Zastupljenost ekonomski značajnih virusa u vinovoj lozi sorte Babić

Culjak, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:204:722171

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

ZASTUPLJENOST EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA U VINOVOJ LOZI SORTE BABIĆ

DIPLOMSKI RAD

Ana Culjak

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:

Fitomedicina

ZASTUPLJENOST EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA U VINOVOJ LOZI SORTE BABIĆ

DIPLOMSKI RAD

Ana Culjak

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Darko Vončina

Zagreb, rujan, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Ana Culjak**, JMBAG 0178114684, rođen/a 17.09.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

ZASTUPLJENOST EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA U VINOVOJ LOZI SORTE BABIĆ

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 studentice **Ane Culjak**, JMBAG 0178114684, naslova

ZASTUPLJENOST EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA U VINOVOJ LOZI SORTE BABIĆ

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	izv. prof. dr. sc. Darko Vončina	mentor	_____
2.	prof. dr. sc. Edi Maletić	član	_____
3.	prof. dr. sc. Edyta Đermić	član	_____

Zahvala

Ovim putem želim se zahvaliti svom mentoru izv. prof. dr. sc. Darku Vončini na savjetima i usmjeravanju tokom izrade ovog diplomskog rada i što je ovaj, studentu najteži dio po završetku studija, svojim pristupom učinio lakšim.

Veliko hvala mojim bližnjima na pruženoj potpori tijekom mog studiranja i što su vjerovali u mene onda kada mi je to najviše trebalo.

Hvala od srca!

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. Cilj istraživanja 1

2. PREGLED LITERATURE 2

2.1. Babić 2

2.1.1. Populacija i ugroženost sorte Babić 3

2.2. Ekonomski značajni virusi vinove loze 4

2.2.1. Virus lepezastog lista vinove loze (grapevine fanleaf virus, GFLV) 5

2.2.3. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 i 3 (grapevine leafroll-associated virus 1 and 3; GLRaV-1, GLRaV-3) 7

2.3. Imunoenzimska ELISA metoda 8

2.3.1. Antitijela 8

2.3.2. DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) 9

3. MATERIJALI I METODE 10

3.1. Prikupljanje uzoraka 10

3.2. Metoda ELISA 11

3.2.1. ELISA (prvi dan) 12

3.2.2. ELISA (drugi dan) 15

4. REZULTATI 16

5. RASPRAVA 21

6. ZAKLJUČAK 23

7. LITERATURA 24

8. PRILOG 26

ŽIVOTOPIS 32

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ane Culjak**, naslova

ZASTUPLJENOST EKONOMSKI ZNAČAJNIH VIRUSA U VINOVOJ LOZI SORTE BABIĆ

Vinova loza je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura u Republici Hrvatskoj. Vinovu lozu može zaraziti velik broj virusa, a prema literaturnim podacima do danas je u lozi otkriveno 86 različitih virusa. Nisu svi virusi ekonomski značajni, no oni koji jesu su: virus mozaika gušarke (ArMV), virus lepezastog lista vinove loze (GFLV), uvijenosti lista vinove loze pridruženi virusi 1, 2 i 3 (GLRaV-1, GLRaV-2, GLRaV-3), virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV), A-virus vinove loze (GVA) te B-virus vinove loze (GVB). Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi prisutnost i učestalost pojave ekonomski značajnih virusa ArMV, GFLV, GLRaV-1 te GLRaV-3 kod autohtone sorte Babić u njenim glavnim uzgojnim područjima. Testirano je ukupno 232 uzorka prikupljenih sa 10 različitih lokacija. Za testiranje je korištena imunoenzimska ELISA metoda. Potvrđena je prisutnost svih ispitivanih virusa. Najzastupljeniji virus je bio GLRaV-3 (97,84%), a zatim GFLV (31,47%) te GLRaV-1 (5,17%). Utvrđena prisutnost ArMV od 3,02% je upitna zbog niske koncentracije virusa. Utvrđene su i mješovite infekcije od kojih je najčešća bila kombinacija GFLV + GLRaV-3 (29,31%). Od svih testiranih uzoraka, kod samo 4 (1,72%) nije utvrđena prisutnost virusa obuhvaćenih istraživanjem.

Ključne riječi: vinova loza, virusi, ELISA

Summary

Of the master's thesis – student **Ana Culjak,** entitled

INCIDENCE OF ECONOMICALLY IMPORTANT VIRUSES IN GRAPEVINE VARIETY BABIĆ

The grapevine is one of the most important agricultural crops in the Republic of Croatia. Grapevine can be infected by a large number of known viruses, and according to literature 86 different grapevine viruses have been discovered. Not all viruses are economically significant, but those considered as important are: arabis mosaic virus (ArMV), grapevine fanleaf virus (GFLV), grapevine leafroll-associated virus – 1, 2 and 3 (GLRaV-1,GLRaV-2, GLRaV-3), grapevine fleck virus (GFkV), Grapevine virus A (GVA) and B (GVB). The aim of this study was to determine the presence and frequency of the economically important viruses ArMV, GFLV, GLRaV-1 and GLRaV-3 in the autochthonous variety Babić collected from its main growing areas. In total 232 samples were collected from 10 different locations. Samples were tested using the immunoenzymatic ELISA method. The presence of all viruses included in survey was confirmed. The most common was GLRaV-3 (97,84%), followed by GFLV (31,47%) and GLRaV-1 (5,17%). Determined ArMV frequency of 3,02% is questionable due to low virus concentration. Mixed infections have also been identified and the most common combination was GFLV + GLRaV-3 (29,31%). Of all the tested samples, only in 4 (1,72%) presence of studied viruses was was not confirmed.

Keywords: grapevine, viruses, ELISA

1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) je autohtona vrsta Europe i zapadne Azije (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008.). Pripada rodu *Vitis*, jedinom gospodarski važnom od deset rodova porodice *Vitaceae*. Gospodarski je najvažnija vrsta ovog roda, a njeni plodovi se koriste za ljudsku ishranu, kao voće ili za preradu u vino, sušenje ili proizvodnju nekih drugih prehrambenih proizvoda te farmaceutskih pripravaka (Maletić i sur., 2015.). Povijest vinogradarstva je duga koliko i povijest ljudske civilizacije. U arheološkim nalazima najstarijih civilizacija postoje dokazi o razvijenom vinogradarstvu i proizvodnji vina. Otkrićem i naseljavanjem novih kontinenata, uzgoj vinove loze, proizvodnja grožđa i njegova prerada prenesena je i na nove kontinente, pa je tako danas vinogradarstvo rasprostranjeno na svim kontinentima, osim Antarktike. S klimatske strane, vinovoj lozi najviše odgovaraju područja umjerenog toplinskog pojasa, sa pravilno izmjenom godišnjih doba te je iz tog razloga Hrvatska povoljna za razvoj i uzgoj vinove loze (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008.).

U Republici Hrvatskoj, vinova loza je jedna od najznačajnijih poljoprivrednih kultura, a uz njenu proizvodnju je vezan velik broj stanovništva. Vinogradarstvo prate razni rizici, kao i svaku drugu poljoprivrednu proizvodnju, a rizik od gubitaka u proizvodnji radi pojave štetnika ili bolesti, posebno je izražen kod vinove loze. Poznavanje virusnih bolesti kod ove kulture je uglavnom vrlo slabo među proizvođačima. Štetnost, značaj, način širenja i mjere zaštite od virusa nisu dovoljno poznati velikom broju agronoma, a čak ni stručnjacima za zaštitu bilja. Vinovu lozu može zaraziti velik broj poznatih virusa, od kojih samo nekoliko uzrokuje značajne štete te se smatraju gospodarski i ekonomski značajnim virusima (Ivić i Fazinić, 2011.). Do danas je poznato da vinovu lozu može zaraziti preko 86 virusa, što ju čini drvenastom kulturom s najvećim brojem poznatih virusa, no manji broj se smatra ekonomski značajnima. što lozi daje epitet drvenaste kulture s najvećim brojem poznatih virusnih bolesti (Fuchs, 2020.). Od dugo poznatih, ekonomski značajnih virusnih bolesti, potrebno je istaknuti one iz skupine infektivne degeneracije, uvijenosti lista te naboranosti drveta (Vončina, 2021.). U ovom radu će biti ispitivana prisutnost virusa iz skupine infektivne degeneracije te 2 virusa iz skupine uvijenosti lista na sorti Babić.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj rada je utvrditi prisutnost i učestalost pojave ekonomski značajnijih virusa u glavnim uzgojnim područjima sorte Babić.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Babić

Babić je autohtona hrvatska sorta, podrijetlom iz šibenskog područja, a od tamo se proširila i u ostala vinogorja Dalmacije. Najrasprostranjenija je na području Primoštena, u čistim nasadima. Na drugim područjima izmiješana je s drugim sortama, a danas osim u šibenskom području, Babić je najrasprostranjeniji na Korčuli (Mirošević i Turković, 2003.).

Vršci mladica su uspravni ili blago povinuti, svijetlozelene boje te slabo paučinasti. Mladica je tanka, svijetlozelena i može biti blago broncirana na strani koja je izložena suncu. Cvijet je dvospolan. Odrasli listovi su srednje veličine s izraženim polimorfizmom, okrugli ili malo izduženi, peterodijelni su te golog lica i naličja. Sinusi su srednje do duboko urezani i preklopljeni. Sinus peteljke je poput slova „U“, a peteljka je tanka, dugačka i krhka, od osnove zelena ili slabo odrvenjela. Vršni zupci su karakteristično uski, malo zavinuti te nejednaki. Zreli grozd je srednje velik do velik. Često ima razvijeni sugrozdić iz koljenca poput glavnoga grozda koji piramidalan s obješenim krilcima uz glavnu os. Zrele bobice su srednje do velike, obojene tamnoplave, okrugle, sa mekom i tankom kožicom te sočnim mesom (slika 2.1.). Rozgva je tanka, svijetlosmeđih, srednje dugih članaka i tamnije oboljenih koljenaca te plitko žljebasta. Rast ove sorte je srednje bujnosti (Mirošević i Turković, 2003.).



Slika 2.1. Babić – izgled grozda, listova i rozgve
Izvor: https://suhiucasi.wordpress.com/2021/01/ - pristupljeno: 23.06.2022.

Babić izuzetno dobru kakvoću postiže u suhim, kamenim tlima na položajima koji su izloženi suncu s izrazito toplom mikroklimom. Oplodnja je redovita, ali u nepovoljnim godinama može doći do osipanja. Ova sorta dozrijeva u trećem razdoblju. Ima slabiju bujnost stoga joj ne odgovaraju sustavi uzgoja s većom eskpanzijom. Odgovaraju joj niski i povišeni sustavi uzgoja ovisno o samom staništu, primjenom kratkog reza. Rodnost je redovita i obilna, posebice u plodnijim i vlažnijim tlima. Ima vrlo slabu otpornost prema bolestima, a posebno je osjetljiva na plamenjaču i sivu trulež. Ima dobru srodnost s podlogama. Babić je tipična vinska sorta koja na škrtim terenima daje visoku kakvoću, a u uvjetima dobre plodnosti mogu se postići vrlo visoki prinosi i vina osrednje kakvoće. Koncentracija sladora ovisi o staništu, a kreće se od 15% pa do 20%, uz 5 do 7 g/l ukupne kiselosti. Bez obzira što ima dobru obojenost kožice, obično vina dobivena od grožđa iz „polja“ dosta su svijetla, tanka i i imaju specifičan, nekad i neugodan miris (Mirošević i Turković, 2003.).

2.1.1. Populacija i ugroženost sorte Babić

Uz Plavac mali crni i Plavinu, Babić je crna autohtona sorta s najvećom populacijom, s obzirom da se uzgaja na 370 ha. Smatra se niskorizičnom sortom, no uzgoj na ograničenom prostoru može predstavljati određenu prijetnju za njezinu populaciju. Daljnjem širenju i reprodukciji prepreku predstavlja nedostatak certificiranog (bezvirusnog) sadnog materijala, a u dosadašnjim istraživanjima još nije pronađen niti jedan trs sorte Babić na kojem nisu prisutni gospodarski štetni virusi. Zbog toga je nužno započeti postupak njezina ozdravljivanja i mikropropagacije u kulturi tkiva kako bi se stvorili preduvjeti za osnivanje baznog matičnog nasada i daljnje razmnožavanje (Maletić i sur., 2015.).

2.2. Ekonomski značajni virusi vinove loze

Virusi su zarazne čestice promjera od oko 16 nm do preko 300 nm, a njihova mala veličina čini ih ultrafiltrirajućim, tj. ne zadržavaju ih bakterijski filteri. Evoluirali su tijekom dugog razdoblja i prilagodili su se određenim organizmima ili njihovim stanicama. Ne razmnožavaju se diobom, kao bakterije, kvasci ili druge stanice, ali se repliciraju u živim stanicama koje zaraze (Modrow i sur., 2013.). Obligatni su intracelularni paraziti koji sadrže ili RNA ili DNA genom koji je zaštićen virusno-kodiranim proteinskim omotačem (Gelderblom, 1996.).

Biljni virusi su uzročnici biljnih bolesti koji sa svojim štetnim djelovanjem smanjuju prinos i kvalitetu biljnih proizvoda. Poprilično su rasprostranjeni te su danas sve mnogobrojniji na kulturnim biljkama širom svijeta. Ekonomski su značajni zbog bolesti (viroza), koje prouzrokuju. Virusi se znatno razlikuju po opasnosti naspram drugih parazita kulturnih biljaka radi mogućnosti nagomilavanja, odnosno akumulacije virusne zaraze u vegetativnom sadnom materijalu. Razmnožavanjem vegetativnog sadnog materijala zaraza virusima se prenosi na sve slijedeće generacije biljaka. Specifičnost ovih zaraza je u tome što se ne mogu spriječiti ili suzbiti kemijskim mjerama zaštite, koje su uspješne u zaštiti biljaka od gljiva i bakterija. Oboljele biljke ne mogu se liječiti, stoga ostaju trajno zaražene (Bagi i sur., 2016.).

Prema Fuchsu (2020.) do danas je izolirano 86 različitih virusa vinove loze diljem svijeta, no malo ih je ekonomski značajnih. Neki od njih su: 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), te uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 3 (GLRaV-3), virus pjegavosti lista vinove loze (GFkV), A-virus vinove loze (GVA), te B-virus vinove loze (GVB) (Ivić i Fazinić, 2011.). U ovom radu ispitivani su ekonomski značajni virusi ArMV i GFLV koji uzrokuju infektivnu degeneraciju te GLRaV-1 i GLRaV-3 koji uzrokuju uvijenost lista vinove loze.

Kontrola virusnih bolesti vinove loze kao glavne ciljeve ima prevenciju i suzbijanje inokuluma virusa u vinogradu (Maliogka i sur., 2015.). Sprječavanje unošenja virusa u nove vinogradarske parcele prvenstveno se postiže pažljivim odabirom sadnog materijala dobivenog iz virusno testiranih (negativnih) matičnih nasada vinove loze (Fuchs, 2020. ; Golino i sur., 2017a). Smanjenje inokuluma virusa u zaraženim vinogradima postiže se uklanjanjem cijelih vinograda, u kombinaciji s kontrolom populacija vektora, ovisno o razini zaraze virusom i dinamici širenja (Fuchs, 2020.).

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

Najznačajniji virus iz skupine infektivne degeneracije je virus lepezastog lista vinove loze (GFLV), jer se za tu kulturu smatra potencijalno najštetnijim virusom uz uvijenost lista vinove loze (Basso i sur. 2015.). Štete koje uzrokuje ovaj virus ogledaju se u vidu smanjenog prinosa, smanjene količine šećera i kiselina u grozdovima, negativnog utjecaja na vigor i razvoj biljke te skraćivanja životnog vijeka biljke (Ivić i Fazinić, 2011.). GFLV pripada rodu *Nepovirus* iz porodice *Secoviridae* te se lako širi cijepljenjem i upotrebom zaraženog materijala, ali se također može poluperzistentno prenositi s loze na lozu ektoparazitskom američkom kopljastom nematodom *Xiphinema index* (porodica *Longidoridae*) koja se hrani rastućim vrhovima korijena (Andret-Link i sur., 2004.).

Simptomi zaraze uključuju morfološke promjene i promjene u boji. Virus je dobio naziv po promjenama koje uzrokuje na listovima zaražene loze, koja gubi karakterističan oblik za određenu sortu te se listovi deformiraju u lepezasti oblik. Također, može doći do abnormalog grananja rozgve i asimetričnog rasta. Promjene u boji se najčešće karakteriziraju u vidu „žutog mozaika“ (slika 2.2.1.1.) ili žućenja lišća koje je izraženije tijekom proljeća (Bagi i sur., 2016.).



Slika 2.2.1.1. Žuti mozaik uzrokovan virusom lepezastog lista vinove loze
Izvor: https://extension.okstate.edu/programs/digital-diagnostics/plant-diseases/grapevine-fanleaf-virus.html - pristupljeno: 30.06.2022.

2.2.2. Virus mozaika gušarke (arabic mosaic virus, ArMV)

Uz GFLV, kao izrazito štetan virus iz skupine uzročnika infektivne degeneracije je virus mozaika gušarke (ArMV). Također pripada rodu *Nepovirus* te negativno utječe na količinu i kakvoću prinosa te na vigor i životni vijek zaražene biljke. Zbog zaraze ovim virusom, zabilježeni su slučajevi brzog odumiranja pojedinih sorata koje su osjetljive (Ivić i Fazinić, 2011.). ArMV se također prenosi zaraženim sadnim materijalom, a širenje unutar vinograda, odvija se europskom kopljastom nematodom *Xiphinema diversicaudatum* (Vončina, 2021.). Simptomi viroze su mozaik i šarenilo listova (slika 2.2.2.1.), zaostajanje biljaka u rastu, a u nekim slučajevima i formiranje enacija. Postoji mogućnost i latentnih infekcija, bez vidljivih simptoma (Bagi i sur., 2016.).

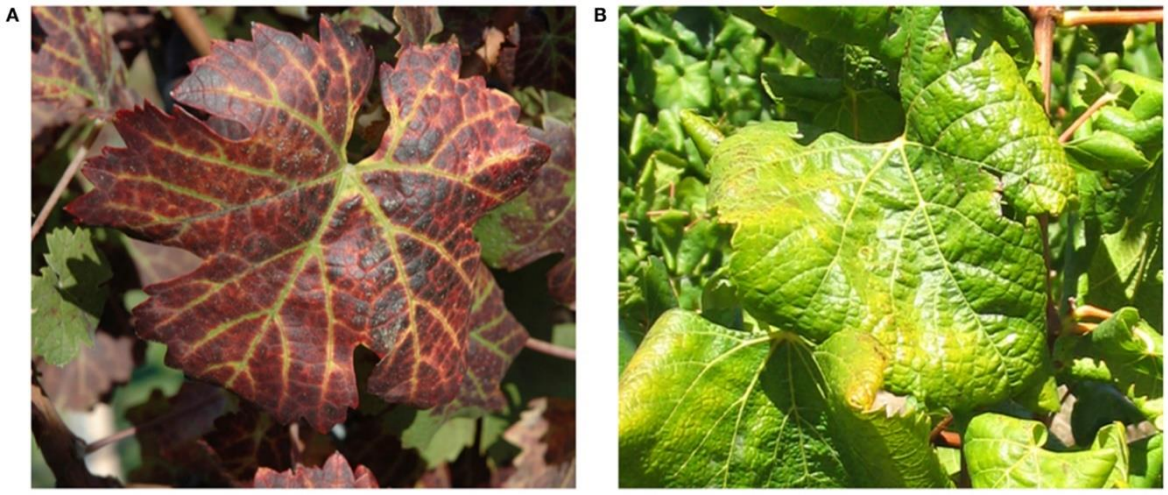


Slika 2.2.2.1. Simptomi na lišću uzrokovani virusom mozaika gušarke
Izvor: https://extension.okstate.edu/programs/digital-diagnostics/plant-diseases/arabis-mosaic-virus.html - pristupljeno 30.06.2022.

2.2.3. Uvijenosti lista vinove loze pridruženi virus 1 i 3 (grapevine leafroll-associated virus 1 and 3; GLRaV-1, GLRaV-3)

Virusi iz skupine uvijenosti lista rasprostranjeni su u svim uzgojnim područjima vinove loze i uzrokuju znatne ekonomske štete (Vončina, 2021.). U ovu skupinu spadaju virusi iz porodice *Closteroviridae*, a GLRaV-1 i GLRaV-3 pripadaju rodu *Ampelovirus*. Najčešći prenosioci ovih virusa su vunaste (*Pseudococcidae*) i štitaste uši (*Coccidae*), koje unose virusne čestice na način da svojim usnim organom ubadaju biljku do floema (Pavletić, 2019.).

Najuočljiviji simptomi zaraze ovim virusima manifestiraju se na listovima (Vončina, 2021.). Kod crvenih sorti vinove loze u kasno proljeće ili ljeto, razvijaju se crvenkaste pjege u donjem dijelu lišća, ovisno o klimi i zemljopisnom položaju. Ove mrlje se s vremenom šire i spajaju tako da u jesen veći dio lisne površine postaje crvenkast, obično ostavljajući usku zelenu traku duž primarne i sekundarne žile (slika 2.2.3.1.). Lisna površina postaje debela, lomljiva i uvija se prema dolje. U najtežim slučajevima i vrlo kasno u sezoni, cijela površina lista postaje tamno ljubičasta. Plodovi često nepravilno i kasno sazrijevaju (Martelli, 2014.). Promjene na listovima mogu se negativno odraziti i na prinos, dozrijevanje grožđa i aromu mošta. GLRaV-1 utječe na smanjenje prinosa, dok GLRaV-3 utječe na smanjenje količine šećera. Ova dva virusa su česti u kombinaciji odnosno mještovitim infekcijama, čime se njihovo štetno djelovanje povećava (Vončina, 2021.). Kod bijelih sorata vinove loze simptomi su slični, ali listovi postaju klorotični do žućkasti (slika 2.2.3.1.), umjesto crvenkasti (Martelli, 2014.).



Slika 2.2.3.1. Simptomi uvijenosti lista na crvenoj (A) i bijeloj (B) sorti vinove loze
Izvor: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2013.00082/full - pristupljeno: 30.06.2022.

2.3. Imunoenzimska ELISA metoda

Od mogućih načina detekcije biljnih virusa često se daje prednost serološkim tehnikama zbog njihove specifičnosti, brzine i područja standardizacije. Međutim, za mnoge važne viruse konvencionalne serološke tehnike ne mogu se koristiti zbog ograničenja kao što su niske koncentracije virusa, neprikladna morfologija čestica ili prisutnost virusnih inaktivatora ili inhibitora u biljnim ekstraktima. Ova ograničenja u velikoj mjeri mogu biti prevladana korištenjem imunoenzimske ELISA metode (Clark i Adams, 1977.).

Imunoenzimski test ELISA (eng. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) se koristi za određivanje prisutnosti i količine antigena. Reakcija ELISA se temelji na vezanju antitijela i antigena iz uzorka te spektrofotometrijskom mjerenju nastale reakcije, do koje dolazi zbog promjene boje (Butorac i sur., 2013.). U laboratorijskoj dijagnostici metoda ELISA koristi se u obliku raznih komercijalnih pribora, a svaki set u osnovi sadrži: čvrstu površinu, antigen ili antitijelo vezano za čvrstu površinu, uzorke pozitivne i negativne kontrole, konjugat, podlogu, sredstvo za ispiranje te otopinu za zaustavljanje enzimske reakcije (Đurišić i sur., 2003.).

ELISA se najčešće izvodi na mikrotitarskim pločicama sa 96 jažica (obično se 92 jažice koriste za uzorke, a po 2 za pozitivnu i negativnu kontrolu). Izvedba ove metode uglavnom traje 2 dana, a četiri osnovne izvedbe su:

1. DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA)
2. DASI-ELISA (double antibody sandwich indirect ELISA)
3. Izravna (direktna) ELISA
4. Neizravna (indirektna) ELISA

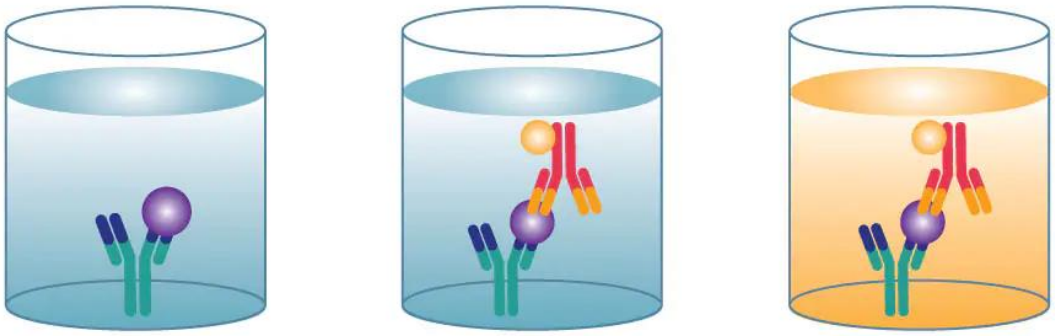
Za potrebe ovog istraživanja korištena je DAS-ELISA metoda.

2.3.1. Antitijela

ELISA je sada sveprisutna u dijagnostičkim i istraživačkim laboratorijima zahvaljujući svojoj jednostavnosti i praktičnosti koju daje sposobnost antitijela da veže antigen s velikom specifičnošću i afinitetom. Metoda ELISA je dobra onoliko koliko su dobra antitijela koja koristi. Najčešća antitijela koja se koriste u dijagnostici virusa su poliklonska antitijela (PAb) proizvedena u zečevima, ovcama ili kozama, a proizvode se pri injektiranu pročišćenog virusa u životinju. Nasuprot tome, monoklonska antitijela (MAbs) proizvodi jedan klon limfocita B koji se ekstrahira iz miša izloženog antigenu te spaja sa stanicom mijeloma. Neke od glavnih karakteristika antitijela su njihova specifičnost, afinitet i avidnost (čvrstoća veze antigena i antitijela). Specifičnost je definirana s obzirom koliko dobro antitijelo može prepoznati određeni epitop (Meng i sur., 2017.).

2.3.2. DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA)

DAS-ELISA metodu razvili su Kato i njegovi suradnici 1977. godine (Aydin, 2015.). Kod ove metode koristi se sistem „sendviča“ – antigen se nalazi u sendviču između dva antitijela: primarnog i sekundarnog. Antigen iz ispitivanog materijala, ako je prisutan, vezati će se za specifično antitijelo koje je vezano za dno jažice mikrotitarske pločice. Nakon ispiranja, dodaje se konjugat odnosno konjugirana antitijela koja se vežu na antigen. Enzim tada reagira s supstratom i dolazi do promjene boje (slika 2.3.2.1.). Promjena boje ukazuje na pozitivan nalaz, a intenzitet boje proporcionalan je količini antigena prisutnog u ispitivanom materijalu (Đurišić i sur., 2003.).



Slika 2.3.2.1. Shematski prikaz DAS-ELISA metode
Izvor: https://www.rndsystems.com/resources/what-is-an-elisa-and-elisa-types - pristupljeno: 30.06.2022.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Prikupljanje uzoraka

Terenski dio ovog istraživanja, odnosno prikupljanje uzoraka za laboratorijsko testiranje, provedeno je u glavnom uzgojnim područjima sorte Babić, na 10 različitih lokacija (tablica 3.1.1.). Uzorci su prikupljeni u mirovanju vegetacije, u periodu prosinac 2021. – veljača 2022. Sa svakog trsa uključenog u istraživanje prikupljene su tri dobro odrvenjele reznice sa kojih će struganjem biti skinuto floemsko tkivo koje će se koristiti dalje za laboratorijski dio istraživanja. Uzorci su označeni, stavljeni u plastične vrećice i na čuvanje u hladnjak na temperaturi od 4 ˚C do provedbe ELISA testa.

Tablica 3.1.1. Popis lokacija po uzorcima

OZNAKA UZORKA	LOKACIJA
B1 – B120	Jadrtovac, Donje polje
121 – 130	Primošten, Bucavac I
131 – 135	Primošten, Bucavac II
138 – 144	Primošten, Bucavac – Brne-jug
145 – 159	Primošten, Bucavac – Vezac donji
160 – 169	Šibenik, Dubrava I
170 – 179	Šibenik, Dubrava II
191 – 199	Pirovac, Drinovača
200 – 205	Primošten, Bucavac – Vezac donji
216 - 240	Pirovac, Spužvice
241 - 255	Vodice Tribunj, Bili brig

Laboratorijski dio istraživanja proveden je na Zavodu za fitopatologiju Agronomskog fakulteta (Sveučilište u Zagrebu) u periodu od veljače do ožujka 2022. godine. Analizirano je ukupno 232 uzorka sorte Babić na prisutnost četiri ekonomski značajna virusa:

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

3.2. Metoda ELISA

Prije početka pripreme uzoraka i provođenja metode ELISA pripremljeni su slijedeći puferi: ekstrakcijski pufer, pufer za ispiranje, pufer za oblaganje, konjugirani pufer te supstratni pufer. Navedeni puferi pripremljeni su prema uputama proizvođača (Agritest, Italija) čiji detalji su opisani u tablici 3.2.1. Razrjeđivanje pufera odrađeno je korištenjem destilirane vode.

Tablica 3.2.1. Priprema pufera prema preporukama proizvođača

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

Kvaliteta ove metode osigurana je pozitivnom i negativnom kontrolom, a te kontrole služe za provjeru odnosno potvrdu prisutnosti virusa u uzorku kod očitanja spektrofotometrom. Za pozitivnu i negativnu kontrolu korištene su liofilizirane kontrole koje se nalaze u priboru, a prije korištenja razrijeđene su destiliranom vodom.

Prema protokolu Agritesta za ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3 provodi se metoda DAS-ELISA koja sadrži poliklonalna antitijela. Primarna antitijela su razrijeđena u puferu za oblaganje, a sekundarna u konjugiranom puferu, sve po preporuci proizvođača u omjerima navedenim u tablici 3.2.2.

Tablica 3.2.2. Priprema protutijela prema preporukama proizvođača

	OMJER
PRIMARNA PROTUTIJELA (GFLV, GLRaV-3)	1:1000
PRIMARNA PROTUTIJELA (ArMV, GLRaV-1)	1:500
SEKUNDARNA PROTUTIJELA (ArMV, GFLV, GLRaV-1, GLRaV-3)	1:500

3.2.1. ELISA (prvi dan)

Priprema uzoraka za testiranje obavljena je na način da se sa svake mladice iz uzorka (3 odrvenjele mladice po uzorku) skinula kora (slika 3.2.1.1.) i potom nožićem sastrugalo floemsko tkivo koje je pomiješano u prosječni uzorak od 0,1 g, izvagan na laboratorijskoj vagi (slika 3.2.1.2.). Nakon toga uzorci su premješteni u označene tubice (slika 3.2.1.3.) u koje je potom dodan ekstrakcijski pufer (slika 3.2.1.4.) Nakon što su svi uzorci pripremljeni (3.2.1.5.), slijedi faza centrifugiranja u kojoj se tekuća faza odvaja od krute radi lakšeg pipetiranja.



Slika 3.2.1.1. Mladice iz uzorka sa skinutom korom
Foto: Culjak, A. 2022.



Slika 3.2.1.2. Izvagani prosječni uzorak

Foto: Culjak, A. 2022.



Slika 3.2.1.3. Uzorak u označenoj tubici

Foto: Culjak, A. 2022.



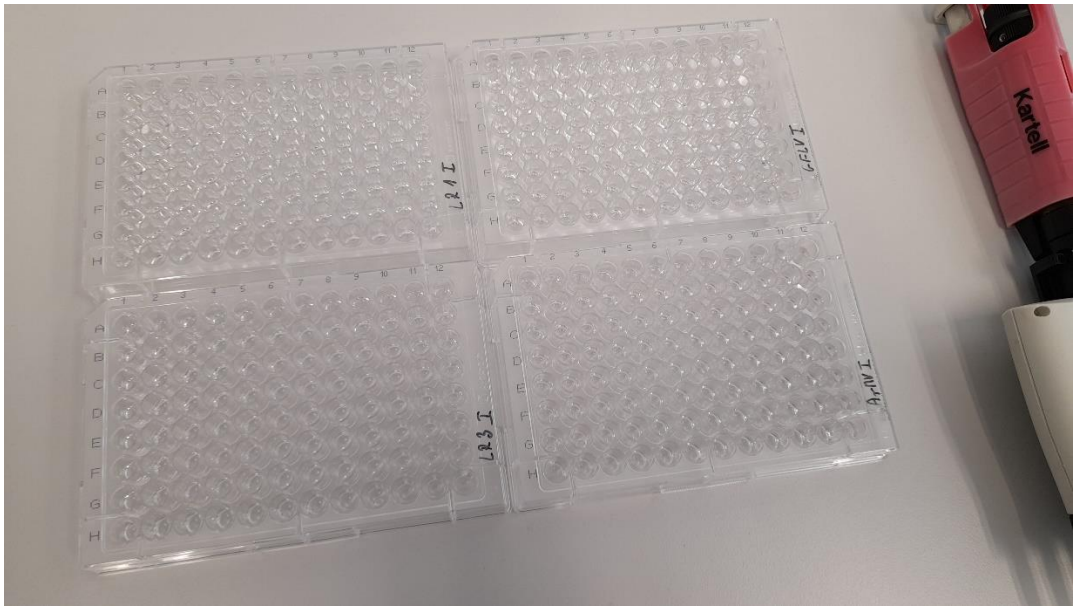
Slika 3.2.1.4. Dodavanje ekstrakcijskog pufera

Foto: Špehar, S. 2022.

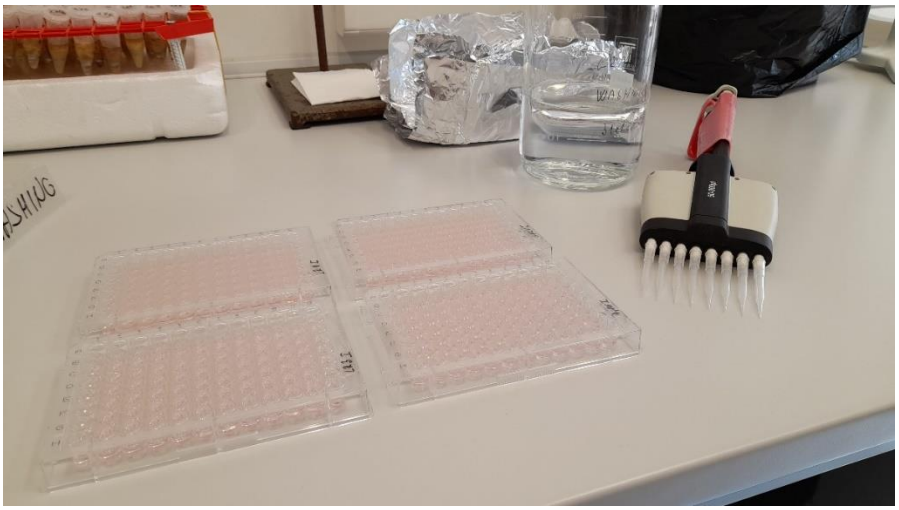


Slika 3.2.1.5. Pripremljeni uzorci
Foto: Culjak, A. 2022.

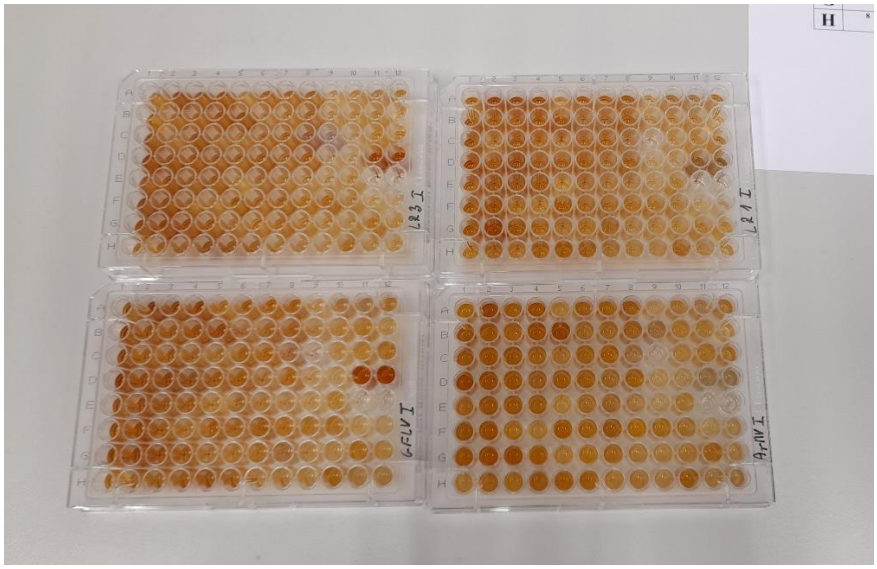
Slijedeći korak je stavljanje 200 µl pufera za oblaganje s primarnim antitijelima u jažicu (slika 3.2.1.6.). Nakon toga pločice se prekrivaju folijom i stavljaju u termostat na inkubaciju u trajanju od 2 sata na 37°C. Poslije inkubacije mikrotitarske pločice su isprane 3 puta puferom za ispiranje sa 200 µl/jažici (slika 3.2.1.7.). U isprane pločice (na koja su se vezala antitijela) stavlja se 200 µl uzorka/jažici. 92 jažice su s uzorkom, 4 jažice s kontrolom – 2 pozitivne i 2 negativne (slika 3.2.1.8.) Tako pripremljene pločice stavljene su u hladnjak na 4°C preko noći.



Slika 3.2.1.6. Stavljanje pufera za oblaganje s primarnim protutijelima u mikrotitarske pločice
Foto: Culjak, A. 2022.



Slika 3.2.1.7. Ispiranje mikrotitarskih pločica
Foto: Culjak, A. 2022.



Slika 3.2.1.8. Mikrotitarske pločice napunjene s uzorcima i kontrolama
Foto: Culjak, A. 2022.

3.2.2. ELISA (drugi dan)

Nakon što se pločice izvade iz hladnjaka ponovno se ispiru istim postupkom kao prethodni dan, a potom se pune sa 200 µl/jažici sekundarnim konjugiranim protutijelima. Slijedeći korak je inkubacija u termostatu na 37°C, 2 sata. Nakon inkubacije, pločice se ponovno ispiru i zatim pune sa supstratnim puferom sa 200 µl/jažici. Nakon toga pločice se prekriju folijom i inkubiraju na sobnoj temperaturi 2h.

Rezultati kod pozitivnih uzoraka su vidljivi u kroz pojavu žute boje, a očitavaju se na spektrofotometru pri valnoj duljini od 405 nm. Pozitivnim uzorcima se smatraju oni čija su spektrofotometrijska očitanja 3x veće od prosjeka očitanja negativnih kontrola.

4. REZULTATI

Nakon provedenog ELISA testa, očitanje rezultata izvršeno je na spektrofotometru BIOTEK EL 800 (Biotek, SAD). Da bi uzorak bio pozitivan 100% mora imati spektrofotometrijsko očitanje barem 3x veće od prosječnog očitanja dvije negativne kontrole, a uzorci čija vrijednost je između dvije i tri prosječne vrijednosti negativnih kontrola su smatrani sa niskom koncentracijom virusa. U tablici 4.1. navedena su očitanja negativnih i pozitivnih kontrola, a u tablici 4.2. navedeni su rasponi kada je uzorak negativan na virus, ima nisku koncentraciju virusa ili je pozitivan, ovisno o spektrofotometrijskom očitanju.

Tablica 4.1. Očitanja negativnih i pozitivnih kontrola

	NEG. KONTROLA 1	NEG. KONTROLA 2	POZ. KONTROLA 1	POZ. KONTROLA 2
ArMV	0.107	0.132	1.449	1.439
GFLV	0.109	0.129	3.418	1.839
GLRaV-1	0.097	0.101	1.591	1.634
GLRaV-3	0.103	0.138	2.521	2.144

Tablica 4.2. Rasponi u kojima je uzorak negativan, ima nisku koncentraciju ili je pozitivan na određeni virus

	NEGATIVAN	NISKA KONCENTRACIJA	POZITIVAN
ArMV	< 0,239	0,239 – 0,359	0,359 >
GFLV	< 0,238	0,238 – 0,357	0,357 >
GLRaV-1	< 0,198	0,198 – 0,297	0,297 >
GLRaV-3	< 0,241	0,241 – 0,362	0,362 >

Na temelju vrijednosti očitanih spektrofotometrom, izračunato je (u postocima) koliko uzoraka je s niskom koncentracijom pojedinog virusa te koliko ih je sigurno pozitivno na pojedini virus (tablica 4.3.) i koliko je mješovitih infekcija prisutno (tablica 4.4.).

Tablica 4.3. Rezultati testiranja na četiri ekonomski značajna virusa metodom ELISA po lokacijama (prvi broj označava uzorke sa niskom koncentracijom virusa, a drugi sigurno pozitivne uzorke)

UZORAK (Lokacije)	**Broj testiranih uzoraka**	**Broj uzoraka pozitivnih na pojedini virus (%)**			
		ArMV	**GFLV**	**GLRaV-1**	**GLRaV-3**
Jadrtovac, Donje polje (B1 – B120)	120	**7 + 0 (5,83%)**	**9 + 4 (10,83%)**	**1 + 4 (4,17%)**	**8 + 108 (96,67%)**
Primošten, Bucavac (121 – 159, 200 – 205)	43	0 (0%)	**8 + 17 (58,14%)**	**2 + 3 (11,63%)**	**0 + 42 (97,67%)**
Šibenik, Dubrava (160 – 179)	20	0 (0%)	**1 + 3 (20%)**	0 (0%)	**8 + 12 (100%)**
Pirovac, Drinovača (191 – 199)	9	0 (0%)	**2 + 2 (44,44%)**	0 (0%)	**0 + 9 (100%)**
Pirovac. Spužvice (216 – 240)	25	0 (0%)	**1 + 14 (60%)**	**0 + 2 (8%)**	**0 + 25 (100%)**
Vodice, Tribunj, Bili brig (241 – 255)	15	0 (0%)	**4 + 8 (80%)**	0 (0%)	**0 + 15 (100%)**
UKUPNO	***232***	***7 (3,02%)***	***73 (31,47%)***	***12 (5,17%)***	***227 (97,84%)***

Tablica 4.4. Prikaz mješovitih infekcija po lokacijama

UZORAK (Lokacije)	Broj testiranih uzoraka	Mješovite infekcije					
		GFLV + GLRaV-3	**GLRaV-1 + GLRaV-3**	**ArMV + GFLV**	**GFLV + GLRaV-1 + GLRaV-3**	**ArMV + GFLV + GLRaV-3**	**ArMV + GLRaV-1 + GLRaV-3**
Jadrtovac, Donje polje (B1 - B120)	120	11 (9,17%)	3 (2,5%)	5 (4,17%)	1 (0,83%)	1 (0,83%)	1 (0,83%)
Primošten, Bucavac I (121 – 130)	10	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Primošten, Bucavac II (131 – 135)	5	4 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)
Primošten, Bucavac – Brne-jug (138 – 144)	7	5 (71,43%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Primošten, Bucavac – Vezac donji (145 – 159)	15	7 (46,67%)	2 (13,33%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Šibenik, Dubrava I (160 – 169)	10	4 (40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Šibenik, Dubrava II (170 – 179)	10	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

UZORAK (Lokacije)	Broj testiranih uzoraka	Mješovite infekcije					
		GFLV + GLRaV-3	**GLRaV-1 + GLRaV-3**	**ArMV + GFLV**	**GFLV + GLRaV-1 + GLRaV-3**	**ArMV + GFLV + GLRaV-3**	**ArMV + GLRaV-1 + GLRaV-3**
Pirovac, Drinovača (191 – 199)	9	4 (44,44%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Primošten, Bucavac – Vezac donji (200 – 205)	6	3 (50%)	2 (33,33%)	0 (0%)	1 (16,67%)	0 (0%)	0 (0%)
Pirovac, Spužvice (216 – 240)	25	15 (60%)	2 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Vodice, Tribunj, Bili brig (241 – 255)	15	12 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
UKUPNO	***232***	***68 (29,31%)***	***9 (3,88%)***	***5 (2,16%)***	***3 (1,29%)***	***1 (0,43%)***	***1 (0,43%)***

Kao što je vidljivo u tablici 4.3., najzastupljeniji virus bio je GLRaV-3, od ukupno 232 testiranih uzoraka, bio je prisutan u 227 uzoraka što iznosi 97,84%. Zatim ga slijedi GFLV prisutan u 73 uzorka (31,47%). GLRaV-1 nalazio se u 12 uzoraka (5,17%), a ArMV u samo 7 uzoraka (3,02%).

Na lokaciji Jadrtovac, Donje Polje (B1-B120), od 120 testiranih uzoraka, 4 su bila negativna (3,33%). Kod ostalih lokacija, svaki uzorak je bio pozitivan na barem jedan virus, što znači da su od 232 testirana uzorka, samo 4 bila negativna odnosno 1,72% uzoraka bilo je negativno. To bi značilo da je sveukupno bilo zaraženo 228 uzoraka odnosno u 98,28% uzoraka dokazana je zaraženost barem jednim virusom.

GLRaV-3 se pojavio u najvećem postotku kod svih lokacija: na lokacijama Šibenik, Dubrava (160-179), Pirovac, Drinovača (191-199), Pirovac, Spužvice (216-240) i Vodice, Tribunj, Bili brig (241-255) zaraženi su bili svi testirani uzorci, na lokaciji Primošten, Bucavac (121-159/200-205) zaraženo je bilo 97,67% uzoraka, a na lokaciji Jadrtovac, Donje polje (B1-B120) 96,67%.

GFLV je utvrđen kao drugi najzastupljeniji virus nakon GLRaV-3, no postotak zaraženosti nije prelazio 80% (Vodice, Tribunj, Bili brig). Na lokaciji Pirovac, Spužvice zaraženo je 60% uzoraka, slijedi Primošten, Bucavac sa 58,14%, zatim Pirovac, Drinovača 44,44%, Šibenik, Dubrava 40% i Jadrtovac, Donje polje sa samo 10,83% zaraženih uzoraka.

GLRaV-1 je bio prisutan na samo 3 lokacije, a to su: Pirovac, Spužvice sa 8% zaraženih uzoraka, Primošten, Bucavac sa 11,63% zaraženih uzoraka te Jadrtovac, Donje polje sa 4,17% zaraženih uzoraka.

Kao što je već navedeno, ArMV je virus koji je bio prisutan u najmanjem postotku i na samo jednoj lokaciji (Jadrtovac, Donje polje), zaraženo je bilo 7 od 120 testiranih uzoraka (5,83%). Valja napomenuti da za ArMV nisu utvrđeni sigurno pozitivni uzorci, već samo sa niskom koncentracijom virusa.

Kod većine lokacija u svakom uzorku bio je prisutan barem jedan virus, odnosno na lokacijama Primošten, Šibenik, Pirovac i Vodice, Tribunj, Bili brig svaki uzorak bio je zaražen bar jednim virusom (100%-tna zaraženost), a na lokaciji Jadrtovac, 116 uzoraka je bilo zaraženo bar jednim virusom (96,67%). Međutim, na lokaciji Jadrtovac testirano je 120 uzoraka, a kod drugih lokacija maksimalno 25.

Mješovite infekcije bile su prisutne na svim lokacijama, osim na lokaciji Šibenik, položaj Dubrava II (tablica 4.4.). Na lokaciji Jadrtovac bilo je najviše mješovitih infekcija, to je bila jedina lokacija na kojoj su prisutna sva 4 virusa, ali u ni jednom uzorku nisu nije bilo sva 4 virusa u kombinaciji. Najčešća kombinacija virusa bila je GFLV + GLRaV-3, od sveukupno 232 uzoraka, 68 uzoraka je imalo tu kombinaciju (29,31%). Nakon toga slijedila je kombinacija GLRav-1 + GLRaV-3 prisutna u 9 uzoraka (3,88%), potom ArMV + GLRaV-3 prisutna u 5 uzoraka (2,16%) te kompleks od 3 virusa GFLV + GFLV + GLRaV-3 u 3 uzorka (1,29%). Kompleks ArMV + GFLV + GLRaV-3 te kompleks ArMV + GLRaV-1 + GLRaV-3 bili su prisutni u samo jednom uzorku što iznosi 0,43%.

Detaljan prikaz spektrofotometrijskih očitanja za sve uzorke nalazi se u prilogu 1.

5. RASPRAVA

Glavni cilj ovog rada bio je istražiti učestalost pojave četiri ekonomski značajnih virusa na sorti Babić u njenim glavnim uzgojnim područjima, primjenom imunoenzimske (ELISA) metode. S obzirom da sorta Babić ima relativno uzak areal uzgoja, a propagacija se odvija korištenjem relativno malog broja matičnih biljaka za očekivati je slično zdravstveno stanje u pogledu zaraze virusima kao i kod drugih sorata koje se uzgajaju u priobalnom području. Testirano je sveukupno 232 uzorka, od kojih je samo 4 bilo negativno na sva četiri virusa. U preostalim zaraženim uzorcima, u svakom je bio prisutan barem jedan virus ili kombinacija više njih. U prijašnjim godinama, provedena istraživanja su imala slične rezultate samo su zaraze bile u manjim postocima. U ostatku rasprave slijedi usporedba s tim istraživanjima.

Slično istraživanje provedeno je od strane Poljuhe i suradnika (2010.) u trajanju od četiri godine na prisutnost četiri ekonomski značajna virusa na vinovoj lozi (ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3) pomoću metode DAS-ELISA. Testiran je ukupno 781 uzorak 18 autohtonih sorata, prikupljenih na 41 lokaciji diljem istarskog poluotoka. GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3 pronađeni su na gotovo svim istraživanim lokacijama, a većina sorata bila je zaražena. Ukupno je utvrđena zaraza 82,2% trsova, od toga 69,0% s jednim te 31,0% s više virusa. GLRaV-3 je bio najzastupljeniji virus (69,1%), a slijedili su ga GFLV (23,9%) i GLRaV-1 (17,2%) dok ArMV nije bio detektiran. Ovi rezultati gledajući zastupljenost virusa su vrlo slični našima. U našem istraživanju GLRaV-3 je također bio najzastupljeniji virus samo u većem postotku (97,84%), kao i GFLV (31,47%). Za razliku od njihovog istraživanja, u našem je GLRaV-1 bio zastupljen u samo 5,17% uzoraka, a ArMV je bio detektiran u 3,02% uzoraka u niskim koncentracijama.

Karoglan Kontić i sur. (2009.) ispitivali su zdravstveno stanje autohtonih sorata vinove loze na 1351 uzoraka također pomoću imunoenzimske (ELISA) metode. Ispitivana je prisutnost na ista četiri ekonomski značajna virusa. Najrasprostranjeniji virus u Dalmaciji bio je GLRaV-3 s oko 80 % zaraženih trsova, što znači da je i u ovome istraživanju najrasprostranjeniji virus bio kao i u našem istraživanju, što je bilo za očekivati s obzirom da je sorta Babić rasprostranjena u području Dalmacije. U sjevernim krajevima (kontinentalna Hrvatska) gotovo polovica analiziranih biljaka bile su negativne u ELISA-i, a najzastupljeniji virus bio je GLRaV-1. Prisutnost oba nepovirusa (GFLV i ArMV) je bila prilično niska, posebice ArMV (samo 1 % zaraženih trsova). Mješovite infekcije s dva ili više virusa prilično su bila uobičajena. Najčešća kombinacija bila je infekcija s GLRaV-1 i GLRaV-3, što je slučaj u 25 % svih ispitanih trsova, odnosno u više od 50% trsova Dalmacije. U našem istraživanju najčešća kombinacija virusa bila je GFLV + GLRaV-3 (29,31%), dok je kombinacija GLRaV-1 + GLRaV-3 utvrđena kod samo 3,88% uzoraka.

Cilj istraživanja koje su proveli Vončina i sur. (2011.) bio je utvrditi prisutnost virusnih infekcija u zbirkama hrvatskih autohtonih sorata na dvije lokacije (Jazbina - Zagreb i Risika – otok Krk). Testirano je 95 uzoraka iz svake zbirke metodom ELISA, ali na prisutnost 8 različitih ekonomski značajna virusa, među kojima su također bili i ArMV, GFLV, GLRaV-1 i GLRaV-3.

Dominantan virus u obje zbirke bio je GLRaV-3, prisutan u 75 uzoraka (78,9%) sa Jazbine i u 73 uzorka (76,8%) s otoka Krka. Na Jazbini je, za razliku od prethodne zbirke, dominantan bio GLRaV-1 utvrđen u 29,5% uzoraka, a slijedili su ga GFLV sa 17,9% te ArMV sa 12,6%, dok je na otoku Krku 42,1% uzoraka bilo pozitivno na GFLV, 23,2% na ArMV te 11,6% na GLRaV-1. Mješovite infekcije s dva, tri ili četiri različita virusa također su bile česte u obje zbirke, a samo 10 trsova (10,5%) je bilo bez svih osam testiranih virusa na Jazbini, te samo 7 trsova (7,4%) sa otoka Krka.

U novijim istraživanjima Vončine i sur. (2019.) ispitivala se učestalost pojave virusa kod 14 hrvatskih autohtonih sorata vinove loze na trsovima iz 51 vinograda na području Dalmacije. Testirano je 1116 trsova metodom ELISA na 9 virusa. Potvrđena je prisutnost osam virusa, a postoci zaraze virusima ispitivanim i u ovome radu su bili slijedeći: GLRaV-3 (79,6%), GLRaV-1 (40,8%), GFLV (19,6%) i ArMV (3,2%). Kod 8,3% trsova nije utvrđena prisutnost niti jednog virusa.

Na temelju rezultata ovog istraživanja i njihovim uspoređivanjem rezultata drugih istraživanja, može se reći da se zdravstveno stanje vinove loze u Hrvatskoj pogoršava te da je definitivno najzastupljeniji GLRaV-3, pogotovo u priobalnom području. Vrijedno je istaknuti da je loše zdravstveno stanje u pogledu zaraze virusima pogotovo vidljivo kod naših autohtonih sorata čiji uzgoj je vezan uz priobalno područje. Uz sortu Babić koja je bila obuhvaćena ovim istraživanjem i kod koje je utvrđeno samo 4 (1.72%) trsova slobodnih od virusa, slični visoki intenzitet zaraze utvrđen je i u prijašnjim istraživanjima kod sorata tipičnih za područje Kaštel (Babica, Dobričić, Glavinuša, Ljutun, Mladenka, Ninčuša, Vlaška), ali i kod sorata sa puno širim arealom uzgoja kao što su Plavac mali, Vugava te Pošip. Visoki stupanj zaraze virusima naših autohtonih sorata predstavlja dodatni problem iz razloga što je proizvodnja njihovog sadnog materijala vezana uz domaće rasadničare za razliku od stranih, odnosno introduciranih sorata, gdje se bezvirusni sadni materijal može nabaviti i iz inozemstva. Shodno svemu navedenome možemo konstatirati da virusi predstavljaju značajan problem u vinogradarskoj proizvodnji Hrvatske tim više što se oboljenja uzrokovana virusima ne mogu liječiti, samo preventirati, stoga je jako bitno korištenje zdravog i bezvirusnog sadnog materijala. Također, trebat će povesti i računa o sprječavanju širenja viroza u novopodignutim vinogradima kroz kontrolu vektora (štitastih uši i nematoda). Vjerujemo da će iako poprilično limitiran broj bezvirusnih biljaka sorte Babić poslužiti za proizvodnju bezvirusnog sadnog matrijala kao jedne od osnova za njegovu uspješnu revitalizaciju.

6. ZAKLJUČAK

Provedenim istraživanjem na sorti Babić u njenim glavnim uzgojnim područjima može se zaključiti slijedeće:

1. Od ukupno 232 testiranih uzoraka, 228 uzoraka je bilo zaraženo virusima (98,3%), dok su samo 4 biljke (1,7%) bile bez virusa.

2. Postotak zaraze pojedinim virusima iznosio je GLRaV3 (97,8%), GFLV (31,5%), GLRaV-1 (5,2%) te ArMV (3%).

3. Osim pojedinačnih infekcija utvrđene su i mješovite zaraze GFLV + GLRaV-3 (29,3%), GLRaV-1 + GLRaV-3 (3,9%), ArMV + GLRaV-3 (2,2%), GFLV + GLRaV-1 + GLRaV-3 (1,3%) te ArMV + GFLV + GLRaV-3 i ArMV + GLRaV-1 + GLRaV-3 (0,4%).

4. Najzastupljeniji virus kod svih lokacija bio je GLRaV-3. Na lokacijama Šibenik, Pirovac i Vodice, Tribunj, Bili brig zaraženi su bili svi uzorci (100%), na lokaciji Primošten zaraženo je bilo 97,7% uzoraka, a na lokaciji Jadrtovac 96,7%. Drugi najzastupljeniji virus bio je GFLV, sa maksimalnim postotkom zaraženosti 80% (Vodice, Tribunj, Bili brig) te minimalnim 10,8% (Jadrtovac). GLRaV-3 pojavio se kod samo 3 lokacije – Primošten (11,6%), Pirovac, Spužvice (8%) te Jadrtovac (4,2%). Najmanje zastupljen virus bio je ArMV, prisutan na samo jednoj lokaciji (Jadrtovac) i to u niskim koncentracijama (5,8%).

5. Na svim lokacijama u svakom uzorku bio je prisutan barem jedan virus (100%-tna zaraženost), osim na lokaciji Jadrtovac gdje je bilo zaraženo 96,7% uzoraka.

7. LITERATURA

1. 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.
2. 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.
3. Bagi F., Jasnić S., Budakov D. (2016). Viroze biljaka. Poljoprivredni fakultet. Novi Sad.
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. Butorac A., Marić M., Badanjak Sabolović M., Hruškar M., Rimac Brnčić S. i Bačun Družina V. (2013). Analitičke metode u forenzici hrane. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, 8 (3-4), 90-101.
6. Clark M. F., Adams A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Virol 34:475-83, East Malling Research Station, U.K., 15-16.
7. Đurišić S., Lazić S., Petrović T., Jevđenić S. S., Lepulović D. (2003). Imunoenzimska – ELISA dijagnostika u veterinarskoj medicini. Veterinarski glasnik 57 (1-2), 63-72.
8. Fuchs M. (2020). Grapevine viruses: a multitude of diverse species with simple but overall poorly adopted management solutions in the vineyard. Journal of Plant Pathology, 2-12
9. Gelderblom H. R. (1996). Structure and Classification of Viruses, Medmicro Chapter, 41, 1-14.
10. Ivić D., Fazinić T. (2011). Gospodarski značajni virusi vinove loze, Hrvatski centar za poljoprivredu, hranu i selo, Zavod za zaštitu bilja, Zagreb.
11. Karoglan Kontić, J., Preiner, D., Šimon, S., Zdunić, G., Poljuha, D., Maletić, E. (2009). Sanitary status of Croatian native grapevine varieties. Agriculturae Conspectus Scientificus, 74, 99-103.
12. 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). 28 Zelena knjiga Hrvatske izvorne sorte vinove loze, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
13. 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.
14. 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.

15. Meng B., Martelli G. P., Golino D. A., Fuchs M. (2017). Grapevine Viruses: Molecular Biology, Diagnostics and Management, Springer, Cham.
16. Karoglan-Kontić J. (2008). Vinogradarstvo, Nakladni zavod globus, Zagreb
17. Mirošević N., Turković Z. (2003.). Ampelografski atlas. Golden marketing, Tehnička knjiga, Zagreb.
18. Modrow S., Falke D., Truyen U., Schätzl H. (2013). Molecular Virology, article from the book: Viruses: Definition, Structure, Classification, Springer-Verlag, Berlin, 17-30
19. Pavletić B. (2019). Detekcija virusa u hrvatskim autohtonim kultivarima vinove loze metodom RT-PCR prije i nakon ozdravljivanja. Rektorski rad. Prirodoslovno matematički fakultet.
20. 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.
21. Vončina D. (2021). Rasprostranjenost ekonomski važnih virusa vinove loze u Republici Hrvatskoj i njihov utjecaj na vinogradarsku proizvodnju, Glasilo biljne zaštite, 21(3), 344-349.
22. 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.
23. Vončina, D., Badurina. D., Preiner, D., Cvjetković, B., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., (2011). Incidence of virus infections in grapevines from Croation collection plantations. Phytopathologia Mediterranea. 316-326.

8. PRILOG

U prilogu se nalaze spektrofotometrijska očitanja za svaki uzorak pojedinačno.

Oznake:
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
- uzorak pozitivan na pojedini virus
- uzorak s vjerojatno niskom koncentracijom virusa

Oznaka uzorka	*ArMV*	*GFLV*	*GLRaV-1*	*GLRaV-3*
B 1	0,28	0,175	0,116	1,387
B 2	0,203	0,184	0,1	1,522
B 3	0,24	0,169	0,613	1,342
B 4	0,111	0,148	0,1	1,963
B 5	0,126	0,231	0,095	0,916
B 6	0,114	0,158	0,095	1,105
B 7	0,144	0,179	0,101	1,051
B 8	0,249	0,219	0,114	0,714
B 9	0,164	0,135	0,101	1,993
B 10	0,135	0,13	0,114	1,621
B 11	0,123	0,148	0,1	0,877
B 12	0,117	0,173	0,095	1,229
B 13	0,108	0,165	0,099	1,425
B 14	0,105	0,158	0,096	1,577
B 15	0,116	0,129	0,108	1,427
B 16	0,161	0,165	0,103	0,924
B 17	0,141	0,155	0,155	1,472
B 18	0,107	0,14	0,726	1,754
B 19	0,112	0,26	0,093	1,638
B 20	0,109	0,144	0,094	1,625
B 21	0,175	0,185	0,095	0,816
B 22	0,111	0,15	0,103	0,328
B 23	0,11	0,302	0,099	0,737
B 24	0,141	0,223	0,103	0,551
B 25	0,13	0,284	0,14	0,673
B 26	0,099	0,142	0,116	1,139
B 27	0,112	0,176	0,093	1,088
B 28	0,105	0,146	0,093	0,552
B 29	0,11	0,143	0,099	1,088
B 30	0,125	0,201	0,099	0,773
B 31	0,11	0,141	0,104	0,633
B 32	0,14	0,142	0,101	1,112
B 33	0,147	0,174	0,127	0,333
B 34	0,12	0,129	0,1	1,079

Oznaka uzorka	*ArMV*	*GFLV*	*GLRaV-1*	*GLRaV-3*
B 35	0,107	0,159	0,093	0,406
B 36	0,115	0,158	0,092	1,205
B 37	0,115	0,142	0,098	0,346
B 38	0,118	0,126	0,098	0,576
B 39	0,12	0,159	0,104	0,474
B 40	0,14	0,15	0,199	1,02
B 41	0,139	0,156	0,093	0,673
B 42	0,123	0,146	0,098	0,213
B 43	0,11	0,135	0,093	0,898
B 44	0,114	0,128	0,093	0,65
B 45	0,115	0,139	0,096	0,654
B 46	0,113	0,172	0,099	0,632
B 47	0,122	0,143	0,098	0,314
B 48	0,162	0,145	0,101	0,702
B 49	0,131	0,157	0,094	1,062
B 50	0,12	0,16	0,096	0,706
B 51	0,124	0,14	0,095	0,772
B 52	0,13	0,146	0,094	0,421
B 53	0,125	0,152	0,099	0,923
B 54	0,108	0,126	0,158	0,728
B 55	0,12	0,13	0,102	1,005
B 56	0,186	0,284	0,127	0,382
B 57	0,129	0,161	0,116	0,72
B 58	0,104	0,125	0,111	0,442
B 59	0,108	0,145	0,103	0,483
B 60	0,109	0,139	1,781	0,771
B 61	0,11	0,141	0,179	0,808
B 62	0,105	0,162	0,104	1,044
B 63	0,125	0,146	0,101	0,357
B 64	0,19	0,174	0,128	0,68
B 65	0,157	0,209	0,102	0,833
B 66	0,129	0,146	0,098	0,563
B 67	0,097	0,126	0,1	0,194
B 68	0,119	0,163	0,101	0,699
B 69	0,118	0,153	0,099	0,16
B 70	0,121	0,332	0,1	0,534
B 71	0,123	0,164	0,109	0,462
B 72	0,203	0,157	0,107	0,456
B 73	0,156	0,156	0,09	0,876
B 74	0,126	0,152	0,094	0,459
B 75	0,103	0,133	0,1	1,162
B 76	0,13	0,366	0,099	0,571
B 77	0,114	0,162	0,105	0,508
B 78	0,111	0,27	0,105	0,541
B 79	0,125	0,157	0,108	0,76
B 80	0,178	0,15	0,138	0,886

Oznaka uzorka	*ArMV*	*GFLV*	*GLRaV-1*	*GLRaV-3*
B 81	0,252	0,166	0,097	0,789
B 82	0,105	0,134	0,095	0,636
B 83	0,112	0,24	0,095	0,329
B 84	0,124	0,839	0,123	0,348
B 85	0,119	0,135	0,099	0,665
B 86	0,172	0,151	0,139	0,769
B 87	0,356	0,219	0,099	0,416
B 88	0,133	0,147	0,099	0,266
B 89	0,123	0,22	0,096	0,603
B 90	0,135	0,159	0,098	0,588
B 91	0,281	0,154	0,101	0,419
B 92	0,246	0,355	0,107	0,707
B 93	0,203	0,24	0,113	2,851
B 94	0,126	0,189	0,108	1,832
B 95	0,12	0,178	0,115	0,679
B 96	0,133	0,161	0,134	0,662
B 97	0,129	0,186	0,116	0,947
B 98	0,144	0,183	0,132	1,035
B 99	0,221	1,652	0,129	0,513
B 100	0,174	0,185	0,183	1,037
B 101	0,133	0,143	0,101	2,137
B 102	0,121	0,157	0,157	1,198
B 103	0,103	0,137	0,146	1,027
B 104	0,181	0,159	0,166	1,582
B 105	0,1	0,14	0,106	1,04
B 106	0,124	0,226	0,137	1,736
B 107	0,135	0,15	0,163	0,873
B 108	0,129	0,158	0,112	0,79
B 109	0,116	0,149	0,104	1,116
B 110	0,104	0,156	0,128	0,804
B 111	0,117	0,138	0,099	1,883
B 112	0,1	0,134	0,1	0,493
B 113	0,112	0,202	0,101	0,947
B 114	0,111	0,182	0,12	0,905
B 115	0,128	0,994	0,603	1,012
B 116	0,129	0,161	0,109	1,254
B 117	0,133	0,151	0,112	0,766
B 118	0,117	0,173	0,121	0,867
B 119	0,11	0,139	0,108	0,824
B 120	0,103	0,143	0,102	0,106
121	0,102	0,149	0,12	0,805
122	0,106	0,844	0,115	0,962
123	0,118	0,64	0,111	0,412
124	0,143	0,158	0,136	1,014
125	0,183	0,564	0,123	0,513
126	0,108	0,163	0,108	0,831

Oznaka uzorka	*ArMV*	*GFLV*	*GLRaV-1*	*GLRaV-3*
127	0,123	0,158	0,106	0,582
128	0,115	0,149	0,099	1,111
129	0,115	0,183	0,112	0,524
130	0,106	0,17	0,115	0,637
131	0,147	0,511	0,107	0,9
132	0,231	0,288	0,186	0,863
133	0,265	0,595	0,332	0,77
134	0,142	0,622	0,138	0,393
135	0,128	0,463	0,106	1,128
138	0,108	0,154	0,118	0,428
139	0,111	0,43	0,106	1,21
140	0,125	0,57	0,11	0,419
141	0,131	0,282	0,123	0,874
142	0,164	0,358	0,14	0,641
143	0,213	0,134	0,152	0,473
144	0,151	0,438	0,154	0,779
145	0,115	0,415	0,117	1,025
146	0,114	0,446	0,119	0,882
147	0,115	0,315	0,116	0,715
148	0,116	0,244	0,109	0,767
149	0,115	0,449	0,108	0,487
150	0,134	0,4	0,12	1,111
151	0,141	0,202	0,126	0,694
152	0,132	0,145	0,21	0,599
153	0,107	0,156	0,103	0,649
154	0,108	0,134	0,571	0,644
155	0,135	0,136	0,11	0,65
156	0,117	0,226	0,111	0,66
157	0,13	0,347	0,115	0,634
158	0,131	0,145	0,12	0,542
159	0,153	0,568	0,143	0,142
160	0,132	0,366	0,117	0,263
161	0,117	0,198	0,104	0,709
162	0,109	0,201	0,124	0,577
163	0,118	1,122	0,107	0,285
164	0,117	0,152	0,112	0,503
165	0,122	0,501	0,105	0,289
166	0,129	0,145	0,123	0,245
167	0,213	0,159	0,137	0,625
168	0,126	0,151	0,115	0,4
169	0,109	0,346	0,108	0,39
170	0,118	0,144	0,107	0,36
171	0,12	0,142	0,101	0,49
172	0,117	0,136	0,135	0,423
173	0,242	0,151	0,117	0,353
174	0,127	0,132	0,12	0,445

Oznaka uzorka	*ArMV*	*GFLV*	*GLRaV-1*	*GLRaV-3*
175	0,257	0,224	0,192	0,354
176	0,153	0,168	0,124	0,484
177	0,13	0,18	0,105	0,785
178	0,125	0,151	0,107	0,262
179	0,123	0,148	0,13	0,599
191	0,148	0,147	0,113	0,541
192	0,244	0,22	0,188	0,649
193	0,271	0,279	0,169	0,604
194	0,208	0,157	0,156	0,473
195	0,152	0,205	0,123	0,389
196	0,16	0,17	0,14	0,527
197	0,21	0,319	0,19	0,392
198	0,174	0,401	0,148	1,871
199	0,152	0,513	0,14	1,855
200	0,148	0,79	0,17	1,192
201	0,144	0,191	0,358	1,64
202	0,134	0,256	0,126	0,831
203	0,149	0,19	0,131	1,156
204	0,154	0,295	0,252	1,004
205	0,191	0,611	0,149	0,919
216	0,165	0,229	0,13	1,743
217	0,13	0,22	0,156	1,392
218	0,163	0,906	0,131	1,883
219	0,153	0,183	0,123	1,964
220	0,136	0,151	0,114	1,205
221	0,158	0,162	0,132	1,267
222	0,169	1,036	0,12	1,471
223	0,132	0,215	0,149	1,714
224	0,185	0,512	0,117	1,639
225	0,198	0,238	0,155	2,202
226	0,196	1,908	0,127	1,775
227	0,176	1,259	0,219	1,718
228	0,166	1,1	0,116	1,007
229	0,157	1,462	0,115	1,414
230	0,163	0,445	0,111	1,366
231	0,131	0,392	0,126	1,116
232	0,172	2,57	0,117	1,889
233	0,139	0,223	0,344	1,292
234	0,155	1,108	0,146	0,998
235	0,142	0,168	0,115	1,178
236	0,148	0,172	0,117	1,506
237	0,138	0,167	0,725	0,979
238	0,152	0,515	0,113	0,818
239	0,149	0,406	0,13	0,968
240	0,217	1,029	0,126	1,361
241	0,183	0,254	0,148	1,019

Oznaka uzorka	*ArMV*	*GFLV*	*GLRaV-1*	*GLRaV-3*
242	0,158	0,225	0,126	1,042
243	0,191	0,422	0,134	1,001
244	0,215	0,149	0,133	1,217
245	0,158	0,409	0,115	0,709
246	0,146	0,362	0,137	0,866
247	0,156	0,305	0,127	0,413
248	0,201	0,511	0,132	1,435
249	0,174	0,67	0,127	0,622
250	0,199	0,404	0,121	1,109
251	0,163	0,639	0,149	0,535
252	0,216	0,344	0,13	0,913
253	0,136	0,171	0,12	0,627
254	0,132	0,345	0,114	0,665
255	0,152	0,443	0,12	0,537

ŽIVOTOPIS

Ana Culjak rođena je 17.09.1998. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Trnsko završava 2013. godine. U 2017. godini po struci postaje kemijski tehničar završetkom Prirodoslovne škole Vladimira Preloga te upisuje preddiplomski studij Fitomedicine na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. Titulu univ. bacc. ing. agr. stječe 2020. godine obranom završnog rada naslova „Utvrđivanje stupnja primarne dormantnosti sjemena ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.)“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Maje Šćepanović. Te iste godine upisuje diplomski studij Fitomedicina na Agronomskom fakultetu u Zagrebu. U akademskoj godini 2021/2022 izrađuje diplomski rad na Zavodu za fitopatologiju pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Darka Vončine, pod naslovom: „Zastupljenost ekonomski značajnih virusa u vinovoj lozi sorte Babić“.

Govori dva strana jezika, a to su engleski C1 razine te njemački A1 razine. Za vrijeme studentskog obrazovanja radila je nekoliko studentskih poslova, a najdulje radi u specijaliziranoj trgovini alpinističke, penjačke i planinarske opreme. Kroz srednju školu bavila se hokejom na travi, no na kraju se ipak posvećuje ljubavi prema planinarenju kojim se bavi od svoje 8. godine.