. srpnja 2021.
6. Slika 2.3.1. < <https://earth.google.com/web/search/poku%c5%a1ali%c5%a1te+jazbina/@45.85645215,16.003698,233.10483806a,632.10838994d,35y,29.44084402h,58.92767971t,360r/data=CoABGlYSUAolMHg0NzY1ZDlkMTYwNzIwZGE5OjB4ODliYTRkZmMyNjA3NzlkYhmr56T3je1GQCGy9tJvugAwQCoVcG9rdcWhYWxpxaF0ZSBqYXpiaW5hGAEGASImCiQJ66MarSbwRkAR3bz4TOfsRkAZxM4ss-8HMEAhtk5yUcD7L0A> > Pristupljeno 20.7. 2021.
7. Slika 2.4.2.1. < <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html> > - Pristupljeno 20.7.2021.
8. Slika 2.4.2.2. < <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html> > - Pristupljeno 20.7.2021.
9. Slika 2.4.2.3. ELISA basics guide. Author: Bio – Rad Laboratories, Inc. < <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/Lit-pdfs/Brochures1/elisa-basics-guide.pdf> > - Pristupljeno 21.7.2021
10. 2.4.2.4. ELISA basics guide. Author: Bio – Rad Laboratories, Inc. < <https://www.bio-rad-antibodies.com/static/Lit-pdfs/Brochures1/elisa-basics-guide.pdf> > - Pristupljeno 21.7.2021

Tablice

1. Tablica 2.4.1.1. Razlika između poliklonalnih i monoklonalnih protutijela koja se koriste u metodi ELISA (izvor: <https://hr.strephonsays.com/difference-between-monoclonal-and-polyclonal-antibodies>) – Pristupljeno 20.7.2021.
2. Tablica 2.4.1.1. Razlika između poliklonalnih i monoklonalnih protutijela koja se koriste u metodi ELISA (izvor: <https://hr.strephonsays.com/difference-between-monoclonal-and-polyclonal-antibodies>)
3. Tablica 4.1. Detaljan prikaz rezultata virusnih infekcija utvrđen metodom ELISA kod različitih sorata, odnosno njihovih klonova. Kratice – ArMV – virus mozaika gušarke, GFLV - virus lepezastog lista vinove loze, GLRaV-1 - uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, GLRaV-3 – uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3, GVA – A-virus vinove loze, GFkV – virus pjegavosti lista vinove loze, GVB – B-virus vinove loze, GLRaV-2 – uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2.
4. Tablica 4.2. Broj testiranih uzoraka, onih bez virusa te sa pojedinačnim i mješovitim infekcijama utvrđen kod sorata Pošip, Debit, Plavina, Plavac mali te Maraština korištenjem metode ELISA.

8. Životopis

Elena Zrnić rođena je 1.1.1995. godine u Zagrebu. Nakon završene Prirodoslovne škole Vladimira preloga, smjer „Geološki tehničar“ upisuje preddiplomski studij „Zaštita bilja“ na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Titulu univ. bacc. ing. stječe 2019. godine obranom završnog rada naslova „Virus šarke šljive“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Edyte Đermić. Iste godine upisuje diplomski studij „Fitomedicina“ na Agronomskom fakultetu u Zagrebu te izrađuje diplomski rad pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Darka Vončine u sklopu Zavoda za fitopatologiju.

Dio je obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva koje se bavi uzgojem i preradom ljekovitog i aromatičnog bilja te se u slobodno vrijeme bavi izradom prirodne kozmetike, macerata i hidrolata. Nakon završenog Agronomskog fakulteta, u planu je upisati studij Fitoaromaterapije na privatnom učilištu Galbanum kako bi usavršila svoj daljni rad.