Ekonomski značajni virusi vinove loze u vinogradima u okolici Poreča

Đurić - Stjepanović, Kristian

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:872996

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U VINOGRADIMA U OKOLICI POREČA

DIPLOMSKI RAD

Kristian Đurić-Stjepanović

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Fitomedicina

EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U VINOGRADIMA U OKOLICI POREČA

DIPLOMSKI RAD

Kristian Đurić-Stjepanović

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, rujan, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Kristian Đurić-Stjepanović**, JMBAG 0178112445, rođen 28.06. 1996. u Nürnbergu,

izjavljujem da sam samostalno izradio diplomski rad pod naslovom:

EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U VINGORADIMA U OKOLICI POREČA

Svojim potpisom jamčim:

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

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Kristian Đurić-Stjepanović**, JMBAG 017811244, naslova

EKONOMSKI VAŽNI VIRUSI VINOVE LOZE U VINOGRADIMA U OKOLICI POREČA

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. sc. Darko Preiner	član	_____

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

Zahvala

Ovom prilikom želim se zahvaliti svim ljudima koji su bili tu za mene u teškim situacijama, koji su me bodrili, motivirali i gurali prema naprijed kada sam to nisam mogao. Veliki dio te zahvale želim uputiti svom mentoru Darku Vončini, izv.prof. dr. sc. Prvenstveno radi toga što mi je pružio priliku da svoje zadnje prevaljene stepenice prema završetku diplomskog studija Fitomedicine na Agronomskom fakultetu u Zagrebu privedem kraju uz njegovo vođenje i mentorstvo tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste mi kroz svoje stručne, profesionalne i korisne savjete davali sve potrebne informacije koje su na kraju oblikovali ovaj rad. Zahvalio bi Vam se i radi toga što sam stekao nove spoznaje i znanja koje će mi svakako dobro koristiti u bliskoj budućnosti. Također bi se zahvalio svom neposrednom voditelju diplomskog rada, Martinu Jaguniću, mag. ing. agr. bez kojeg eksperimentalni dio istraživanja ne bi bio moguć te radi toga što mi je u svakoj danoj situaciji nastojao dati svoje stručno mišljenje i njegovu stranu gledišta. Veliko hvala i svim profesorima Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su me tijekom svih ovih 5 godina studiranja nastojali učiniti akademskim čovjekom sa diplomom. Tijekom eksperimentalnog dijela rada unutar Zavoda za fitopatologiju upoznao sam dobre i tople ljude koji bi uskočili u pomoć u bilo kojem trenutku čak i kada sam ostao u sjeni svoga razmišljanja, svi oni zajedno ostavili su mi veliki smiješak na kraju svog fakultetskog obrazovanja.

Zahvaljujem se tvrtki Agrolaguna d.d. na ustupanju vinograda za istraživanje te gospodinu Milanu Budinskom, dipl. ing. agr. na pomoći oko organizacije i prikupljanja uzoraka.

Na kraju zahvale želim istaknuti svoju majku, obitelj i prijatelje koji su bili tu za mene u svakoj mojoj točki u životu, kako u dobroj tako i u lošoj. Hvala Vam što ste bili puni razumijevanja, strpljenja i što ste mi predstavljali podršku i riječi ohrabrenja. Radi Vas sam postigao svoje uspjehe u akademskim godinama i kakva god da me snašla prepreka u budućnosti znam da ću je proći bez ikakvog problema.

Hvala Vam svima od srca!

SADRŽAJ

1. Uvod 1

1.1 Cilj istraživanja 2

2. Pregled literature: 3

2.1. Značaj vinove loze u svijetu 3

2.2. Značajni virusi vinove loze 5

2.2.1. Virus lepezastog lista vinove loze (Grapevine fanleaf virus, GFLV) 6

2.2.2. Virus mozaika gušarke (Arabis mosaic virus, ArMV) 8

2.2.3. Virusi iz skupine uvijenosti lista vinove loze (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3) 9

2.2.4. Virusi iz skupine naboranosti drveta (Rugose wood complex) 9

2.2.5. Virus pjegavosti lista vinove loze (Grapevine fleck virus, GFkV) 12

2.3. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA) 13

3. Materijali i metode rada 14

3.1. Lokacije uzorkovanja 14

3.2. Odabir trsova unutar vinograda 15

3.2.1. Postupak provođenja enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi – ELISA 15

4. Rezultati istraživanja 19

5. Rasprava 22

6. Zaključci 25

8. Literatura 26

9. Kratka biografska bilješka 31

Sažetak

Diplomskog rada studenta **Kristiana Đurića-Stjepanovića**, naslova

EKONOMSKI ZNAČAJNI VIRUSI VINOVE LOZE U VINOGRADIMA U OKOLICI POREČA

U svijetu je otkriveno preko 86 različitih vrsta virusa koji parazitiraju unutar vinove loze, od kojih samo mali broj predstavlja ekonomski značajne viruse. Predstavnici važnih virusnih bolesti vinove loze, ovisno o literaturi i regiji uzgoja, uglavnom se ubrajaju u osam virusa koji pripadaju trima skupinama: infektivna degeneracija (virus mozaika gušarke - ArMV, virus lepezastog lista vinove loze - GFLV), uvijenost lista (uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1,2 i 3 - GLRAV-1,2,3) i skupini naboranosti drveta vinove loze (A-virus vinove loze - GVA i B-virus vinove loze - GVB). Uz prethodno navedene pripadnike obično se pribraja i virus pjegavosti vinove loze (GFkV). Cilj istraživanja bio je utvrditi prisutnost ekonomski značajnih virusa vinove loze unutar vinograda u okolici Poreča. Uzorci su prikupljeni sa 7 različitih lokacija te su bili podvrgnuti testiranju korištenjem imuno-enzimske metode na čvrstoj fazi (ELISA). Potvrđena je prisutnost svih ekonomski značajnih virusa vinove loze. Najzastupljeniji među njima bio je GLRaV-3 (50,1%), zatim ga slijede: GVA (18,3%), GFkV (7,8%), GLRaV-1 (4,3%), GFLV (2,8%), GLRaV-2 (1,5%) te se na zadnjem mjestu nalazi prisutnost ArMV (0,3%). Također je utvđena prisutnost mješovitih infekcija gdje je najzastupljeniji kompleks GLRaV-3 + GVA - 16,6 %, s druge strane potvrđene su i druge kombinacije, ali njihov postotak nije bio veći od 6 %.

Ključne riječi: vinova loza, ekonomski značajni virusi, ELISA, mješovite infekcije,

Summary

Of the emaster's thesis - student **Kristian Đurić-Stjepanović**, entilted

ECONOMICALLY IMPORTANT VIRUSES IN VINEYARDS NEAR POREČ

Over 86 different types of viruses that parasitize within the grapevine have been discovered worldwide, of which only a small number constitute economically significant viruses. Representatives of important grapevine viral diseases, depending on the literature and the region of cultivation, are mainly included in eight viruses that belong to three groups: infectious degeneration (*Arabis mosaic virus* - ArMV, *Grapevine fanleaf virus* - GFLV), grapevine leafroll (*Grapevine leafroll-associated virus -1, 2 and 3* - GLRaV-1, 2 i 3) and rugose wood (*A-grapevine virus* - GVA and *B-grapevine virus* - GVB). In addition to the aforementioned groups, the *Grapevine fleck virus* (GFkV) is usually concluded. This study aimed to determine the presence of economically important grapevine viruses within vineyards in the vicinity of Poreč. Samples were collected from 7 different sites and were subjected to the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The presence of all economically important grapevine viruses was confirmed. The most common among them was GLRaV-3 (50,1%), followed by: GVA (18,3%), GFkV (7,8%), GLRaV-1 (4,3%), GFLV (2,8%), GLRaV-2 (1,5%) and in the last place is the presence of ArMV (0,3%) The presence of mixed infections was also confirmed, with GLRaV-3 + GVA - 16,6 % as most common combination. On the other hand, other mixed infections were confirmed, but their percantage did not exceed more than 6 %.

Key words: grapevine, economically important viruses , ELISA, mixed infections

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera L.)* je jedna od najrasprostranjenijih drvenastih kultiviranih vrsta koja potječe iz Europe i zapadne Azije. Karakterizira je bogata povijest koja je doprinijela njenom širenju i domestikaciji na nova područja te je danas uzgoj vinove loze, proizvodnja grožđa i njegova prerada, raširena na gotovo svim kontinentima, izuzev Antarktika (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).

Hrvatska kao zemlja s bogatim rasponom klime (kontinentalna i mediteranska) veoma je pogodna za razvoj i uzgoj vinove loze. Upravo tako povoljan ekološki položaj „lijepe naše" razvio je izvanredne autohtone sorte koje pod utjecajem specifičnih agroekoloških uvjeta našeg geografskog područja daju značajne proizvodne rezultate. Raznolikost asortimana, suvremeno znanje i tehnologija daju prepoznatljive kvalitetne i vrhunske proizvode. Proizvode koji mogu naći svoje mjesto i na izbirljivom svjetskom tržištu (Bišof i Herjavec, 1996). Tako na području Primorske Hrvatske najzastupljenija autohtona sorta je Malvazija istarska (19,6 %), a zatim slijede Plavac mali (16,6%), Plavina (6,4%), Trbljan (5,5%), Kujnđuša (3,9%), Babić (3,4%), Debit (3,3%) te Maraština (3%) (Vončina, 2011). U Republici Hrvatskoj vinogradarstvo predstavlja jednu od vodećih gospodarskih grana, iako se u novijim istraživanjima i provođenjem statističkih podataka bilježi pad vinogradarskih površina (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu; godišnje izvješće, 2019). Prema podacima Vinogradarskog registra (APPRRR, 2019) Republika Hrvatska ima 19.022,09 ha vinogradarskih površina, ali iste te godine zabilježen je nagli pad koji je rezultirao sa krčenjem 686,30 ha vinograda. U usporedbi sa svjetskim površinama unutar zadnjeg desetljeća, pad vinogradarskih površina u Hrvatskoj iznosi čak 43 % (14 000 ha). Prema Maletiću i sur. (2015) prije pojave vinogradarske krize koju je prouzrokovala filoksera (*Daktulosphaira vitifoliae*) u Hrvatskoj je bilo više od 400 sorata vinove loze. Danas je njihova brojka drastično smanjena radi propadanja vinograda djelovanjem štetnika, gljivičnih bolesti i kriptogenih bolesti koje uzrokuju virusi (npr. *Daktulosphaira vitifoliae, Plasmopara viticola, Erysiphe necator,* GLRAV-1,2,3, GFLV, ArMV, itd.). Radi trenda pada vinogradarskih površina, zadnjih godina su uloženi veliki napori kako bi se očuvala bioraznolikost vinove loze. U zadnjim desetljećima pokrenuti su nizevi različitih projekta koji potiču revitalizaciju, zaštitu i popularizaciju autohtonih sortimenata vinove loze unutar cijele Hrvatske (Andabaka i sur. 2011; Maletić i sur. 2015).

U vinogradarskoj regiji Primorske Hrvatske, podregija Istra sa svoja tri vinogorja (zapadna, centralna i istočna Istra) čini specifičan areal u kojem se uzgajaju mnogobrojne autohtone i introducirane sorte vinove loze (*Vitis vinifera* L.) (Ilak i Radeka, 2014). Istra pripada jednoj od starijih vinogradarskih regija, smještena na sjeverozapadu Hrvatske čije vinogradarske površine zauzimaju oko 3.030 ha, što čini oko 18 % hrvatskog vinogradarskog područja (Poljuha i sur. 2010). Kultura vinove loze na području Istarskog poluotoka seže još iz antičkih vremena od doba starih Rimljana. Jedan od najvećih rimskih kroničara, Plinije stariji u svom djelu „*Historiarum mundi*" spominje vino „*vinum Pucinum"*, koje obasipa pohvalama. Prema opisanim karakteristikama smatra se da je riječ o crnoj sorti Teran, koja se i danas uzgaja na području Istre. Posebno značajan dokument datira iz 1650. godine, gdje biskup Tommasini iz Novigrada spominje 15 sorti grožđa na području Istarskog poluotoka; Hrvatica, Malvazija, Muškat, Prošek, Rebula, Refšok, Teran i Trebjan (Peršurić i sur. 2009). Područje Istre

karakterizira ispripletena geološko-reljefna i klimatska raznolikost koja je doprinijela različitom autohtonom sortimentu. Najvažnija bijela sorta u Istri jest „Malvazija istarska“ čiji je detaljni ampelografski opis opisao Vitolović sa suradnicima 1960. godine. Ostale važne bijele sorte su: „Chardonnay“, „Pinot blanc“, „Pinot sivi“, „Sauvignon blanc“, i „Bijeli muškat“. Najčešće crvene sorte su: „Teran“, „Borgonja“, Merlot“, „Hrvatica“, „Cabernet Sauvignon“, „Cabernet franc“ i „Pinot noir“ (Maletić i sur., 2008).

Vinova loza se smatra najvećim domaćinom virusa među uzgajanim voćnim kulturama (Martelli, 2018). Do danas je utvrđeno više od 86 različitih vrsta virusa. U današnjem svijetu virusne bolesti se smatraju jednim od najvažnijih uzročnika biljnih bolesti te se traže brojna rješenja u njihovoj kontroli. Nažalost, današnja spoznaja o virusima nije se toliko unaprijedila od pronalaska prvog biljnog virusa: virus mozaika duhana - TMV (Ivanosky, 1892), a dodatno problem povećava činjenica da jednom zaražena biljka ostaje zaražena do kraja svog eksploatacijskog vijeka. Također, virusne infekcije se većinom ne mogu odmah uočiti jer su latentne prirode te nakon što dođe do prvih vidljivih simptoma u većini slučajeva je prekasno. Problematika se javlja jer praktično ne postoji mogućnost izlječenja jednom zaraženog trsa, takav trs postaje trajni izvor zaraze pa virus putem vektora može biti prebačen na druge zdrave trsove te postoji opasnost od daljnjeg prijenosa virusa preko vegetativnog načina razmnožavanja. Širenju virusa vinove loze najviše je pridonio njen vegetacijski način razmnožavanja. Introdukcija filoksere (1892.) unutar europskih vinogradarskih površina, doprinijela je masovnoj distribuciji virusa zbog cijepljenja europskih plemki na zaražne američke podloge u svrhu ponovnog uzgoja tada ugrožene europske loze (Vončina, 2011). Suzbijanje virusnih bolesti kao i kod svih kultura, a posebice onih koje se uzgajaju vegetativnim putem, zasnivaju se na korištenju preventivnih mjera - naglasak se stavlja na korištenje certificiranog (*virus-free*) sadnog materijala te kontroli i suzbijanju vektora (štitaste uši i nematode). Uzgoj i izbor kvalitetnog sadnog materijala predstavlja jednog od temeljnih preduvjeta uspješne vinogradarske proizvodnje. U Republici Hrvatskoj „*Pravilnik o izmjenama i dopuni Pravilnika o stavljanju na tržište materijala za vegetativno umnažanje loze*“ („Narodne novine“, br. 1010, NN 49/2020) nalaže kako se svi matični nasadi svake godine moraju vizualno nadzirati na sve viruse i virusu slične organizme. Osnovni matični trsovi te matični trsovi iz kojih se uzima certificirani sadni materijal moraju biti podvrgnuti laboratorijskim analizama kako bi se utvrdila prisutnost ekonomski značajnih virusa: virusa lepezastog lista vinove loze (GFLV), virusa mozaika gušarke (ArMV), virusa povezanih sa uvijenosti lista vinove loze 1 i 3 (GLRaV-1, GLRaV-3) te virusa pjegavosti lista vinove loze (GFkV).

1.1 Cilj istraživanja

Cilj rada je bio istražiti učestalost pojave ekonomski najvažnijih virusa vinove loze kod više različitih sorata i vinograda lociranih u okolici grada Poreča, primjenom enzimskog-imunotesta na čvrstoj fazi - metoda ELISA.

2. Pregled literature:

2.1. Značaj vinove loze u svijetu

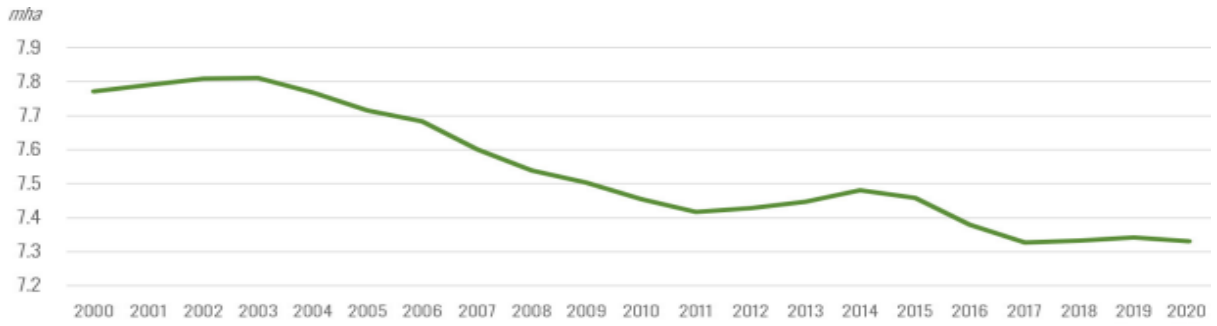
Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) predstavlja najvažniju drvenastu kulturu koja zauzima važno mjesto u poljoprivrednoj proizvodnji, a samim time i svjetskom gospodarstvu. Jedna je od najstarijih uzgajanih drvenastih kultura na svijetu te se zbog svojih regenerativnih sposobnosti smatra i kao „drvo života“ (Vivier i Pretorius, 2000). To je višegodišnja drvenasta biljka penjačica koja pripada porodici *Vitaceae* s 11 rodova i oko 600 vrsta (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Plodovi vinove loze dozrijevaju ovisno o sorti između kolovoza i rujna te predstavljaju okruglaste bobe (grožđe) slatko-kiselog okusa. Zdravi trsovi vinove loze u intenzivnom nasadu (vinograd), uz adekvatnu brigu i optimalne uvjete mogu biti ekonomski isplativi do 30 godina. Iako sama po sebi predstavlja skromnu kulturu, odabir lokacije za uzgoj može biti krucijalan čimbenik koji će se odraziti u prinosu i kvaliteti budućeg grožđa. Do druge polovice 19. stoljeća trajalo je tzv. „zlatno doba vinogradarstva“, tada je u Europu introduciran invazivni štetnik iz Sjeverne Amerike trsov ušenac (*Viteus vitofoliae* F.) te u potpunosti mijenja daljnji tijek uzgoja i razvoja vinove loze u Europi (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008; Maletić i sur. 2015). Europska loza nije pokazivala otpornost na novo introduciranog štetnika te je došlo do masovnog propadanja. Prije najezde filoksere vinova loza se isključivo razmnožavala reznicama (Kirgija, 2012). Problematika se riješila nakon što su sazvani stručni entomolozi koji su proučavali biološki ciklus filoksere. Jedan od njih je bio američki entomolog Charles V. Riley (1869) koji je utvrdio da se biološki ciklus u Americi znatno razlikuje od načina života u Europi. Naime, autohtoni štetnik iz Amerike se hranio lišćem, dok se na europskoj vrsti hranio isključivo korijenjem, radi čega je došlo do propadanja 70% europskih vinograda. Riley prvi predlaže cijepljenje europskih osjetljivih vrsta loza na američke podloge rezistentnih kultivara. Njegovo otkriće je spasilo europsko vinogradarstvo te Francuska vlada u znaku zahvalnosti 1889. Rileyu dodijeljuje najveću nagradu „*Légion d 'Honneur*“ (Gale, 2003; Sorensen i sur. 2008).

Međunarodna organizacije za lozu i vino (OIV[1]), koordinira sva istraživanja i provodi statistiku svjetskog vinogradarstva i vinarstva te njihovo zadnje izvješće (OIV, 2020) govori kako se u svijetu ukupna površina pod vinovom lozom koja se koristi u višenamjenske svrhe (vino i sokovi, stolno grožđe i grožđice, kozmetika), procjenjuje na oko 7.300.000 ha (Graf 1.). U usporedbi sa zadnja dva desetljeća bilježi se pad vinogradarskih površina za 7 % u svijetu, odnosno za 500.000 ha. Procjenjuje se kako u svijetu ima oko 10.000 sorata, od kojih samo 200-300 ima veću komercijalnu vrijednost, a u posljednjim godinama intenziviraju se nasadi s vinskim sortama kao što su: Cabernet Sauvingon, Chardonnay, Merlot, Sauvingon Blanc, Syrah (Maletić, 2014). Svjetska proizvodnja vina, izuzev sokova i mošta u 2020. godini procjenjuje se na 260.000.000 hl, što u odnosu na 2019. označuje blagi porast od gotovo 3.000.000 hl (1%) (Graf 2.). Iako se količina proizvedenog vina čini izrazito velikom, u usporedbi s prethodne dvije nestabilne godine ističe se nagla oscilacija gdje se broji gubitak od čak 32.000.000 hl (11%). Zanimljiva činjenica je da od ukupne svjetske proizvodnje vina čak 135.800.000 (53

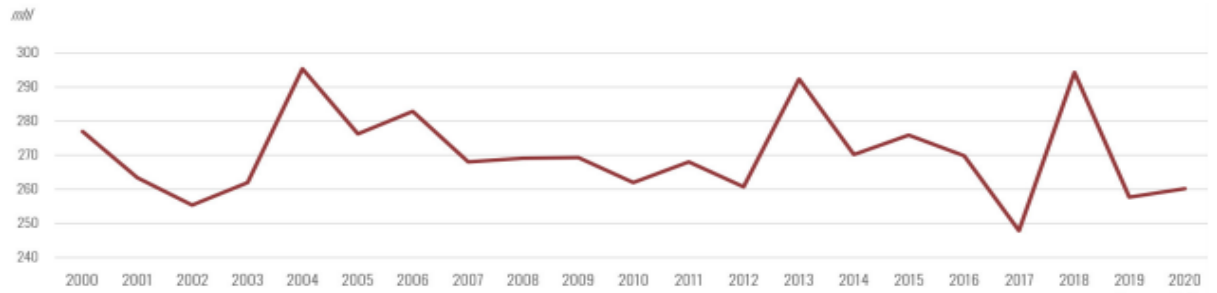
[1] OIV – *Organization international de la vigne et du vin*.

%) pripada Europskoj proizvodnji od kojih se ističu: Italija (49.100.000 hl), Francuska (46.600.00 hl) i Španjolska (40.700.000 hl).

Vinova loza predstavlja ogroman značaj u svjetskom gospodarstvu, ali isto tako prema navedenim podacima bilježi se trend naglog pada vinogradarskih površina. Uzrok tom trendu napuštanja i krčenja vinogradarskih površina može biti zbog raznih faktora. Trend se razvijao skoro dva desetljeća, a razlog može biti napuštanje ruralnih područja za potragom novijih modernijih zanimanja, prevelika konkurencija poznatih vinogradara, kao i nedovoljna motivacija za probijanje mladih vinogradara na tržište. Čitanjem literature i praćenjem statističkih podataka kao i problematika samog uzgoja vinove loze, nalaže kako najrealističniji razlog tom silaznom trendu proizlazi iz toga što je vinova loza kao kultura veoma zahtjevna za održavanje, a u današnjem svijetu se javlja visok broj bolesti kao i viroza koje otežavaju rentabilnu proizvodnju. Kao što se u 19. stoljeću pojavila problematika gubitka postojećih vinograda, tako se i u današnjici javlja sve veća zabrinutost od virusnih oboljenja vinove loze. Novija istraživanja govore kako je do danas izolirano preko 86 različitih virusa iz vinove loze (Fuchs, 2020). Problematika se javlja zbog toga što virusi uglavnom izazivaju sistematična oboljenja i jednom zaražen trs vinove loze predstavlja izvor infektivnog inokuluma za druge biljke, bilo to putem vektora ili vegetativnog načina razmnožavanja, kao i nacjepljivanje američkih podloga s europskim plemkama vinove loze.



Graf 1. Razvoj ukupne svjetske površine pod vinovom lozom:
(Izvor: https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-vitivinicultural-sector-in-2020.pdf)



Graf 2. Trend kretanja ukupne proizvodnje vina u svijetu:
(Izvor: https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-vitivinicultural-sector-in-2020.pdf)

2.2. Značajni virusi vinove loze

Virusi po definiciji spadaju pod obligatne intracelularne parazite, koji u načelu sadrže RNA ili DNA genom okružen zaštitnim virusno-kodiranim proteinskim omotačem (Gelderblom, 1996). Biljni virusi su široko rasprostranjeni i ekonomski značajni biljni patogeni. Poznato je da virusi i drugi patogeni mikroorganizmi, kao što su: viroidi, fitoplazme i bakterije ograničene floemom i ksilemom, uzrokuju razne infekcije unutar biljnog staničja. Infekcija virusa započinje unutar biljne stanice gdje dolazi do oslobađanja proteinskog omotača (kapside) te ispuštanja virusnog genoma (RNA ili DNA). Kod nekih biljnih virusa ispušteni genom započinje proces transkripcije novih (virusnih) gena koji pri tome mijenjaju genomski kod biljnih stanica, odnosno dolazi do replikacije virusnih jedinki (Modrow, 2013). Takvi paraziti se smatraju primarnim patogenima koji su štetni za poljoprivredne usjeve, a posebice se odnosi na kulture koje se vegetativno razmnožavaju (Maliogka i sur. 2015). Jednu od takvih kultura čini vinova loza koja se kroz čitavu povijest razmnožavala vegetativnim putem. Virusi su jedinstveni među biljnim patogenima zbog toga što se nakon inicijativne infekcije počinju sistemično širiti po cijeloj biljci te se vrlo jednostavno mogu prenijeti sa zaraženih na zdrave jedinke. Prema najnovijim istraživanjima (Fuchs, 2020) iz vinove loze diljem svijeta izolirano je 86 različitih virusa. Iako vinova loza predstavlja kulturu koju parazitira najveći broj virusa, samo neki od njih predstavljaju ekonomske značajne viruse koji smanjuju njen vijek trajanja, prinos te kvalitetu grožđa. Općenito, zbog svoje raširenosti, potencijalne štetnosti koje mogu prouzrokovati unutar vinograda te načina širenja, ističu se virusi iz sljedeće tri skupine: infektivna degeneracija, uvijenost lista te naboranost drveta (Tablica 1.) (Ivić i Fazinić, 2011; Mirošević, 2007; Vončina, 2021). Pored njih u novije vrijeme se javlja sve veća prisutnost virusa pjegavosti lista vinove loze (GFkV) koji uzrokuje izrazitu deformaciju lista. U daljnjem pregledu rada slijedi sažet opis najzastupljenijih i ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze.

Tablica 1. Gospodarski značajni virusi vinove loze s pridruženim kraticama i bolestima koje prouzrokuju:

Engleski naziv virusa	**Kratica (akronim)**	**Hrvatski naziv virusa**	**Skupina kojoj pripada**
Grapevine fanleaf virus	**GFLV**	Virus lepezastog lista vinove loze	**Infektivna degeneracija**
Arabis mosaic virus	**ArMV**	Virus mozaika gušarke	**Infektivna degeneracija**
Grapevine leafroll-associated virus 1	**GLRaV-1**	Uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 1	**Uvijenost lista**
Grapevine leafroll-associated virus 2	**GLRaV-2**	Uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 2	**Uvijenost lista**
Grapevine leafroll-associated virus 3	**GLRaV-3**	Uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 3	**Uvijenost lista**
Grapevine virus A	**GVA**	A-virus vinove loze	**Naboranost drva**
Grapevine virus B	**GVB**	B-virus vinove loze	**Naboranost drva**

2.2.1. Virus lepezastog lista vinove loze (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV)

Virus lepezastog lista vinove loze (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) spada u porodicu *Secoviridae*, rod *Nepovirus* (ICTV, 2020; MSL #36). Bolest infektivne degeneracije koju izaziva virus GFLV se smatra najraširenijim i najštetnijim virusom vinove loze uz uvijenost lista vinove loze (Basso i sur. 2015). Radi se o najstarijoj virusnoj bolesti koja se u europskoj literaturi spominje prije više od 170 godina. Simptomi virusa lepezastog lista vinove loze (GFLV) po prvi puta su opisani u Francuskoj (Cazalis-Allut 1865), Austriji (Rathay 1882), Italiji (Ruggeri 1895; Martelli 2014) i Njemačkoj (Cholin 1896) (Meng i sur. 2017). Prema Martelliju i Boudon-Padieu (2006) prvi simptomatski listovi pronađeni su u herbariju koji je bio uspostavljen neposredno prije uvođenja američkih podloga unutar Europe. Znakovi zaraze vizualno se mogu uočiti na listovima, mladicama i grozdovima, iako pojava i intenzitet simptomatskih dijelova biljaka najviše ovise o sorti, podlozi, soju virusa, starosti biljke i brojnim drugim čimbenicima. U literaturi se često navodi kako biljke mogu biti zaražene latentno, pri čemu se simptomi uočavaju tek kasnije ili biljke naizgled izgledaju zdravo. Često dolazi u mješovitim infekcijama sa drugim virusima pa simptomi znaju biti izraženiji, no vrlo je teško po simptomima odvojiti i prepoznati točnu skupinu virusa. Virus lepezastog lista vinove loze karakteriziraju dva simptoma uzrokovana različitim sojevima virusa: deformirajući i kromogeni (Martelli i Boudon-Padieu, 2006).

Deformirajući sojevi uzrokuju razne deformacije listova, koji poprimaju asimterični i naborani izgled te njihovi rubovi često znaju biti izraženije nazubljeni, a na njima se često može uočiti mozaično ili klorotično šarenilo. Takav soj može uzrokovati karakterističnu derformaciju po kojoj je virus dobio ime – listovi zbog otvorenog sinusa i zbijenosti glavnih žila poprimaju oblik „lepeze“. Simptomi na rozgvi se očituju u vidu kraćih internodija i „cik-cak“ rasta mladica, a u težim slučajevima dolazi do nenormalnog grananja mladica i pojave fascijacija. Ovakav soj ima izvjestan učinak na grozdove koji sadrže manje i tvrđe bobice te dolazi do neravnomjernog dozrijevanja grožđa, tzv. rehuljavost grozdova (Slika 1 i 2).

Žuti mozaik induciran je pojavom kromogenog soja virusa. Simptomi žućenja mogu se uočiti na čitavom trsu ili na pojedinačnim listovima gdje je kloroza najuočljivija u proljeće, a približavanjem vrućih ljetnih dana i povećanjem temperatura simptomi uglavnom postaju neprimjetni, odnosno latentni (Martelli 2014; Martelli i Boudon-Padieu; 2006). Prirodni prijenosnik (vektor) GFLV-a je ektoparazitska kalifornijska kopljasta nematoda (*Xiphinema index*). One se nalaze u svim tipovima tla, a populacija ovog vektora se smanjuje s dubinom tla – 92% svih kopljastih nematoda se nalazi na dubini od 0 do 300 mm u kojoj se također nalazi najveći postotak korijenja vinove loze (Van Zyl i Walker 2012). Kroz životni vijek prelaze male udaljenosti te se uglavnom simptomi infektivne degeneracije pojavljuju unutar žarišta.



Slika 1. Karakteristični simptomi virusa lepezastog lista vinove loze koje uzrokuju dva osnovna soja virusa (A i B- karakteristična pojava žućenja listova kod kromogenog soja, C - skraćenje internodija i D - pojava rehuljavosti grozdova), Izvor (https://www.researchgate.net/publication/270963659_Control_of_Viruses_Infecting_Grapevine)



Slika 2. Karakteristični simptom GFLV-a koji daje dojam „lepezastog“ lista, (Izvor: https://grapes.extension.org/grapevine-fanleaf-degeneration-disease/)

2.2.2. Virus mozaika gušarke (*Arabis mosaic virus*, ArMV)

Virus mozaika gušarke (*Arabis mosaic virus,* ArMV), po prvi puta otkriven na vinovoj lozi i trešnji u bivšoj Jugoslaviji, na području današnje Hrvatske (Panjan i Šarić, 1963). Također pripada rodu *Nepovirus* porodice *Secoviridae* (ICTV, 2020; MSL #36, Sanfaçon i sur. 2009). Uz GFLV predstavlja ekonomski značajan virus koji pripada skupini uzročnika infektivne degeneracije. Vrlo je sličan virusu lepezastog lista vinove loze (GFLV) te isto tako negativno utječe na količinu i kakvoću prinosa te na vigor i životni vijek zaražene biljke (Ivić i Fazinić, 2011). Simptomatologija i jačina izraženih vidljivih simptoma kao i kod ostalih virusa ovisi o sorti, starosti biljke, kao i njezinom općem stanju soju virusa i drugim čimbenicima. Zaraza s ArMV može biti latentnog oblika, bez nazočnih simptoma. Na temelju poliklonskih antitijela, svi dosad poznati sojevi ArMV blisko su povezani s virusom lepezastog lista vinove loze (GFLV). Skoro pa identični odnos između ArMV-a i GFLV-a doveo je do pretpostavke da dva virusa mogu biti istog podrijetla (Hewitt, 1985). Unatoč bliskim serološkim odnosima, sojevi ArMV mogu se razlikovati od GFLV-a po velikom rasponu domaćina, slabije izraženim simptomima te prenosivosti različitim vektorom (CABI i EPPO).

Simptomi zaraze ArMV mogu biti vidljivi na listovima, mladicama i grozdovima. Listovi često znaju biti deformiranog oblika, manji i pokazivati određenu klorozu. Internodiji na mladicama su kraći, a rozgva slabije i sporije odrvenjava. Grozdovi neravnomjerno dozrijevaju i postaju rehuljavi. GFLV i ArMV se često pojavljuju u mješovitim zarazama unutar vinove loze te zajedno mogu dovesti do šteta u rasadničarskoj proizvodnji. Naime, zaraza ovim virusima značajno može smanjiti sposobnost ukorjenjivanja podloga i cijepova te sraščivanja američkih podloga i europskih plemki (Slika 3.) (Ivić i Fazinić, 2011). ArMV se prirodno prenosi europskim kopljastim nematodama (*Xiphinema diversicaudatum*). Širenje virusa je sporo te se simptomatski trsovi pojavljuju unutar malog radijusa pojedinog žarišta. Najveća razlika između GFLV-a i ArMV-a leži unutar spektra domaćina, dok je kod GFLV-a jedini važan domaćinski predstavnik vinova loza, ArMV ima vrlo široki krug domaćina i može zaraziti stotinjak biljnih vrsta iz različitih porodica. Uglavnom su to bitne agronomske kulture, kao što su jagoda, hmelj, kupina, ruža, trešnja, višnja, šljiva i veći broj ukrasnih biljaka (Ivić i Fazinić, 2011; Meng i sur., 2017; Šutić i sur., 1999).



Slika 3. Slab razvoj cijepova vinove loze kao posljedica zaraze s ArMV-om
(Izvor: https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2021/05/2.RNQP-Sadni-materijal-loze.pdf)

2.2.3. Virusi iz skupine uvijenosti lista vinove loze (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3)

Prvi opisi virusa iz skupine uvijenosti lista vinove loze datiraju iz 19. stoljeća. Izvještaji govore o naglom nastanku „crvenila“ lišća vinove loze te se takav simptom pripisivao fiziološkim poremećajima. Martelli i Boudon-Padieu (2006.) smatraju kako je to pored GFLV najraširenija i ekonomski najvažnija bolest vinove loze u većini vinogradarskih regija. Tu skupinu čini više raznih virusa od kojih su najznačajniji GLRaV-1, GLRaV-2 i GLRaV-3. Pripadaju porodici *Closteroviridae*, rodovima *Ampelovirus* (GLRaV-1 i GLRaV-3) i *Closterovirus* (GLRaV-2) (ICTV, 2020 MSL #36). „Uvijenost lista“ vinove loze naziv je sindroma koji je uzrokovan međusobno srodnim vrstama virusa koje se u većem broju prenose putem vunastih (*Pseudococcidae*) i štitastih uši (*Coccidae*), koje putem svog rila duboko ubadaju biljku do floema i unose virusne čestice. Smatra se kako su se virusi unutar ove skupine proširili na tolike udaljenosti zbog introdukcije američkih podloga koje su bile zaražene, ali nisu pokazivale nikakve vizualne simptome te su se tako cijepljenjem na europske plemke indirektno unijele u naš sortiment (Martelli, 2014; Martelli i Boudon-Padieu 2006). Najvažnijim virusima unutar ove skupine smatraju se uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 1 (GLRaV-1) i uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 3 (GLRaV-3). Simptomi bolesti razvijaju se kasno u ljeto i jesen, a uključuju klorotične pjege u vidu crvenog ili požutjelog lišća ovisno o sorti. U početku vizualnim pregledom prisutnosti simptoma može se zamjetiti difuzno crvenilo koje je u početku slabije izraženo, no s vremenom se postupno širi, postaje tamnije te u jesenskom razdoblju može zahvatiti kompletni list (Slika 4.). Obično žile na listu ostaju zelene, a rubovi se savijaju prema naličju i postaju krhki te lomljivi pritiskom ruke (Ivić i Fazinić, 2011). Samim time ometaju fiziološke procese biljke i smanjuju asimilacijsku površinu te indirektno utječu na udio šećera kao i na krajnju kvalitetu grožđa. Dio šećera zaraženih biljaka je za 30 % manji od onih zdravih te dolazi do produžetka zrenja njihovih plodova (Byzova i sur., 2018). Infekcija smanjuje vigor biljke i prosječan prinos loze za 15-20 % (Martelli i Boudon-Padieu, 2006). Koliko je značajna bolest u ekonomskom pogledu pokazuje nam podatak iz znanstvenog rada (Attalah i sur. 2012.) gdje je procijenjeno da se troškovi bolesti unutar jedne vegetacije kreću između 25.000 i 40.000 dolara po hektaru, za vinograde u kojima se nije primjenjivala nikakva kontrolna mjera na viruse.



Slika 4. Simptomi pojave tamnijeg crvenila (jesen) i kovrčanja lišća prema naličju na sorti Cabernet Franc uzrokovanih infekcijom GLRaV-1,
(Izvor:https://www.wineaustralia.com/getmedia/dcbd8f4f-5c90-48a6-bce9-3d3ccf4fd635/201404_Grapevine-leafroll.pdf)

2.2.4. Virusi iz skupine naboranosti drveta (*Rugose wood complex*)

Kompleks naboranosti drveta (*Rugose wood complex* - RW) jedna je od ozbiljnijih bolesti koja pogađa vinovu lozu (*Vitis* spp.) širom svijeta. Prvi puta je identificirana 1961. godine u južnoj Italiji (Graniti i Ciccarone, 1961). Danas je raširena unutar svih vinogradarskih regija svijeta (Martelli i Boudon-Padieu, 2006). Američke autohtone sorte vinove loze, kao i europske loze koje su sađene na vlastitom korijenu te hibridi najčešće ne pokazuju simptome infekcije, već su zaraženi latentno, a do prve pojave simptoma dolazi nakon cjepljenja podloge i plemke (Ivić i Fazinić, 2011; Meng i sur. 2017; Vončina 2011). Zahvaćene loze imaju slabije izraženi vigor u odnosu na zdrave jedinke te dolazi do kasnijeg otvaranja pupova što rezultira kasnom vegetacijom. U slučajevima kombinacija određenih sorti i podloga, na zaraženim trsovima dolazi do uvijanja listova prema naličju koja je popraćena promjenom boje lišća – slično kao što je to slučaj kod virusnih bolesti iz skupine uvijenosti lista (GLRaV). Kompleks čini grupu od značajnih bolesti koje su dobile ime po simptomima na indikatorskim biljkama: *Vitis rupestris* Scheele, Kober 5BB i LN33. S obzirom na reakcije na navedenim biljkama dijele se u četiri skupine (Martelli i Boudon-Padieu, 2006):

1) **Naboranost drveta** *Vitis rupestris* (*Grapevine rupestris stem pitting*) –smatra se kako je uzročnik ove bolesti *Grapevine rupestris stem-pitting associated virus* (GRSPaV). Simptomatologija je jasno izražena na indikatorskoj vrsti *Vitis rupestris* te se pojavljuju u vidu udubina i nabora koji se šire s inokulacijskog mjesta virusa prema tlu, dok LN-33 i Kober 5-BB ne pokazuju simptome (Slika 5. i 6.).
2) **Ižljebljenost drveta kobera** (*Kober stem grooving*) – pojava karakterističnih žljebova na drvetu podloge Kober 5-BB, dok *Vitis rupestris* i LN-33 ne pokazuju nikakve simptome. Patogen koji uzrokuje ovu pojavu bolesti prepisujemo A-virusu vinove loze (*Grapevine virus A*, GVA) (Slika 7.).
3) **Plutavost kore vinove loze** (*Grapevine corky bark*) – javlja se kod vrsta *Vitis rupestris* i LN33, a vizualni dokazi zaraze pojavljuju se u obliku simptoma koji se očituju u udubinama i brazdama po čitavoj površini drveta *Vitis rupestris* i LN33, dok Kober-5BB ostaje bez vidljivih simptoma. Kod podloge LN-33 uz karakterističnu pojavu brazda i udubina, bolest je popraćena uvijanjem i crvenilom lišća te karakterističnim zadebljanjem internodija kod mladica. Smatra se kako je B-virus vinove loze (*Grapevine virus B*, GVB) uzrokuje ovakav tip bolesti (Slika 8.).
4) **Ižljebljenost drveta hibrida LN-33** (*LN33 stem grooving*) – vrlo slična simptomima kao i onima kod plutavosti kore vinove loze, samo što pojave brazda na mladicama nisu popraćene internodijalnim zadebljanjima i promjenama boja u listovima. Pojave se očitavaju samo kod drveta hibrida LN-33, a etiologija ovog virusa još nije u potpunosti istražena.

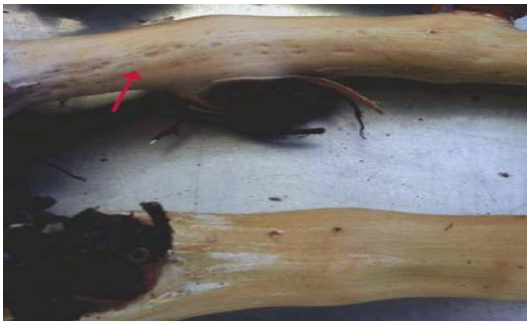
Najvažnije tipove bolesti za vinogradrstvo uzrokuju A-virusi vinove loze (GVA) i B-virusi vinove loze (GVB) i virus naboranosti drveta *Vitis rupestris* (GRSPaV) čiji intenzitet simptoma ovisi ponajprije o kombinaciji podloge i plemke te klimatskim uvjetima. Kao i drugi virusi mogu utjecati na smanjenje prinosa za 20-30 % (Martelli i Boudon-Padieu, 2006). To su virusi

ograničeni floemom koji pripadaju porodici *Betaflexiviridae*, unutar dva roda *Vitivirus* (GVA, GVB) i *Foveavirus* (GRSPaV) (Maliogka i sur. 2015).

Mnoge sorte vinove loze koje su inficirane ovim vrstama virusa imat će izvjesno smanjeni prinos i kvalitetu plodova. GVA i GRSPaV glavni su uzročnici bolesti kod sorata Shiraz i Syrah u Australiji (Constable i Rodoni, 2010). Virusi povezani s kompleksom naboranosti drveta prenose se vegetativnim razmnožavanjem i cjepljenjem podloga s plemkama. Međutim, postoje zapisi prijenosa nekih vrsta virusa putem vektora. Nadalje, vrste GVA i GVB se prenose semi-perzistentnim načinom preko različitih vrsta vunenastih štitastih ušiju rodova *Heliococcus, Planococcus, Pseudococcus i Phenococcus* (Le Maguet i sur, 2012; Martelli i Boudon-Padieu, 2006). Studije koje su proveli različiti istraživači sugeriraju da se prijenos GVA često događa istodobno s GLRaV-1 i GLRaV-3 (Engelrecht i Kasdorf 1990; Fortusini i sur. 1997; Hommay i sur. 2008; Zorloni i sur. 2006).



Slika 5. Pojava karakterističnih nabora i udubina na drvu osjetljive vrste *Vitis rupestris*, (Izvor: https://www.wineland.co.za/detection-and-classification-of-grapevine-stem-pitting-associated-virus)



Slika 6. Utjecaj GRSPaV na *Vitis rupestris*, crvena strelica označava pojavu karakterističnih udubina i nabora,(Izvor: https://www.wineaustralia.com/getmedia/b49bbcf2-3619-43c2-a7d0-d22e8f3eda77/201106-Rugose-wood-associated-viruses.pdf)



Slika 7. Karakteristična pojava žljebova na drvetu podloge Kober 5BB (gornja prikazuje drvo inokulirano A-virusom vinove loze (GVA), donja prikazuje zdravo drvo), (Izvor: https://www.vineyardteam.org/files/resources/Al%20Rwahnih_PlantMaterial_SAE_11_15_2017.pdf)



Slika 8. Drvo vrste LN33 inokulirano B-virusom vinove loze (lijevo), virus-free LN33 - crvena strelica označava karakterističnu pojavu brazda i udubina (desno), (Izvor: https://www.wineaustralia.com/getmedia/b49bbcf2-3619-43c2-a7d0-d22e8f3eda77/201106-Rugose-wood-associated-viruses.pdf)

2.2.5. Virus pjegavosti lista vinove loze (*Grapevine fleck virus*, GFkV)

Virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV) je floemski ograničen virus koji se ne može prenositi mehaničkim putem. To je virus s izometrijskim česticama koji su otprilike 30 nm u promjeru, zaobljenih kontura i površinskih struktura sličnih kao kod roda *Tymovirus* ili *Marafivirus* (Sabanadzovic i sur. 2000). Pripada porodici *Tymoviridae*, a nalazi se unutar roda *Maculavirus* koji je povezan s bolešću pjegavosti lista vinove loze. Kompleks bolesti pjegavosti lista distribuirana je po čitavom svijetu gdje je moguć uzgoj vinove loze. Bolest je uglavnom latentnog oblika kod europskih sorta i kod većine američkih podloga. Unatoč svojoj latentnosti, simptomi dolaze do izraženosti kod vrste *Vitis rupestris* St. George koja predstavlja indikatorsku biljku za dokazivanje virusa. Simptomi se očitavaju u prosvijetljenju žila trećeg i četvrtog reda uslijed čega nastaju pjege. Listovi s tako izraženim pjegama poprimaju naborani, deformirani oblik te se u nekim slučajevima rubovi listova blago uvijaju prema licu (Slika 9. i 10.) (Vončina, 2011).

Iako se ne prenosi mehaničkom inokulacijom, zabilježeni su podaci kako je prijenos moguć cijepljenjem, a njegova raširenost je uzrokovana distribucijom zaraženog sadnog materijala koji je bio latentne prirode (Martelli, 1993). U današnjoj literaturi nigdje se ne spominje poznati prijenosnik virusa, ali je zabilježeno njegovo rapidno širenje kroz vinograde u Južnoafričkoj republici (Engelbrecht i Kasdorf, 1990) i Italiji (Fortusini i sur. 1997), što nam ukazuje da bi nepoznati vektor ipak mogao postojati.



Slika 9. Zaraženi listovi s virusom pjegavosti lista vinove loze (GFkV) na kojem se jasno vidi karakteristično prosvijetljenje žila trećeg i četvrtog reda uslijed kojeg nastaju pjege, Izvor: https://issuu.com/zsdhr/docs/8.viroze_20vinove_20loze_20-_20_c4_8desto_)



Slika 10. Listovi zaraženi virusom pjegavosti lista vinove loze (GFkV), prikazan je zaražen list čiji se rubovi polako uvijaju prema licu, (Izvor: https://www.wineaustralia.com/getmedia/b1e5038d-cc30-48d8-b3c2-25844af8e795/201107-Grapevine-fleck-and-associated-viruses?ext=.pdf)

2.3. Enzimski imunotest na čvrstoj fazi (ELISA)

U primijenjenim područjima poljoprivrednih znanosti, proizvodnja sadnog materijala kao i razmnožavanje istog bez patogena, predstavlja jako bitnu stavku u suvrmenoj poljoprivrednoj proizvodnji. Uvođenjem integriranog sustava proizvodnje, koji obuhvaća pažljivu procjenu svih raspoloživih mjera zaštite bilja gdje se stavlja naglasak na uzgoj zdravih usjeva i nasada uz najmanje moguće narušavanje agroekoloških sustava, potaknut razvoj brzih i osjetljivih testova kako bi se lakše mogle identificirati i kvantificirati određene biljne bolesti. Uporaba serološki dijagnostičkih metoda omogućava identifikaciju i otkrivanje mnogih važnih virusa vinove loze. Unazad nekoliko desetljeća (Clark i Adams, 1977) u biljnoj virologiji se uvodi nova serološka metoda pod nazivom ELISA - enzimski imunotest na čvrstoj fazi (eng. *enzyme linked immunosorbent assay)*. ELISA se može izvesti na više načina, ovisno o specifičnostima uzorka i potrebnoj osjetljivosti. ELISA omogućava osjetljivu i brzu analizu za pregled velikog broja uzoraka s terena (Meng i sur. 2017). To je vrlo osjetljiva enzimatsko-serološka metoda (1-10 ng virusa/ml) za utvrđivanje virusa u biljnom tkivu (Vončina, 2018). Metoda se zasniva na precipitacijskoj interakciji specifičnih protutijela s homolognim antigenima, a kako bi produkt njihovog vezivanja postao vidljiv primjenjuje se enzimatska reakcija. Izvođenje ELISA-e uključuje barem jedno antitijelo koje je specifično za određeni antigen na koji se uzorak testira. Ta se antitijela mogu dobiti iz seruma imunizirane životinje i posebno će reagirati kada dođu u doticaj s antigenom iz kojeg su nastali (Martelli, 1993). Upravo jedan od takvih ELISA pribora, u kojem se nalaze već pripremljena antitijela, korišten je tijekom laboratorijskih analiza pomoću metode ELISA. (Slika 11.)

Metoda ELISA se najčešće provodi unutar 2 dana i predstavlja vrlo kompleksnu metodu koja podrazumijeva visoku koncentraciju pri radu kako ne bi došlo do lažnih pozitivnih reakcija, odnosno kontaminacije uzoraka.



Slika 11. Komercijalni dostupni pribor za ELISU (Agritest) - sastoji se od primarnih, sekundarnih antitijela, kao i pozitivne i negativne kontrole

3. Materijali i metode rada

3.1. Lokacije uzorkovanja

Istraživanje je provedeno na 7 različitih lokacija unutar vinograda koji se nalaze u okolici Poreča, a u vlasništvu su tvrtke Agrolaguna d.d. Pregled lokacija, uzorkovanih sorata kao i broj trsova uključenih u istraživanje nalazi se u nastavku (Tablica 2.).

Tablica 2. Pregled lokacija, uzorkovanih sorata i broj testiranih trsova.

Lokacija	Mapa	Sorta	Broj testiranih trsova
Vodopija		Cabernet Sauvignon	60
Puderica		Malvazija	70
Devići		Merlot	70
Mornarica		Cabernet Franc	50
		Cabernet Sauvignon	50
Boveda		Cabernet sauvignon	100
Faragude		Sauvignon bijeli	50
La Ville		Merlot	150

3.2. Odabir trsova unutar vinograda

Trsovi su odabrani nasumično i dijagonalno po parceli vinograda. Sa svakog trsa uključenog u istraživanje u periodu mirovanja vegetacije, uzete su tri dobro odrvenjele reznice prosječne dužine oko 30 cm s bazalnih dijelova trsa. Svaki od uzoraka je dobio svoju odgovarajuću oznaku te je bio zasebno zapakiran unutar plastične vrećice koje su do provedbe metode ELISA čuvane u hladnjaku na temperaturi od 4°C. Testiranje je bilo provedeno na jednoj autohtonoj hrvatskoj sorti (Malvazija istaraska) te 4 introducirane vinske sorte koje uspijevaju na području Primorske hrvatske (Cabernet Sauvingon, Cabernet Franc, Sauvignon bijeli te Merlot).

3.2.1. Postupak provođenja enzimskog imunotesta na čvrstoj fazi – ELISA

Eksperimentalni dio istraživanja proveden je na Zavodu za fitopatologiju (Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, AFZ), u razdoblju trajanja od veljače do polovice ožujka 2020. godine. Sveukupno je analizirano 600 uzoraka na 7 ekonomski značajnih virusa:

1. Virus mozaika gušarke (*Arabis mosaic virus,* ArMV)
2. Virus lepezastog lista vinove loze (*Grapevine fanleaf virus,* GFLV)
3. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 (*Grapevine leafroll-associated virus 1,* GLRaV-1)
4. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 2 (*Grapevine leafroll-associated virus 2,* GLRaV-2)
5. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (*Grapevine leafroll-associated virus 3,* GLRaV-3)
6. A-virus vinove loze (*Grapevine virus A,* GVA)
7. Virus pjegavosti vinove loze (*Grapevine fleck virus,* GFkV)

Napomena prilikom provođenja ELISA metode korišteni su različiti protokoli:

a) dvostruka protutijelna sendvič ELISA (*double antibody sandwich ELISA,* **DAS-ELISA**) za ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3
b) dvostruka protutijelna sendvič indirektna ELISA (*double antibody sandwich indirect ELISA,* **DASI-ELISA**) – za GFkV
c) dvostruka protutijelna sendvič ELISA uz prethodno oblaganje mikrotitarskih pločica s proteinom A (*protein A double antibody sandwich ELISA,* **Protein A DAS-ELISA**) – za GVA

Za ekstrakciju virusa iz uzoraka odvagano je 0,1 g biljnog tkiva iz odrvenjele rozgve, koje je pomoću tučka i tarionika uz dodavanje tekućeg dušika smrvljeno u fini prah. Unutar smrvljenog biljnog tkiva dodano je 1,5 ml ekstrakcijskog pufera koje je zatim bilo prebačeno unutar označene tubice s određenim brojem uzorka. Nakon završene ekstrakcije svih uzoraka,

slijedila je faza centrifugiranja (centrifuga 5415 R, Eppendorf, Njemačka). Cilj centrifugacije bila je odvajanje tekuće faze od krute kako bi se lakše vršilo pipetiranje uzorka. U detekciji su korištene MaxiSorp mikrotitarske pločice (Nunc, Danska) kao i ELISA pribori tvrtke Agritest. Očitavanje rezultata izvršeno je dva sata nakon dodavanja supstrata (p-nitrofenil-fosfat) pri valnoj duljini od 405 nm na spektrofotometru BIOTEK EL800 (BIOTEK, SAD). Pozitivni su smatrani uzorci čije je spektrofotometrijsko očitanje bilo barem tri puta veće od prosječnog očitanja negativnih kontrola.

U nastavku rada ukratko su objašnjeni korišteni protokoli metode ELISA:

a) **DAS-ELISA**

Prvi dan

1. Nakon prethodno opisane ekstrakcije uzorka, slijedi faza oblaganja mikrotitarskih pločica s određenim protutijelima:
    a. Specifična protutijela otopljena su u puferu za oblaganje (*coating buffer*)
    b. Unutar svake jažice se dodaje 200 µl primarnih protutijela
2. Faza inkubacije u termostatu pri 37°C u vremenskom trajanju od 2 sata
3. Ispiranje pomoću pufera za ispiranje (*washing buffer*) korištenjem multikanalne pipete – 200 µl pufera unutar svake jažice, svaka mikrotitarska pločica se ispire po 3 puta uz ostavljanje pufera u jažicama u trajanju od 3 minute
4. Punjenje mikrotitarskih pločica ekstraktom – 200 µl unutar svake jažice, nanošenje pozitivne i negativne kontrole (2x) (Slika 19.)
5. Inkubacija mikrotitarskih pločica na 4°C u hladnjaku preko noći (završetak prvog dana)

Drugi dan

6. Ispiranje mikrotitarskih pločica – na isti način kao i u koraku 3.
7. Nanošenje sekundarnih (konjugiranih) protutijela
    a. Sekundarna protutijela prethodno razrijeđena pomoću pufera za konjugaciju u preporučenom omjeru od strane proizvođača ovisno o vrsti virusa (od 1:500 do 1:1000)
    b. Unutar svakog bazenčića ispušteno je 200 µl razrijeđenih konjugiranih protutijela
8. Treće ispiranje mikrotitarskih pločica - uz pomoć pufera za ispiranje (*washing buffer*), svaka mikrotitarska pločica se ispire po 3 puta uz ostavljanje pufera u jažicama u trajanju od 3 minute
9. Punjenje mikrotitarskih pločica, odnosno individualnih bazenčića supstratnim puferom
    a. Kao supstrat se koristi p-nitrofenil fosfat koji je dostupan u obliku tableta (1 tableta = 5 mg supstrata)
    b. Za jednu mikrotitarsku pločicu potrebno je 19,2 ml supstratnog pufera (92 jažice + 2 pozitivne + 2 negativne kontrole x 200 µl supstratskog pufera = 19 200 µl; 19,2 ml)

c. Supstrat je otopljen u supstratnom puferu u omjeru 1 mg/1 ml

10. Inkubacija na sobnoj temperaturi, u tami u vremenskom trajanju od 2 sata
11. Očitavanje rezultata
    a. Na spektrofotometru BIOTEK EL800 (BIOTEK, SAD) pri valnoj duljini od 405 nm

Postupak metode DAS-ELISA slikovito je prikazan na slici 12.

b) **DASI-ELISA**

Postupak je sličan onome opisanog kod protokola DAS-ELISA. Razlika je jedino između drugog i trećeg koraka, odnosno između nanošenja uzoraka i stavljanja konjugiranih protutijela uvodi se još jedan specifičan korak: nanošenje monoklonskih protutijela koja se otapaju u puferu za konjugaciju. Nakon njihovog nanošenja slijedi faza inkubacije u trajanju od 2 sata na 37°C te ispiranjem mikrotitarskih pločica u 3 ponavljanja, uz ostavljanje pufera za ispiranje prilikom svakog punjenja u trajanju od 3 minute. Nakon toga slijedi nanošenje sekundarnih (konjugiranih) protutijela i daljnji postupak prethodi postupku kao i kod DAS-ELISA-e.

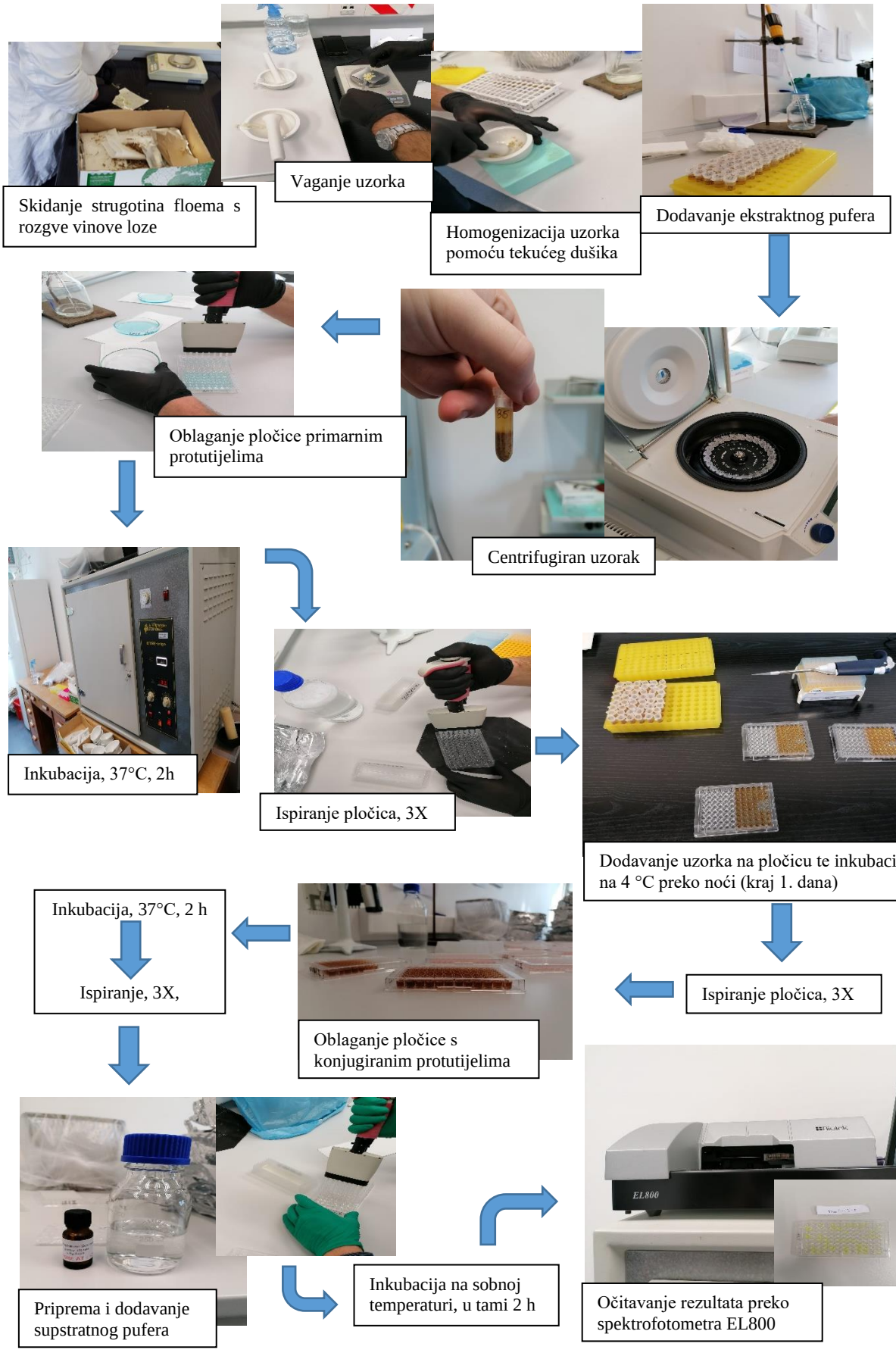
c) **Protein A-DAS-ELISA**

Postupak je identičan kao što je to opisano kod DAS-ELISA uz par modifikacija. Naime, na samom početku kod oblaganja mikrotitarske pločice umjesto primarnih protutijela, pločica se prvo oblaže proteinom A s ciljem povećanja osjetljivosti metode.

Oblaganje pločica proteinom A

a. Protein A razrijeđen je u puferu za oblaganje u omjeru navedenom od proizvođača
b. U svaki bazenčić stavljeno je 200 µl razrijeđenog proteina A
c. Inkubacija pri temperaturi od 37°C u vremenskom trajanju od 2 sata
d. Nakon inkubacije slijedi faza ispiranja pločica - pomoću pufera za ispiranje (*washing buffer*), svaka mikrotitarska pločica se ispire 3 puta uz ostavljanje pufera za ispiranje u trajanju od 3 minute

Daljnji postupak je identičan onome opisanom kod protokola DAS-ELISA



Slika 12. Shematski prikaz metode DAS-ELISA

4. Rezultati istraživanja

Očitavanje rezultata na spektrofotometru BIOTEK EL 800 (Biotek, SAD), nakon provedene imuno-enzimske reakcije na čvrstoj fazi (ELISA) dokazalo je prisutnost svih ekonomski značajnih virusa vinove loze na koje su uzorci bili analizirani. Od ukupno 600 analiziranih uzoraka njih 336 se pokazalo pozitivnima na barem jednog značajnijeg virusa, što znači da je ukupni postotak zaraze iznosio 56 %.

Dobiveni rezultati nakon provedene metode ELISA ukazuju postotak pojedinačnih infekcija u području vinogradarske Istarske podregije gdje je najzastupljenija prisutnost GLRaV-3, čiji postotak zaraze iznosi čak 50,16 % (unutar 301 uzoraka), zatim slijedi GVA u postotku od 18,3 % (110 uzoraka). Ostali značajni ekonomski virusi su pronađeni u manjim postotcima (< 10 %). Prikaz rezultata detaljnije je prikazan u tablici 3.

Rezultati analize također su pokazali prisutnost mješovitih infekcija kod pojedinih uzoraka. Najzastupljenija pojava takvih infekcija je ustanovljena unutar vinograda Puderica, gdje se pojavljuje kompleks GLRaV-3 + GVA u postotku od 91 %. Sveukupna zaraza istim kompleksom iznosi 16,67 % te je pronađena unutar 100 uzoraka. Nadalje, kompleks između predstavnika infektivne degeneracije (GFLV i ArMV) nije ustanovljen. Ostali virusi koji su pronađeni u kompleksima nisu iznosili više od 6 % (Tablica 4.).

Što se tiče lokaliteta unutar kojih su se uzorci prikupljali, na lokaciji Puderica ustanovljen je najveći postotak zaraze od svih uzorkovanih vinograda. Unutar Puderice dominira zaraza virusom iz skupine uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3, gdje je identificirana 100%-tna zaraza, zatim ju slijedi A-virus vinove loze (91%), virus pjegavosti lista vinove loze (38%), virus iz skupine infektivne degeneracije; virus lepezastog lista vinove loze (17%) te na zadnjem mjestu virusi iz skupine uvijenosti lista vinove loze 1 i 2 u postotku od 1,4%, dok virus mozaika gušarke nije identificiran.

Najmanji postotak zaraze je ustanovljen kod lokacije Boveda gdje je postotak zaraze vrlo malen i iznosio je svega 10 %, od kojih su najzastupljeniji virus iz skupine uvijenosti lista pridružen virus 3 (7%), virus iz skupine infektivne degeneracije; virus lepezastog lista vinove loze (2%) te virus iz skupine uvijenosti lista pridružen virus 2 (1%).

U nastavku rada u Tablicama 3. i 4. prikazani su detaljni rezultati pojedinačnih i mješovitih infekcija nakon provedene metode ELISA.

Tablica 3. Rezultati testiranja na sedam ekonomski značajnih virusa metodom ELISA po lokacijama i sortama. Kratice: ArMV – virus mozaika gušarke; GFLV – virus lepezastog lista vinove loze; GFkV – virus pjegavosti lista vinove loze; GLRaV-1, 2, 3 – uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, 2 i 3; GVA – A-virus vinove loze.

Lokacija	**Sorta**	**Broj testiranih uzoraka**	**VIRUSI (%)**						
			ArMV	**GFLV**	**GFkV**	**GLRaV-1**	**GLRaV-2**	**GLRaV-3**	**GVA**
Vodopija	Cabernet Sauvignon	60	0 (0%)	0 (0%)	5 (8,3%)	0 (0%)	2 (3,3%)	29 (48%)	6 (10%)
Puderica	Malvazija	70	0 (0%)	12 (17,1%)	27 (38,5%)	1 (1,4%)	1 (1,4%)	70 (100%)	64 (91%)
Devići	Merlot	70	0 (0%)	1 (1,4%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (7,1%)	63 (90%)	18 (25,7%)
Mornarica	Cabernet Franc	50	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	35 (70%)	1 (2%)
	Cabernet Sauvignon	50	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	29 (58%)	0 (0%)
Boveda	Cabernet Sauvignon	100	0 (0%)	2 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)	7 (7%)	0 (0%)
Faragude	Sauvignon bijeli	50	0 (0%)	0 (0%)	7 (14%)	25 (50%)	0 (0%)	17 (34%)	20 (40%)
La Ville	Merlot	150	2 (1,3%)	2 (1,3%)	8 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)	51 (34%)	1 (0,6%)
		600	**2 (0,3%)**	**17 (2,83%)**	**47 (7,83%)**	**26 (4,3%)**	**9 (1,5%)**	**301 (50,16%)**	**110 (18,3%)**

Tablica 4. Prikaz mješovitih infekcija i broja pozitivnih uzoraka po lokacijama i sortama. Kratice: ArMV – virus mozaika gušarke; GFLV – virus lepezastog lista vinove loze; GFkV – virus pjegavosti lista vinove loze; GLRaV-1, 2, 3 – uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1, 2 i 3; GVA – A-virus vinove loze.

Lokacija	**Sorta**	**Broj testiranih uzoraka**	**Broj pozitivnih uzoraka (na barem jedan virus)**	**Mješovite infekcije**												
				GFLV + GFkV	**GFLV + GLRaV-3**	**GFLV + GVA**	**GFLV + GFkV + GLRaV-3 + GVA**	**GFkV + GLRaV-1**	**GFkV + GLRaV-3**	**GFkV + GVA**	**GFkV + GLRaV-3 + GVA**	**GLRaV-1 + GLRaV-3**	**GLRaV-1 + GVA**	**GLRaV-2 + GLRaV-3**	**GLRaV-2 + GVA**	**GLRaV-3 + GVA**
Vodopija	Cabernet Sauvignon	60	32 (53,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (5%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (1,6%)	0 (0%)	6 (10%)
Puderica	Malvazija	70	70 (100%)	5 (7,14%)	12 (17,14%)	11 (15,71%)	4 (5,71%)	1 (1,42%)	27 (38,57%)	26 (37,14%)	23 (32,85%)	1 (1,42%)	1 (1,42%)	1 (1,42%)	1 (1,42%)	64 (91,42%)
Devići	Merlot	70	63 (90%)	0 (0%)	1 (1,42%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (7,14%)	1 (1,42%)	18 (25,71%)
Mornarica	Cabernet Franc	50	35 (70%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)
	Cabernet Sauvignon	50	29 (58%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Boveda	Cabernet Sauvignon	100	10 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Faragude	Sauvingong bijeli	50	38 (76%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (4%)	2 (4%)	2 (4%)	1 (2%)	7 (14%)	18 (36%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (20%)
La Ville	Cabernet Sauvignon	150	58 (38,6%)	0 (0%)	1 (0,66%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (2,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (0,66%)
		600	**335 (55,8%)**	**5 (0,83%)**	**14 (2,3%)**	**11 (1,83%)**	**4 (0,66%)**	**3 (0,5%)**	**36 (6%)**	**29 (4,83%)**	**25 (4,16%)**	**8 (1,3%)**	**19 (3,16%)**	**7 (1,16%)**	**2 (0,33%)**	**100 (16,67%)**
		UKUPNO		**UKUPNA ZARAZA (%)**												

5. Rasprava

Glavni cilj ovog rada bio je ustanoviti i identificirati prisutnost nekih od ekonomski najznačajnijih virusa vinove loze preko enzimskog-imunotesta na čvrstoj fazi – metode ELISA. Ukupno je testirano 600 uzoraka iz različitih vinograda u okolici Poreča, a analizirane sorte su činile jednu od najrasprostranjenijih sorta unutar Istre – Malvaziju istarsku te neke strane sorte koje su se dobro aklimatizirale i prilagodile našim uvjetima: Cabernet Sauvignon, Merlot, Cabernet Franc te Sauvignon bijeli. Najzastupljeniji virus unutar svih analiziranih uzoraka pripada skupini uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 3 GLRaV-3, čiji je postotak zaraze iznosio 50 % (301 uzorak), slijede ga virusi iz skupine naboranosti drva GVA - 18,3 % (110 uzoraka), virus pjegavosti lista vinove loze GFkV – 7,83 % (47 uzoraka), uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 1; GLRaV-1 - 4,3 % (26 uzoraka), zatim slijedi virus iz skupine infektivne degeneracije; virus lepezastog lista vinove loze GFLV – 2,8 % (17 uzoraka), virus uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 2; GLRaV-2 - 1,5 % (9 uzoraka) te virus mozaika gušarke (ArMV) koji je bio najmanje zastupljen i to u svega 0,3 % (2 uzorka). Zanimljiva činjenica je ta da se uz pojavu virusa iz skupine uvijenosti lista vinove loze pridružen virus 3 (GLRaV-3) istodobno pojavljuje drugi virus iz skupine naboranosti drva GVA, koji zajedno čine kompleks mješovitih infekcija i to u postotku od 16,6 % (100 uzoraka). Također su se pojavljali i drugi kompleksi mješovitih infekcija čiji postotak nije iznosio više od 6 %. Unutar lokacije Puderica gdje je zdravstveno stanje najlošije utvrdila se prisutnost kompleksa od čak četiri vrste virusa (GFLV + GFkV + GLRaV-3 + GVA) čiji je postotak zaraze iznosio 5,71 % (4 uzorka). Lokalitet Puderica od svih uzorkovanih vinograda tijekom istraživanja pokazala je prisutnost skoro svakog od testiranih ekonomski značajnih virusa (osim ArMV) u dosta visokom posotku. Prisutnost virusnih patogena, osobito mješovitih infekcija, sugerira da bi upotreba zaraženog sadnog materijala za vinograde i nedostatak sustavnog praćenja njegovog kretanja mogli imati važnu ulogu u širenju analiziranih ekonomski značajnih virusa.

U literaturi se često spominju analize virusnih bolesti unutar Istarske podregije u kojima su ustanovljeni slični rezultati nakon provedbe imuno-enzimske reakcije na čvrstoj fazi - ELISA. Jedno od takvih istraživanja provedeno je tijekom četverogodišnjeg istraživanja, (Poljuha i sur. 2010) gdje je nakon analize metode DAS-ELISA utvrđena pojava 3 ekonomski značajna virusa (GLRaV-3, GFLV, GLRaV-1). Virusi su pronađeni u gotovo svim uzorkovanim lokacijama, čija je ukupna zaraza iznosila na 82,2 % analiziranih loza. Najzastupljeniji virus je također bio GLRaV-3 (69,1%), zatim GFLV (23,9%) i GLRaV-1 (17,2%). Zabrinjavajući rezultati se također spominju u znanstvenom radu (Karoglan-Kontić i sur. 2009), gdje se istraživao zdravstveni status autohtonih hrvatskih sorata vinove loze. U Dalmaciji je najzastupljenija bila prisutnost GLRaV-3 (80%), dok je u kontinentalnim sjevernijim regijama najzastupljeniji bio GLRaV-1 u sličnom postotku. Novije istraživanje (Vončina i sur. 2019) temeljilo se na učestalosti pojave ekonomski značajnih virusa kod 14 hrvatskih autohtonih sorata s područja Dalmacije. Ukupno je bilo testirano 1116 trsova pomoću metode ELISA. Nakon dobivenih rezultata samo kod 93 trsa (8,3%) nije detektirana prisutnost istraživanih virusa. Kod ostalih trsova pronađena je prisutnost 8 ekonomski značajnih virusa u slijedećim postotcima: GLRaV-3 (79,6%), GVA (61,4%), GLRaV-1 (40,8%), GFkV (19,9%),

GFLV (19,6%), GLRaV-2 (4,1%), ArMV (3,2%) i GVB (3,1%). Na temelju postotaka ovog istraživanja i uspoređivanjem drugih istraživanja, cjelokupna slika zdravstvenog stanja u Hrvatskoj i nije najsjajnija. Visoki potencijal virusnih zaraza unutar naših vinogradarskih regija i podregija prijeti potpunom gubitku nekih od hrvatskih autohtonih sorti. Kako bi sačuvali i vratili njih u proizvodnju potrebno je stvoriti preduvjete za certificiranu proizvodnju biljnog materijala bez virusa. Iako je visok broj virusnih zaraza veliki problem, autohtone sorte se i dalje mogu spasiti jer pronalaskom jedne virus-free biljke možemo klonskim putem napraviti više njihovih potomaka. Upravo radi očuvanja autohtonog sortimenta 2006. godine u sklopu znanstveno istraživačkog projekta „Genetski i gospodarski resursi *Vitis sp.* i banka gena u Istri" obavljena je genetska valorizacija autohtonih populacija vinove loze u Istri (Peršurić i sur. 2006). Također, 2020. godine je pokrenut projekt klonske selekcije Kujundžuše i Trnjaka koje predstavljaju naše vrijedne autohtone sorte (Agronomski fakultet u Zagrebu). Klonska selekcija bi mogla predstavljati budućnost uzgoja i proizvodnje vinove loze. To je postupak kojim se iz populacije određene sorte izdvajaju trsovi (potencijalni klonovi) kod kojih se uočavaju pozitivne promjene nekog od gospodarski važnih svojstava. Prije klonske selekcije potrebno je napraviti zdravstvenu selekciju koja se provodi iz razloga kako bi dobili virusno čisti (*virus-free*) sadni materijal. Ona podrazumijeva odabiranje zdravih trsova te se prije razmnožavanja odabranih (potencijalnih) klonova trsovi provjeravaju na prisutnost uzročnika virusnih i virusima sličnih bolesti vinove loze. S obzirom na to da su analize (serološke ili molekularne) za determinaciju određenih virusnih ili virusima sličnih bolesti vrlo zahtjevne i uzimaju visoke prihode, u postupak certifikacije kontroliraju se one bolesti koje uzrokuju najveću gospodarsku štetu.

Poznato je da vinovu lozu parazitira preko 86 različitih vrsta virusa, a smatra se kako će se u budućnosti njihova pojava rapidno povećati (Fuchs, 2020; Martellil, 2018). Iako ne čine svi ekonomski značajne štete u vinogradima koje se očitavaju kroz smanjenje vigora, prinosa i općenito eksploatacijskog vijeka trsa, prisutnost virusa unutar biljnog staničja nije poželjna pojava. Kako bi se smanjila pojava virusa unutar pojedinih vinograda potrebno je pažljivo proučiti njihov raspon domaćina i način prenošenja. Na prvom mjestu bi trebao biti pažljiv odabir te kupnja zdravih i certificiranih loznih materijala koji će služiti za daljnji tijek razmnožavanja i održavanja pojedinih trsova unutar vinograda koje želimo očuvati. Nadalje, treba obratiti pažnju na određene vektore unutar vinograda koji prenose ekonomski značajne viruse vinove loze. Poznavanje simptoma virusnih bolesti najveći značaj zasigurno ima u rasadničarstvu, iako se nekada određeni karakteristični simptomi mogu zamijeniti s drugim fiziološkim poremećajima ili bolestima. Rasadničar i stručnjak koji nadzire određene proizvodne površine moraju znati odabrati matične trsove bez vidljivih karakterističnih simptoma, a matične trsove na koje se sumnja određena virusna bolest treba podvrgnuti daljnjem laboratorijskom ispitivanju ili ga jednostavno ukloniti iz daljnje reprodukcije. Koliko je izbor zdravog sadnog materijala važan nalaže i zakonska obveza, koja se propisala „*Pravilnikom o izmjenama i dopuni Pravilnika o stavljanju na tržište materijala za vegetativno umnažanje loze*" (NN 49/2020, br. 1010). Gospodarski najveće štete u Hrvatskoj izaziva: ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3. Radi toga što izazivaju najveće štete u gospodarskom pogledu svi matični trsovi se moraju testirati na navedene viruse. Sve biljke vinove loze koje se koriste u matičnim nasadima namijenjenima za proizvodnju predosnovnog reprodukacijskog materijala i predosnovni reprodukcijski materijal moraju se držati u objektima koji su zaštićeni

od kukaca kako bi se osigurala sloboda od virusa uvijenosti lista vinove loze 1 (GLRaV-1) i virusa uvijenosti lista vinove loze 3 (GLRaV-3) (Službeni list Europske unije, 2020., L 41). Prema Ministarstvu poljoprivrede u njihovom najnovijem godišnjem izvješću o stanju poljoprivrede u 2019. godini, doznajemo kako je broj proizvedenih loznih cijepova iznosio oko 1.385.621, dok je deklarirana količina sadnog materijala vinove loze iznosila samo 986.312 (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu). To bi značilo da je oko 29 % loznog reproduktivnog materijala bilo proizvedeno, a da prethodno nisu bili deklarirani od strane nadležnih stručnjaka. Tu se javlja mogućnost da ljudi koji drže svoje vinograde usputno razmnožavaju svoje stare trsove, koji pritom nisu bili podvrgnuti analizi na ekonomski važne viruse.

Danas jedini način za brzu i jasnu dijagnostiku podrazumijeva korištenje seroloških testova (ELISA) ili molekularnim dijagnostikama u koje ubrajamo PCR-testove koji su danas zasigurno najsigurniji, ali kao i svaka metoda ima svojih nedostataka. Nedostatak metode ELISA leži u tome što analiza traje dva dana prilikom koje se nepažnjom i nespretnošću uzorci vrlo lako mogu kontaminirati i pokazivati tzv. „lažne pozitivne reakcije“ (Aydin, 2015). S druge strane analiza podrazumijeva samo jednu vrstu virusa unutar mikrotitarske pločice te ne postoji razvijena metoda koja bi obuhvatila analizu više virusa. Što znači da za analizu 7 različitih virusa potrebno je imati 7 individualnih mikrotitarskih pločica koje itekako otežavaju i produžavaju rad unutar laboratorija. Također problematika kod enzimskog-imunotesta na čvrstoj fazi se javlja kod specifičnih protutijela koji se dobivaju u laboratorijskim uvjetima preko imunogene reakcije pojedinih životinja (najčešće su to kunići). Što znači da bez prisustva specifičnog protutijela na koje se određeni virus treba vezati, neće doći do vizualne reakcije.

Virusi predstavljaju ogromni problem u suvremenoj poljoprivrednoj proizvodnji. Taj bi problem mogao postati još veći budući da je Europska Unija objavila svoj plan prilikom koje bi se do 2050. godine trebalo ukinuti do 50% danas djelotvornih insekticida (Uredba REACH br. 1907/2006) koje uvelike pomažu pri održavanju određenih vektora u tolerantnom broju, koji bi inače pridonijeli većoj distribuciji pojedinih virusa (posebice štitastih uši). Nakon njihovog ukidanja poljoprivrednici će se morati osloniti više na preventivne i ekološke mjere koje teško da će moći u potpunosti eliminirati vektore biljnih bolesti. Sve ovo predstavljat će velike izazove za vinogradarsku proizvodnju u Hrvatskoj za koju je i ovim istraživanjem potvrđena problematika vezana uz virusna oboljenja kojima se još uvijek ne pridaje dovoljna važnost.

6. Zaključci

Provedenim istraživanjem u vinogradima u okolici Poreča mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Od ukupno 600 analiziranih uzoraka njih 335 (55,8%) se pokazalo pozitivnima na barem jedan od virusa obuhvaćenih istraživanjem

2. Analizom 7 različitih vinograda ukupno je utvrđena zaraza pojedinačnim virusima u slijedećim postocima: GLRaV-3 - 50,16 %, GVA - 18,3 %, GFkV - 7,83 %, GLRaV-1 - 4,3 %, GFLV - 2,83 %, GLRaV-2 - 1,5 % i ArMV - 0,3 %

3. Postotak mješovitih infekcija unutar svih analiziranih uzoraka iznosio je 43,73 %, pri čemu su dominantne kombinacije bile GLRaV-3 + GVA - 16,67 % (100 uzorka) , zatim GFkV + GLRaV-3 - 6 % (36 uzoraka), GFkV + GVA - 4,83 % (29 uzoraka), slijedi kompleks od 3 različita virusa GFkV + GLRaV-3 + GVA - 4,16 % (25 uzoraka), GFLV + GLRaV-3 - 2,3 % (14 uzoraka), GFLV + GVA - 1,83 % (11 uzoraka), GLRaV-1 + GLRaV-3 - 1,3 % (8 uzoraka), GLRaV-2 + GLRaV-3 - 1,16 % (7 uzoraka), GFLV + GFkV - 0,83 % (5 uzorka), GFLV + GFkV + GLRaV-3 + GVA - 0,66 % (4 uzorka), GFkV + GLRaV-1 - 0,5 % (3 uzorka) te na zadnjem mjestu sa najmanjim postotkom zaraze GLRaV-2 + GVA - 0,33 % (2 uzorka).

4. Utvrđena je značajna razlika u zarazi između različitih lokacija, pri čemu je najlošije zdravstveno stanje utvrđeno na lokaciji Puderica gdje se ustanovila 100%-tna zaraza unutar 70 analiziranih uzoraka. Najbolje zdravstveno stanje pokazalo se na lokaciji Boveda, gdje je utvrđena zaraza od samo 10 %, pri kojoj dominira prisustvo GLRaV-3 - 7 %, GFLV - 2% i GLRaV-2 - 1 %.

8. Literatura

1. Andabaka Ž., Stupić D., Marković Z., Preiner D. (2011). Novi trendovi u proizvodnji sadnog materijala autohtonih sorata vinove loze u Hrvatskoj, Glasnik zaštite bilja 1/2011., 46-56

2. Attalah S., Gomez M., Fuchs M., Marinson T. (2012). Economic impact of grapevine leafroll diesease on Vitiss vinifera cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York, American Journal of Enology and Viticulture 63, 73-79

3. Aydin S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, Firat University, School of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Turkey, 4-15

4. Basso M. F, Fajardo T. V. M., Saldarelli P. (2015). Grapevine virus diseases: economic impact and current advances in viral prospection and management, Plant Biotechnology, Brasil, 1-13

5. Byzova N. A., Vinogradova S. V., Porotikova E. V., Terekhova U. D., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. (2018). Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Grapevine Leafroll-Associated Virus. Biosensors 8 (4), E111, 2-12

6. Ciccarone A. (1961). Osservazioni su alterazioni virosiche e virus-simili della vite in Puglia. Notiziario sulle Malattie delle Piante 55, 99-102

7. Clark M. F. (1981). Immunosorbent assays in plant pathology, Plant Pathology Department, East Malling Research Station, U.K., 83-101

8. Clark M. F., Adams A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Virol 34:475-83, East Malling Research Station, U.K., 15-16

9. Constable F. E., Nicholas P., Rodoni B. C. (2010). Development and validation of diagnostic protocols for the detection of endemic and exotic pathogens of grapevines, Department of Primary Industries, Grape and Wine research and development corporation, Australia, DPI 05/04, 18-61

10. Engelbrecht D. J., Kasdorf G. G. F. (1990). Transmission of grapevine leafroll disease and associated closteroviruses by the vine mealybug ‚*Planoccocus ficus*, Phytophylactia, 22, Vol. 98, 1093-1097

11. Fortusini A., Scattini G., Prati S., Cinquanta S., i Belli G. (1997). Transmission of Grapevine leafroll virus 1 (GLRaV-1) and Grapevine virus A (GVA) by scale insects. Lisbon, Portugal 121-122.

12. Fuchs M. (2020). Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted managements solutions in the vineyard, Journal of Plant Pathology, 2-12

13. Gale G. (2000). Saving the vine from Phylloxera, University of Missour-Kansas city, ResearchGate, 70-87

14. Gelderblom H. R. (1996). Structure and Classification of Viruses, Medmicro Chapter 41, Research Gate, 1-14

15. 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

16. Hommay G., Komar V., Lemaire O., Herrbach E. (2008). Grapevine virus A transmission by larvae of Parthenolecanium corni, European Journal of Plant Pathology, 121, 185-188, Theoretical and Applied Genetics, 121, 789-799

17. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (2019). Godišnje izvješće za 2019. godinu, annual report, dostupno: https://www.hapih.hr/wp-content/uploads/2020/11/CVVU-CVP-Godisnje-izvjesce-za-2019.pdf

18. Ilak Peršurić A., Radeka S., Peršurić Đ. (2014). Ampelografska i gospodarska varijabilnost Terana, Institut za poljoprivredu i turizam, 671-675

19. Ivanowski D. (1892). Concering the mosaic disease of the tobacco plant, Phytopathological Classics No. 7, 25-30

20. Ivić D., Fazinić T. (2011). Gospodarski značajni virusi vinove loze, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zavod za zaštitu bilja, Zagreb

21. Kirgija I. (2012). O loznim cijepovima, glasnik zaštite bilja 6/2012

22. Le Maguet J., Beuve M. ,Herrbach E., Lemaire O. (2012). Transmission of six ampeloviruses and two vitiviruses to grapevine by *Phenacoccus aceris,* Phytopathology, 102, 717-723

23. Maletić E. (2014). Hrvatsko vinogradarstvo i vinarstvo - gospodarski značaj i potencijal, Agronomski fakultet u Zagrebu, prezentacija, dostupno: https://bbz.hr/images/uploads/1640/hrvatsko_vinogradarstvo_i_vinarstvo.pdf

24. 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, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb

25. Maletić E., Pejić I., Karoglan Kontić J., Zdunić G., Preiner D., Šimon S., Andabaka Ž., Žulj Mihaljević M., Bubola M., Marković Z., Stupić D., Mucalo A. (2015). Ampelographic and genetic characterization of Croatian grapevine varieties, Vitis 54 (Special Issue), 93-98

26. Maliogka V. I., Martelli G .P., Fuchs M., Katis N. I. (2015). Control of Viruses Infecting Grapevine, Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology, Cornell University, New York, Volume 91, 176-213

27. Martelli G. P. (1993). Graft-transmissible diseases of grapevines. Hanbook for detection and diagnosis, International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), FAO, Rome, Italy

28. Martelli G. P. (2018). Where grapevine virology is heading to, Council for the Study of virus and virus-like diseases of the grapevine (ICVG), Santiago, Chile 9-12

29. Martelli G. P. (2014). Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. Journal of Plant Pathology 96(S1): 1– 136

30. Martelli G. P., Boudon-Padieu E. (2006). Directory of infectios diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004, Options Méditerranéennes Série B, No. 55

31. Meng, B., Martelli, G. P., Golino, D. A., Fuchs, M. (2017). Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management, Springer, Cham.

32. Mirošević N. (2007). Vine Propagation and Nursery Production. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, Croatia

33. Mirošević N., Karoglan-Kontić J. (2008). Vinogradarstvo, Nakladni zavod globus, Zagreb

34. Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. (2013). Molecular Virology, article from the book: Viruses: Definition, Structure, Classification, Springer-Verlag, Berlin, 17-30

35. Panjan M., Šarić A. (1963). Serološka dijagnostika Arabis mozaik virusa iz vinove loze i trešnje gel-difuznom metodom, Institut za zaštitu bilja Poljoprivrednog fakulteta, Zagreb, 204-205

36. Peršurić Đ., Gluhić D., Ilak Peršurić A. S. (2009). Pregled istraživanja šest sorata vinove loze u Istri, Agronomski glasnik 4/2009, Stručni članak, 307-315

37. Peršurić Đ., Ilak Peršurić A. S., Godena S., Sinčić M., Užila Z. (2006). Ampelographic Description and Sanitary Analysis of Four Istrian Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.), Vol. 77, 113-117

38. Poljuha D., Sladonja B., Bubola M. (2010). Incidence of viruses infecting grapevine varieties in Istria (Croatia), Journal of food, Agriculture and Environment, Vol. 8 (1), 166-169

39. Sabanadzovic S., Abou-Ghanem N., Castellano M. A., Digiaro M., Martelli G. P. (2000). Grapevine fleck virus-like viruses in *Vitis*, Insituto Agronomico Mediterraneo, Valenzano, Bari, Italy, Arch Virol 145: 553-565

40. Sanfaçon H., Wellink J., Le Gall O., Karasev A., Van der Vlugt R., Wetzel T. (2009). Secoviridae: a proposed family of plant viruses withing the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. Arch Virol; 154 (5), 899-907

41. Sorensen W. C., Smith E. H., Smith J., Carton Y. (2008). American entomologist, No 3. , odlomak iz knjige: Charles V. Riley, France, and Phylloxera, Vol. 54, 134-148

42. Van Zyl, S., Walker M. A. (2012). Xiphinema index and its Relationship to Grapevines: A review, Article in South African Journal of Enology and Viticulture, ResearchGate, Vol. 33, 21-29

43. Vivier M. A., Pretorius I. S. (2000). Genetic improvement of grapevine: Tailoring grape varieties for the third millenium - Review. SOuth Aftican Journal of Enology and Viticulture, 21, 5-26

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

45. Vončina D. (2021). Rasprostranjenos ekonomski važnih virusa u Republici Hrvatskoj I njihov utjecaj na vinogradarsku proizvodnju, Zavod za fitopatologiju, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Glasilo biljne zaštite 3/2021

46. 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, Journal of Central European Agriculture, 2019., 20 (1), 262-273

47. Zorloni A. , Prati S., Bianco P., Belli G. (2006). Transmission of Grapevine virus A and Grapevine leafroll-associated virus 3 by *Heliococcus bohemicus*, Journal of Plant Pathology, 88, 325-328

8.1. Ostali literaturni navodi

1. http://icvg.org/resources.cfm > Pristupljeno 25.06. 2021.
2. https://narodnenovine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2006_12_133_3024.html > Pristupljeno 12.08. 2021.
3. https://www.europarl.europa.eu/factsheets/hr/sheet/78/kemikalije-i-pesticidi > Pristupljeno 20.08. 2021.
4. https://www.oiv.int/public/medias/7909/oiv-state-of-the-world-vitivinicultural-sector-in-2020.pdf > Pristupljeno 25.06. 2021.
5. https://agrilifeextension.tamu.edu/library/gardening/virus-disease-guide-in-grapes/ > Pristupljeno 25.06. 2021.
6. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/?uri=celex%3A32005L0043 > Pristupljeno 20.08. 2021.

9. Kratka biografska bilješka



Kristian Đurić-Stjepanović, rođen 28.06. 1996. godine u Nürnbergu. Nakon završetka Osnovne škole Nikola Tesla u Zagrebu, svoj put usmjerava u kemijsku školu te upisuje Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, gdje je maturirao 2015. godine. Nakon godinu dana pauze od srednjoškolskih dana, 2016. godine upisuje trogodišnji redovni preddiplomski studij Agronomskog fakulteta u Zagrebu, smjer „Hortikultura“. Titulu univ. bacc. ing. agr. stječe 2019. godine obranom završnog rada naslova: „Značajke kvalitetnog vinogradarskog položaja“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Marka Karoglana, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo. Iste godine pod dilemom upisuje studij „Fitomedicina“ na Agronomskom fakultetu u Zagrebu gdje se počinje zanimati za fitopatologiju. U akademskoj godini 2020/2021 izrađuje diplomski rad pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Darka Vončine na Zavodu za fitopatologiju naslova: „Ekonomski značajni virusi vinove loze u vinogradima u okolici Poreča“.